



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.12

(21) Номер заявки
201400811

(22) Дата подачи заявки
2013.01.14

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) НАБОР ПОЛИПЕПТИДОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И/ИЛИ ЭЛИМИНАЦИИ КЛЕТОК, ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ, МОЛЕКУЛА НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, КОТОРАЯ КОДИРУЕТ ОДИН ИЗ ПОЛИПЕПТИДОВ НАБОРА, НАБОР НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ, КОТОРЫЙ КОДИРУЕТ НАБОР ПОЛИПЕПТИДОВ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ЭТИ НАБОРЫ

(31) **12151125.7**

(32) **2012.01.13**

(33) **EP**

(43) **2014.12.30**

(86) **PCT/EP2013/050603**

(87) **WO 2013/104804 2013.07.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЮЛИУС-МАКСИМИЛИАНС-
УНИВЕРЗИТЕТ ВЮРЦБУРГ (DE)**

(72) Изобретатель:
Штулер Гернот (DE)

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) WO-A1-2007062466
BIOLINK PARTNERS LTD: "Demibodies: Dimerization-activated therapeutic antibodies", INTERNET CITATION, 2007, XP003013805, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.biolink.org.au/library/File/Demibodies.pdf> [retrieved on 2007-01-01], the whole document

SEIFERT OLIVER ET AL.: "The IgM CH2 domain as covalently linked homodimerization module for the generation of fusion proteins with dual specificity.", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN & SELECTION: PEDS OCT 2012, vol. 25, no. 10, October 2012 (2012-10), pages 603-612, XP002699346, ISSN: 1741-0134, the whole document

KAWASHIMA REI ET AL.: "EpCAM- and EGFR-targeted selective gene therapy for biliary cancers using Z33-fiber-modified adenovirus.", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER 1 SEP 2011, vol. 129, no. 5, 1 September 2011 (2011-09-01), pages 1244-1253, XP002699347, ISSN: 1097-0215, the whole document

VAN BEUSECHEM VICTOR W. ET AL.: "Efficient and selective gene transfer into primary human brain tumors by using single-chain antibody-

targeted adenoviral vectors with native tropism abolished.", JOURNAL OF VIROLOGY MAR 2002, vol. 76, no. 6, March 2002 (2002-03), pages 2753-2762, XP002699348, ISSN: 0022-538X, the whole document

WO-A1-2004042404

OHIRO YOSHIYUKI ET AL.: "A homogeneous and noncompetitive immunoassay based on the enhanced fluorescence resonance energy transfer by leucine zipper interaction", ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 74, no. 22, 15 November 2002 (2002-11-15), pages 5786-5792, XP002605915, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/AC0203387 [retrieved on 2002-10-19], the whole document

XIE Z. ET AL.: "A new format of bispecific antibody: highly efficient heterodimerization, expression and tumor cell lysis", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 296, no. 1-2, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 95-101, XP004738464, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/J.JIM.2004.11.005, the whole document

KIPRIYANOV S.M. ET AL.: "Generation and production of engineered antibodies", MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, HUMANA PRESS, INC, US, vol. 26, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 39-60, XP009044299, ISSN: 1073-6085, DOI: 10.1385/MB:26:1:39, the whole document

ZHAO ET AL.: "Therapeutic applications of superantibodies", DRUG DISCOVERY TODAY, ELSEVIER, RAHWAY, NJ, US, vol. 10, no. 18, 15 September 2005 (2005-09-15), pages 1231-1236, XP005103828, ISSN: 1359-6446, DOI: 10.1016/S1359-6446(05)03530-0, the whole document

HEUSER C. ET AL.: "An anti-MUC1-antibody-interleukin-2 fusion protein that activates resting NK cells to lysis of MUC1-positive tumour cells", BRITISH JOURNAL OF CANCER, HARCOURT PUBLISHERS, vol. 89, no. 6, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 1130-1139, XP003013806, ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/SJ.BJC.6601267, the whole document

MILLER KATHY ET AL.: "Design, construction, and in vitro analyses of multivalent antibodies.", JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) 1 MAY 2003 LNKD- PUBMED:12728922, vol. 170, no. 9, 1 May 2003 (2003-05-01), pages 4854-4861, XP002675910, ISSN: 0022-1767, the whole document

RHEINNECKER M. ET AL.: "Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a

tumor-associated carbohydrate antigen.", JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) 1 OCT 1996 LNKD- PUBMED:8816407, vol. 157, no. 7, 1 October 1996 (1996-10-01), pages 2989-2997, XP002675911, ISSN: 0022-1767, the whole document
WO-A1-2010022225
WO-A1-9315210
KIMURA N. ET AL.: "2D7 diabody bound to the alpha2 domain of HLA class I efficiently induces caspase-

independent cell death against malignant and activated lymphoid cells", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 325, no. 4, 24 December 2004 (2004-12-24), pages 1201-1209, XP004649732, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2004.10.163, the whole document
EP-A1-1561759
EP-A1-2133093

- (57) В изобретении описываются набор полипептидов и его применения. В частности, в изобретении описан набор полипептидов, где указанный набор содержит два полипептида, каждый из которых содержит нацеливающий участок "Т", который связывается с антигеном "А", и фрагмент "F" функционального домена, при этом указанные два полипептида не ассоциированы друг с другом в отсутствие субстрата, который несет "А" в(на) своей поверхности, и при этом после димеризации "F" образовавшийся димер становится функциональным. Кроме того, в изобретении описаны медицинские и диагностические применения указанного набора. Кроме того, в изобретении описаны молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие указанный набор полипептидов или один из полипептидов, входящих в этот набор. Кроме того, в изобретении описаны фармацевтические композиции, содержащие указанный набор полипептидов.

033947 B1

033947 B1

Настоящее изобретение относится к набору полипептидов и его применениям. В частности, настоящее изобретение относится к набору полипептидов, где указанный набор содержит два полипептида, каждый из которых содержит нацеливающий участок "Т", который связывается с антигеном "А", и фрагмент "F" функционального домена, при этом указанные два полипептида не ассоциируются друг с другом в отсутствие субстрата, который несет "А" в (на) своей поверхности, и при этом после димеризации "F" образовавшийся димер становится функциональным. Кроме того, описаны медицинские и диагностические применения указанного набора. Кроме того, настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей один из полипептидов указанного набора или набор нуклеиновых кислот. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим указанный набор полипептидов.

В последние годы опубликован ряд основополагающих статей, касающихся очень высокой эффективности конструкций биспецифических антител при иммунной терапии опухолей *in vitro*, а также в доклинических и в находящихся на начальной стадии клинических исследованиях. В настоящее время доступно значительное количество различных биспецифических конструкций, различающихся по размеру, составу, фармакокинетическим характеристикам и способности непосредственно элиминировать неопластические клетки или вовлекать эффекторные клетки в лизис опухолевых клеток.

Противораковые иммунные стратегии на основе антител представляют собой очень перспективные терапевтические подходы благодаря их чрезвычайно высокой чувствительности и специфичности в отношении структур-мишеней.

Модульная структурная и функциональная организация антител позволяет осуществлять широкие манипуляции с помощью генной инженерии. Различные иммуноглобулинподобные домены можно разделять и/или соединять без потери специфических ассоциированных с доменами функциональных особенностей. Кроме того, их можно объединять и связывать с гетерологичными белковыми доменами, а также с непептидными участками. Можно также рациональным путем создавать слитые конструкции, для которых отсутствуют естественные ограничения, характерные для канонических антител.

Можно создавать слитые белки на основе антител, обладающие новыми биологическими и/или фармацевтическими свойствами. Предпринимаются многообещающие попытки модифицировать путем мутагенеза способность Fc-домена вызывать ADCC (антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность) и CDC (комплементзависимая цитотоксичность) либо для снижения побочных действий (ингибирующие мутации), либо для повышения терапевтической эффективности (активирующие мутации) в зависимости от предполагаемого применения. Новые пути применения, которые стали возможны благодаря генной инженерии, являются еще более многообразными, когда рассматривается антигенсвязывающий домен антител.

Распознающие антиген варибельные домены тяжелой (V_H) и легкой цепи (V_L) антитела можно соединять с помощью пептидного линкера методами генной инженерии, сохраняя при этом антигенсвязывающую способность. Указанные антигенсвязывающие одноцепочечные варибельные фрагменты (scFv) можно применять в виде имеющих небольшой размер заменителей антител, обладающих высокой способностью проникать в ткани и небольшим временем удерживания в сыворотке, для процедур клинической визуализации и лучевой терапии и других путей применения. Важно отметить, что указанные scFv-фрагменты можно легко применять в качестве антигенспецифических модулей при создании новых рекомбинантных терапевтических средств.

Из современных публикаций очевиден огромный потенциал рекомбинантных биспецифических антител для противоопухолевой терапии. Указанные биспецифические антитела распознают два антигена, один из которых экспрессируется опухолью, а другой, как правило, присутствует на иммунной клетке. Большинство биспецифических антител, применяемых в противоопухолевой терапии, имеют в качестве мишени ассоциированный с линией опухоли маркер, с одной стороны, и CD3 ϵ , инвариантную молекулу, представляющую собой комплекс Т-клеточный рецептор/CD3, с другой стороны, вовлекая тем самым Т-клетки в разрушение опухоли (Müller и Kontermann, *Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: Current perspectives*. *BioDrugs*, 24(2), 2010, с. 89-98).

Несмотря на широкие возможности манипулирования структурой и функцией антител, терапевтическая эффективность указанных реагентов на основе антител ограничена природой целевого антигена, доступности антигена в опухоли и ассоциированных с опухолью тканях и способностью антитела вызывать или опосредовать требуемую индуцирующую гибель клетки функцию.

Например, когда пациентов лечат с помощью биспецифических конструкций, направленных против антигенов, которые экспрессируются также и в тканях с жизненно важными функциями, то имеют место серьезные побочные действия. Это представляет собой серьезную проблему, поскольку, за исключением неизвестного количества несущих индивидуальные мутации молекул клеточной поверхности и моноклональных В- или Т-клеточных рецепторов в случае лимфом, до настоящего времени неизвестны специфические для опухоли антигены, которые позволяют отличать трансформированную клетку от ее здорового предшественника.

Поскольку терапевтические концепции, базирующиеся на применении биспецифических антител, как правило, основаны на рекрутменте эффекторных клеток, то, по-видимому, чем более эффективным

является инструмент (биспецифическая конструкция), тем с большей вероятностью будут возникать побочные действия, и даже очень небольшой уровень экспрессии антигена в нетрансформированной ткани может вызывать неконтролируемые нецелевые воздействия.

В 2008 г. в журнале SCIENCE опубликована первая статья о клинической эффективности одноцепочечного антитела, представляющего собой биспецифический активатор Т-клеток (BiTE), т.е. МТ103/блинатумомаб; оно индуцирует ремиссию примерно у 80% пациентов, страдающих рецидивирующими или устойчивыми к стандартной иммунной химиотерапии лимфомами, при его применении в дозах, обеспечивающих уровни в сыворотке примерно на 5 порядков ниже по сравнению с уровнями в сыворотке моноклонального антитела ритуксимаб (Bargou R. и др., Science 321, 2008, с. 974-977). Указанная публикация и последующие статьи, касающиеся результатов, полученных на подтверждающей фазе II исследований в области лечения острого лимфолейкоза (ALL), открыли новую эру для биспецифических антител, интерес к которым был утрачен в течение почти двух десятилетий из-за системной токсичности и невысокой терапевтической активности или ее отсутствия. В основном благодаря статье в журнале SCIENCE биспецифические антитела вновь стали быстро развивающейся областью, они насчитывают более 35 различных форматов (Reichert, Drug Discov Today, 17, 2012, с. 954-963). Указанные форматы различаются по размеру, и они оптимизированы с позиций аффинности к антигену, стабильности, способности к рекрутменту эффекторных клеток (главным образом Т-клеток) и фармакокинетических характеристик. Аффинность или avidность конструкций изменяют с помощью процесса созревания аффинности, используя различные методики, или просто соединяя несколько scFv-доменов в ряд для создания мультиспецифической конструкции.

Описаны даже триспецифические антитела, которые созданы для повышения способностей к связыванию, они направлены на две молекулы-мишени вместо одной. Стабильность форматов можно оптимизировать путем добавления иммуноглобулинподобных доменов для того, чтобы имитировать встречающиеся в естественных условиях антитела и для одновременного улучшения фармакокинетических свойств, таких как удлиненное время полужизни в сыворотке, и защиты от протеолитического расщепления протеазами. Кроме того, стабильность форматов можно повышать путем оптимизации метода их получения. Поскольку линкерные последовательности, которые применяют для ковалентного связывания scFv-доменов, часто приводят к образованию агрегатов, то были созданы продуцирующие линии, которые сначала продуцируют два или три полипептида, которые легко можно использовать для вторичной сборки с получением функционального лекарственного средства. В указанных методиках для ковалентного соединения двух различных полипептидов применяют непосредственное связывание через дисульфидные мостики или перекрестносшивающие реагенты. В других методиках можно применять домены гетеро- или гомодимеризации типа доменов лейциновых молний, Fc-доменов, и другие технологии типа "knob into hole" (выступ-во-впадине) (см., например, WO 2007/062466). Кроме того, в так называемых иммуноанализах типа "открытый сэндвич" для выявления антигена применяли взаимодействие V_H и V_L , которые можно стабилизировать путем связывания антигена (Ueda, Nature Biotechnology 14, 1996, с. 1714-1718; Ohmuro-Matsuyama, Detection of Protein Phosphorylation by Open-Sandwich Immunoassay, Integrative Proteomics, под ред. д-ра. Hon-Chiu Leung, ISBN: 978-953-51-0070-6; WO 2004/016782/EP-A1 1536005.)

Однако би/триспецифические и двухвалентные или мультиспецифические конструкции, описанные в данной области, имеют недостатки. Во-первых, отсутствие истинно специфических опухолевых антигенов, служащих в качестве молекул-мишеней, на которое может быть направлено действие. Фактически, чем более эффективным является формат в виде биспецифических антител, тем более серьезные побочные повреждения с ним связаны, поскольку антигены, являющиеся мишенями, как правило, представляют собой дифференцировочные антигены, которые присутствуют как в опухолях, так и в незлокачественных клетках. Вследствие этого би- или триспецифические форматы, известные из существующего уровня техники, не позволяют отличать злокачественные клетки от незлокачественных. В этой связи может оказаться, что триспецифические конструкции, созданные для достижения высокой avidности связывания с клетками-мишенями, могут, наоборот, придавать высокую степень нецелевых воздействий, поскольку связывание одной молекулы-мишени, в целом, является достаточным для вовлечения иммунных клеток в разрушение клетки, которая экспрессирует любую молекулу-мишень. Таким образом, в триспецифической конструкции повышение avidности происходит за счет специфичности. Современные мультипараметрические анализы продемонстрировали, что опухолевые клетки можно отличать от соответствующих им нетрансформированных тканей, из которых они образовались, по профилю экспрессии (сигнатуре) аномальных антигенов. В настоящее время эти данные составляют часть системы классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) гематопозитических неоплазм, это подтверждено также для раковых и раковых стволовых или иницирующих раковых клеток другого происхождения. Таким образом, предпочтительно следует оказывать воздействие на клетки, которые экспрессируют одновременно комбинацию антигенов, которые, взятые в совокупности, определяют злокачественный статус. Ни одно из известных из существующего уровня техники антител не обладает способностью отличать клетки, экспрессирующие комбинацию антигенов-мишеней, от клеток, позитивных по индивидуальному антигену. Во-вторых, основной проблемой технологий на основе биспецифических антител, например, с

использованием полных CD3-модулей (например, анти-Cd3 scFv), является присущая этим белкам способность стимулировать или предварительно стимулировать независимое Т-клеточное связывание с антигеном-мишенью на клетках-мишенях, и целый ряд обнаруженных в настоящее время побочных действий, по-видимому, могут быть ассоциированы с ошибочной Т-клеточной функцией.

Таким образом, в данной области существует потребность в более специфических подходах к лечению рака, в частности, существует потребность в улучшенных путях идентификации и/или элиминации раковых клеток с более высокой специфичностью и пониженными побочными действиями.

Аналогичные потребности существуют в области аллогенной трансплантации стволовых клеток, т.е. трансплантации стволовых клеток, полученных из индивидуума, отличного от пациента. Пациента, страдающего рецидивирующим или рефрактерным лейкозом или другим гематологическим заболеванием, можно лечить с помощью химиотерапии/облучения (для элиминации злокачественных гематопозитических клеток) в сочетании с трансплантацией здоровых гематопозитических клеток из донора. Если элиминация злокачественных клеток является неполной, то опухоль может вновь расти из выживших злокачественных клеток в организме реципиента, несмотря на присутствие здоровых клеток, введенных путем трансплантации. В результате показатели выживаемости среди пациентов, подвергающихся противоопухолевому лечению и аллогенной трансплантации, значительно снижаются.

Однако сложно с высокой специфичностью элиминировать (и также с высокой специфичностью идентифицировать) выжившие злокачественные клетки, и поэтому, несмотря на многочисленные попытки, удовлетворительного решения указанной проблемы пока не найдено. Таким образом, в данной области существует потребность в разработке улучшенных путей специфической идентификации и/или элиминации указанных злокачественных клеток у реципиента с минимальными побочными действиями на другие клетки.

Трансплантат (аллогенные стволовые клетки), вводимый вскоре после кондиционирующей терапии (облучение/химиотерапия) может возмещать и реконструировать гематопоз. Трансплантат получают либо из костного мозга, либо из стимулированных клеток периферической крови, и он содержит примерно 1% гематопозитических стволовых клеток, которые являются источником вновь образующихся клеток крови. Кроме того, трансплантат, как правило, содержит огромное количество иммунных клеток, прежде всего, Т-лимфоцитов, которые являются частью адаптивной иммунной системы, и поэтому может оказывать очень благоприятное действие в случаях, когда указанные Т-клетки поддерживают иммунную атаку против лейкозных клеток. Указанная ситуация подробно описана и называют действием "трансплантат-против-лейкоза". С другой стороны, часто встречается также ошибочный иммунный ответ, который направляет Т-клетки против пациента, известен как реакция "трансплантат-против-хозяина".

Для минимизации реакции "трансплантат-против-хозяина" трансплантаты, как правило, выбирают на основе HLA (общие антигены лейкоцитов человека, главный комплекс гистосовместимости человека) или ГКГ (главный комплекс гистосовместимости). Более близкие для донора и реципиента антигены обуславливают более низкую вероятность серьезной реакции "трансплантат-против-хозяина". Однако для многих пациентов не удается найти полностью совместимый трансплантат. В этих случаях используют стволовые клетки костного мозга и периферической крови, которые отличаются одной или даже несколькими молекулами HLA. Указанная клиническая ситуация требует соблюдения строгого режима иммуносупрессии после трансплантации для того, чтобы держать под строгим контролем Т-клеточную систему.

Таким образом, одна из задач настоящего изобретения заключается в разработке улучшенных путей специфической идентификации и/или элиминации конкретных типов клеток. Кроме того, задачей настоящего изобретения является разработка улучшенных путей специфической идентификации и/или элиминации клеток, которые имеют конкретную комбинацию двух специфических антигенов на своей клеточной поверхности. Кроме того, задачей настоящего изобретения является разработка улучшенных путей специфической идентификации и/или элиминации раковых клеток. Кроме того, задачей настоящего изобретения является разработка улучшенных путей специфической идентификации и/или элиминации клеток, которые (1) имеют определенное происхождение (например, в такой ситуации, как трансплантация ткани или клеток, ими являются клетки, полученные из организма реципиента или из донора) и (2) принадлежат к специфическому клеточному типу или клеточной линии дифференцировки (например, гематопозитические клетки).

Задачи, положенные в основу настоящего изобретения, можно решать с помощью набора полипептидов, для идентификации и/или элиминации клеток, которые имеют конкретную комбинацию двух специфических антигенов на своей клеточной поверхности, содержащий:

первый полипептид P1, который содержит:

(I) нацеливающий участок T1,

где указанный нацеливающий участок T1 специфически связывается с антигеном A1, и

(II) фрагмент F1 функционального домена F,

где ни указанный фрагмент F1, ни указанный полипептид P1 не обладают функцией, соответствующей функции указанного домена F, и

второй полипептид P2, который содержит:

(I) нацеливающий участок T2,
 где указанный нацеливающий участок T2 специфически связывается с антигеном A2, и
 (II) фрагмент F2 функционального домена F,
 где ни указанный фрагмент F2, ни указанный полипептид P2 не обладают функцией, соответствующей функции указанного домена F,
 где указанный антиген A1 отличается от указанного антигена A2,
 где указанный полипептид P1 и указанный полипептид P2 не ассоциируются друг с другом в отсутствие клетки, которая содержит оба антигена A1 и A2 на своей клеточной поверхности,
 где после димеризации указанного фрагмента F1 указанного полипептида P1 с указанным фрагментом F2 указанного полипептида P2, образовавшийся в результате димер приобретает функцию, соответствующую функции указанного домена F, и
 где указанный фрагмент F1 содержит V_L-домен антитела или указанный фрагмент F2 содержит V_H-домен этого же антитела; или
 где указанный фрагмент F1 содержит V_H-домен антитела и указанный фрагмент F2 содержит V_L-домен этого же антитела.

В предпочтительном варианте клетка, несущая оба антигена A1 и A2 на своей клеточной поверхности, индуцирует димеризацию фрагмента F1 указанного полипептида P1 с фрагментом F2 указанного полипептида P2, в то время как клетка, которая не несет оба антигена A1 и A2 на своей клеточной поверхности, не индуцирует димеризацию фрагмента F1 указанного полипептида P1 с фрагментом F2 указанного полипептида P2. Причем предпочтительно указанные полипептиды P1 и P2 в отсутствие указанного субстрата или указанной клетки имеют константу диссоциации друг от друга K_D, составляющую от 10⁻⁸ до 10⁻² М, от 10⁻⁷ до 10⁻³ М или от 10⁻⁶ до 10⁻³ М; и /или указанные полипептиды P1 и P2 в присутствии указанного субстрата или указанной клетки имеют константу диссоциации K_D ниже 10⁻⁶ М, ниже 10⁻⁷ М, ниже 10⁻⁸ М или ниже 10⁻⁹ М.

При этом указанный антиген A1 и/или указанный антиген A2 могут представлять собой антиген, экспрессируемый на поверхности клеток опухоли или на поверхности клеток-предшественников клеток опухоли.

В одном из вариантов осуществления изобретения комбинация антигена A1 и антигена A2 присутствует только на раковых клетках и отсутствует на клетках, которые не являются раковыми.

Предпочтительно эта комбинация антигена A1 и антигена A2 является специфической для раковых клеток определенного типа рака.

Указанный антиген A1 может представлять собой антиген ГКГ, который является аллельным вариантом, выбранным из группы, состоящей из

HLA-A2, HLA-Cw6, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A25, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B35, HLA-B44, HLA-Cw3, HLA-Cw4 и HLA-Cw7; и/или

указанный антиген A2 представляет собой антиген, специфический для определенного клеточного типа или определенной клеточной линии, выбранный из группы, состоящей из

CD45; CD34; CD33; CD138; CD15; CD1a; CD2; CD3; CD4; CD5; CD8; CD20; CD23; CD31; CD43; CD56; CD57; CD68; CD79a; CD146; белки сурфактанта; синаптофизин; CD56; CD57; рецептора никотин-ацетилхолина, специфической для мышц киназы MUSK; потенциалзависимого кальциевого канала (P/Q-типа); потенциалзависимого калиевого канала (VGKC), N-метил-D-аспаратного рецептора (NMDA); TSH; амфифизина; HerPar-1; ганглиозида GQ1B, GD3 или GM1; и гликофорина-A.

В другом варианте осуществления изобретения любой из указанных антигенов A1 и A2 может быть выбран из группы, состоящей из

HLA-A2; HLA-Cw6; EpCAM; CD20; CD33; CD38; CD45; Her2; EGFR; CD138; CEA; CD19; PSMA; E-кадгерин; Ca-125; Her-2/neu; белка опухолей апокринных потовых желез; BCA-225; CA 19-9; CD117; CD30; эпителиального антигена BER-EP4, эпителиального мембранного антигена и связанного с эпителием антигена MOC-31; рецептора эпидермального фактора роста HER1; рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) альфа; меланомаассоциированного маркера/Mart 1/Melan-A; CD133; TAG 72; аквапорин-2 и клонотипического антитела на поверхности В-клеток. В наиболее предпочтительных вариантах:

(I) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой EpCAM, а другой представляет собой EGFR, HER2/neu, CD10, VEGF-R или MDR;

(II) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой MCSP, а другой представляет собой меланоферрин или EpCAM;

(III) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой CA125, а другой представляет собой CD227;

(IV) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой CD56, а другой представляет собой CD140b или ганглиозид GD3;

(V) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой EGFR, а другой представляет собой HER2;

(VI) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой PSMA, а другой представляет собой

HER2;

(VII) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой сиалил-Льюис, а другой представляет собой EGFR;

(VIII) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой CD44, а другой представляет собой ESA, CD24, CD133, MDR или CD117;

(IX) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой CD34, а другой представляет собой CD19, CD79a, CD2, CD7, HLA-DR, CD13, CD117, CD33 или CD15;

(X) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой CD33, а другой представляет собой CD19, CD79a, CD2, CD7, HLA-DR, CD13, CD117 или CD15;

(XI) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой MUC1, а другой представляет собой CD10, CEA или CD57;

(XII) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой CD38, а другой представляет собой CD138;

(XIII) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой CD24, а другой представляет собой CD29 или CD49f;

(XIV) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой угольную ангидразу IX, а другой представляет собой аквапорин-2;

(XV) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой HLA-A2, а другой представляет собой EpCAM;

(XVI) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой HLA-A2, а другой представляет собой CD45;

(XVII) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой HLA-A2, а другой представляет собой EGFR;

(XVIII) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой HLA-A2, а другой представляет собой Her2;

(XIX) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой HLA-A2, а другой представляет собой CEA;

(XX) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой EpCAM, а другой представляет собой CEA;

(XXI) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой CD45, а другой представляет собой CD138;

(XXII) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой EGFR, а другой представляет собой CEA;

(XXIII) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой Her2, а другой представляет собой CEA; или

(XXIV) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой CD19, а другой представляет собой клонотипическое антитело на поверхности В-клетки. Указанный нацеливающий участок T1 и/или T2 может содержать иммуноглобулиновый модуль; или указанный нацеливающий участок T1 и/или T2 содержит аптамер или встречающийся в естественных условиях лиганд указанного антигена A1 или антигена A2 соответственно.

В предпочтительном варианте указанный нацеливающий участок T1 содержит иммуноглобулиновый модуль I1, который содержит V_L-домен, сцепленный с V_H-доменом, или содержит вариабельный домен V_HH антитела лам, антитела верблюдов или антитела акул; и/или указанный нацеливающий участок T2 содержит иммуноглобулиновый модуль I2, который содержит V_L-домен, сцепленный с V_H-доменом, или содержит вариабельный домен V_HH антитела лам, антитела верблюдов или антитела акул.

В наиболее предпочтительном варианте указанные иммуноглобулиновые модули I1 и I2 содержат scFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент), Fab или F(ab')₂ антитела или полное антитело.

Причем один из указанных нацеливающих участков T1 и T2 может содержать аллерген или субстрат, который связывается с клонотипическим антителом на поверхности В-клетки.

Указанный функциональный домен F может представлять собой или содержать иммуноглобулиновый модуль.

В предпочтительном варианте указанный функциональный домен F представляет собой Fv (вариабельный фрагмент) или scFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент) антитела.

В самом предпочтительном варианте указанный фрагмент F1 содержит V_L-домен антитела к CD3, к His или к DIG и указанный фрагмент F2 содержит V_H-домен этого же антитела, или где указанный фрагмент F1 содержит V_H-домен антитела к CD3, к His или к DIG, или указанный фрагмент F2 содержит V_L-домен этого же антитела.

В наиболее предпочтительном варианте указанный иммуноглобулиновый модуль содержит V-домен, выбранный из группы, состоящей из:

(I) V-домена антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 2, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 1;

(II) V-домена антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 4, и/или V_H-

домен, содержащий SEQ ID NO: 3;

(III) V-домена антитела к CD3, который содержит VL-домен, содержащий SEQ ID NO: 6, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 5;

(IV) V-домена антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 8, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 7;

(V) V-домена антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 10, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 9; и

(VI) V-домена антитела к His, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 12, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 11;

(VII) V-домена антитела к DIG, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 14, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 30.

При этом любой из полипептидов P1 и P2 могут представлять собой или содержать аминокислотную последовательность, выбранную и группы, включающей SEQ ID NO: 114-129 и 197.

Вторым объектом данного изобретения может быть применение набора предложенных полипептидов для лечения пациента с опухолью.

Предпочтительно опухоль представляет собой рак.

Описанный в изобретении набор полипептидов может быть также использован для диагностики опухоли у пациента. Причем предпочтительно опухоль представляет собой рак.

Еще одним объектом данного изобретения является молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует один из полипептидов из набора полипептидов.

Причем эта молекула нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, представленную в любой одной из SEQ ID NO: 135-150 и 196.

Другим объектом данного изобретения является набор молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют набор полипептидов. Предпочтительно этот набор молекул нуклеиновых кислот содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой одной из SEQ ID NO: 135-150 и 196.

Наконец, последним объектом данного изобретения является фармацевтическая композиция для идентификации и/или элиминации клеток, которые имеют конкретную комбинацию двух специфических антигенов на своей клеточной поверхности, содержащая либо набор полипептидов, либо молекулу нуклеиновой кислоты, где указанная фармацевтическая композиция содержит также фармацевтически приемлемый носитель.

Сила сродства (аффинность), с которой происходит гетеро- и гомодимеризация, например, с лейциновыми молниями и/или константными доменами типа CH3-домена иммуноглобулина или Fc-фрагментами, как установлено, характеризуется константой диссоциации K_D, составляющей от ~10⁻⁸ до 10⁻¹¹ М (см., например, Zhu, Protein Sci. 6, 1997, с. 781-788; Plückthun, Immunotech. 3, 1997, с. 83-105). Указанный диапазон K_D значительно ниже величин K_D, с которыми в отсутствие указанного субстрата или указанной клетки может происходить ассоциация и/или димеризация указанных полипептидов P1 и P2, в частности, указанных фрагментов F1 и F2, предлагаемых в настоящем изобретении. Таким образом, полипептид P1 и полипептид P2 и/или, в частности, фрагмент F1 и фрагмент F2, входящие в них, более конкретно V_H и V_L, которые могут входить в их состав, могут ассоциироваться друг с другом и/или димеризоваться в отсутствие указанного субстрата или указанной клетки. Это характеризуется величиной K_D, превышающей K_D, например, для гетеро- и гомодимеризации лейциновых молний и/или константных доменов типа CH3-домена иммуноглобулина или Fc-фрагментов. В присутствии указанного субстрата или указанной клетки, предполагается, что указанный полипептид P1 и полипептид P2 и/или, в частности, указанный фрагмент F1 и фрагмент F2, входящие в них, более конкретно V_H и V_L, которые могут входить в их состав, ассоциируются друг с другом и/или димеризуются с K_D, которая находится в диапазоне величин K_D, например, характеризующих гетеро- и гомодимеризацию лейциновых молний и/или константных доменов типа CH3-домена иммуноглобулина или Fc-фрагментов, или даже нижеуказанного диапазона.

Сила взаимодействия, например, выделенных V_H- и V_L-доменов, в целом, характеризуется низкой аффинностью. С использованием различных методов, таких как калориметрия, флуорометрия или ультрафиолетовая спектроскопия, и/или метод кругового дихроизма, было определено, что величины констант диссоциации K_D составляют от 10⁻⁹ до 10⁻⁶ М (см., например, Wörn, JMB, 305, 2001, с. 989-1010; Plückthun, Immunological Reviews № 130, 1992). С помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR, биосенсор BIAcore или BIAcore 2000, фирма Pharmacia) и системы на основе антитела к HEL (антитело к лизоциму белка куриного яйца HuHEL-10), Ueda (loc. cit.) и Ohmuro-Matsuyama (loc. cit.) обнаружили, что у выделенных V_H- и V_L-доменов димеризация полностью отсутствует (K_a < 10⁵/М, ниже предела обнаружения). Однако ассоциация пептидов V_H и V_L значительно повышалась в присутствии родственных антигенов (K_a ~ 10⁹/М), что сопровождалось выраженным снижением скорости диссоциации тримерного комплекса антиген/V_H/V_L с расчетной величиной K_d ~ 2,73×10⁻⁵±1,43×10⁻⁶/с при концентрации антигена 1,4 мкМ. Таким образом, в контексте настоящего изобретения наиболее вероятно, что величина K_D, при которой может иметь место ассоциация и/или димеризация в отсутствие указанного субстрата или клетки указанных полипептидов P1 и P2, в частности, указанных фрагментов F1 и F2,

предлагаемых в настоящем изобретении, может быть только равна или даже превышать величину K_D , или находиться в диапазоне величин K_D , характерных для выделенных V_H - и V_L -доменов, например, которые были определены и указаны у Wörn (loc. cit.), Plückthun (1992; loc. cit.), Ueda (loc. cit.) и Ohmuro-Matsuyama (loc. cit.), в частности, превышать величину K_D или выходить за рамки диапазона величин K_D тримерного комплекса антиген/ V_H/V_L , которые были определены и описаны у Wörn (loc. cit.), Plückthun (1992; loc. cit.), Ueda (loc. cit.) и Ohmuro-Matsuyama (loc. cit.). В присутствии указанного субстрата или указанной клетки можно ожидать, что полипептид P1 и полипептид P2 и/или, в частности, фрагмент F1 и фрагмент F2, входящие в них, более конкретно V_H и V_L , которые могут входить в их состав, ассоциируются друг с другом и/или димеризуются с K_D , которая (значительно) ниже величины K_D или диапазона величин K_D выделенных V_H - и V_L -доменов, например, которые были определены и указаны у Wörn (loc. cit.), Plückthun (1992; loc. cit.), Ueda (loc. cit.) и Ohmuro-Matsuyama (loc. cit.), предпочтительно с величиной K_D , которая соответствует или даже ниже величины K_D или диапазона величин K_D тримерного комплекса антиген/ V_H/V_L , Plückthun (loc. cit.), Ueda (loc. cit.) и Ohmuro-Matsuyama (loc. cit.).

Полипептид P1 и полипептид P2 и/или, в частности, фрагмент F1 и фрагмент F2, входящие в них, более конкретно V_H и V_L , которые могут входить в их состав, могут не ассоциироваться друг с другом в отсутствии указанного субстрата или указанной клетки и/или не димеризуются в отсутствии указанного субстрата или указанной клетки. Если это все-таки имеет место, то их ассоциация друг с другом и/или димеризация в отсутствии указанного субстрата или указанной клетки может характеризоваться величиной K_D , лишь превышающей 10^{-8} М, предпочтительно превышающей 10^{-6} М, более предпочтительно превышающей 10^{-5} М и более предпочтительно превышающей 10^{-4} М. Кроме того, их ассоциация друг с другом и/или димеризация в отсутствии указанного субстрата или указанной клетки может характеризоваться величиной K_D , лишь находящейся в диапазоне от 10^{-8} до 10^{-2} М, предпочтительно от 10^{-7} до 10^{-3} М, более предпочтительно от 10^{-6} до 10^{-3} М и еще более предпочтительно от 10^{-5} до 10^{-3} М. Полипептид P1 и полипептид P2 и/или, в частности, фрагмент F1 и фрагмент F2, входящие в них, более конкретно V_H и V_L , которые могут входить в их состав, могут ассоциироваться друг с другом в присутствии указанного субстрата или указанной клетки и/или могут димеризоваться в присутствии указанного субстрата или указанной клетки. В частности, их ассоциация друг с другом и/или димеризация в присутствии указанного субстрата или указанной клетки может характеризоваться величиной K_D лишь ниже 10^{-6} М, предпочтительно ниже 10^{-7} М, более предпочтительно ниже 10^{-8} М и более предпочтительно ниже 10^{-9} М. Их ассоциации друг с другом и/или димеризация в присутствии указанного субстрата или указанной клетки может характеризоваться величиной K_D , находящейся в диапазоне от 10^{-11} до 10^{-6} М, более предпочтительно от 10^{-11} до 10^{-7} М и еще более предпочтительно от 10^{-11} до 10^{-8} М.

Вышесказанное применимо также к случаю присутствия агента, который стабилизирует ассоциацию и/или димеризацию полипептида P1 и полипептида P2 и/или, в частности, фрагмента F1 и фрагмента F2. Например, указанный стабилизирующий агент может представлять собой антиген, например, типа CD3, HIS или DIG, способный связываться с доменом F, который, например, может содержать V_H и V_L антитела (F1 и F2 соответственно или F2 и F3 соответственно).

Понятие "присутствует" в контексте настоящего изобретения и, в частности, в указанном выше контексте (т.е. касательно указанного агента и/или указанного субстрата или указанной клетки, и/или указанных антигенов A1 и A2), означает конкретно, что субстанция присутствует в концентрации, составляющей от 0,01 мкМ до 1 мМ, составляющей от 0,1 до 500 мкМ, составляющей от 0,1 до 300 мкМ, составляющей от 0,1 до 100 мкМ, составляющей от 1 до 500 мкМ, составляющей от 10 до 500 мкМ. Понятие "отсутствует" в контексте настоящего изобретения и, в частности, в указанном выше контексте (т.е. касательно указанного агента и/или указанного субстрата или указанной клетки, и/или указанных антигенов A1 и A2), означает конкретно, что субстанция присутствует в концентрации, более низкой, чем указанные выше диапазоны, или более низкой чем 1 мМ, 500 мкМ, 300, 100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 мкМ или 1 нМ, при этом более низкие величины являются предпочтительными.

Специалисту в данной области должно быть очевидно, каким образом измерять K_D , характеризующую димеризацию, в частности P1 и P2, более конкретно F1 и F2, входящих в них, более конкретно V_H и V_L , которые могут входить в их состав. Примерами соответствующих методов измерения являются рентгеновская кристаллография; ядерный магнитный резонанс (ЯМР); изотермическая калориметрия (ИТС); криоэлектронная микроскопия (СЕМ); масс-спектрометрия (МС); поверхностный плазмонный резонанс (SPR). Указанные методы описаны, например, в Protein Surface Recognition: Approaches for Drug Discovery: Approaches for the Inhibition of Protein-Protein Interactions for Drug Discovery, под ред. Ernest Giralt, Mark Pecuh, Xavier Salvatella, изд-во John Wiley & Sons; 12 ноября 2010 г.). Другими примерами пригодных методов измерения являются анализ на основе кругового дихроизма; гель-фильтрационная хроматография малой зоны; флуоресцентная гель-ретардация; седиментационное уравнивание; флуоресцентный поляризационный анализ; "Blot Overlay" или Far-вестерн-блоттинг (метод аффинного блоттинга, метод анализа белок-белковых взаимодействий); анализ методом аффинного капиллярного электрофореза; флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET); указанные методы описаны, например, в Protein-Protein Interactions: Methods and Applications: 261 (Methods in Molecular Biology); под ред. Haiyan Fu; изд-во Humana Press; 1, 23 марта 2004 г. Предпочтительным методом измерения K_D является метод

флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС). Этот метод описан, например, у Douglas Magde, *Physical Review Letters* 29, 11, 1972, с. 705-708.

В одном из конкретных примеров величины K_D , указанные в настоящем описании, (I) относятся к величинам K_D , измеренным при температуре 4-38°C, предпочтительно 4-20°C (например, 10°C) или 20-38°C (например, 30°C), и/или pH от 4,5 до 8 (например, pH 7), (II) измеренным в указанных условиях или (III) подлежащим измерению в указанных условиях.

Понятие "не ассоциирован" в контексте настоящего изобретения означает, прежде всего, отсутствие функциональной ассоциации касательно функции домена F, т.е. отсутствие возможности у F1 и F2 образовывать функциональный F. Таким образом, P1 и P2 могут быть связаны друг с другом (например, ковалентно), если при этом не образуется функциональный домен F с помощью F1 и F2. Однако предпочтительно, чтобы P1 и P2 были отделены друг от друга.

Указанный антиген A1 и/или указанный антиген A2 могут представлять собой молекулу, белковую субстанцию, небелковую субстанцию.

Указанный нацеливающий участок T1 может нековалентно связываться с указанным антигеном A1 и с указанным антигеном A2.

Субстрат, имеющий оба антигена A1 и A2 на своей поверхности, может индуцировать димеризацию фрагмента F1 указанного полипептида P1 с фрагментом F2 указанного полипептида P2, в то время как субстрат, который не имеет обоих антигенов A1 и A2 на своей клеточной поверхности, может не индуцировать димеризацию фрагмента F1 указанного полипептида P1 с фрагментом F2 указанного полипептида P2.

Клетка, несущая оба антигена A1 и A2 на своей клеточной поверхности, может индуцировать димеризацию фрагмента F1 указанного полипептида P1 с фрагментом F2 указанного полипептида P2, в то время как клетка, которая не имеет обоих антигенов A1 и A2 на своей клеточной поверхности, не может индуцировать димеризацию фрагмента F1 указанного полипептида P1 с фрагментом F2 указанного полипептида P2. В этом контексте выражение "индуцирует димеризацию" соответствует, прежде всего, выражению "позволяет осуществляться соприкосновению и последующей димеризации".

Указанный нацеливающий участок T1 может содержать иммуноглобулиновый модуль и/или указанный нацеливающий участок T2 может содержать иммуноглобулиновый модуль.

Указанный нацеливающий участок T1 также может содержать иммуноглобулиновый модуль I1, который содержит V_L -домен, сцепленный с V_H -доменом, предпочтительно иммуноглобулиновый модуль I1, который может содержать scFv (одноцепочечный варибельный фрагмент) антитела, Fab или $F(ab')_2$ (например, с дополнительными участками, например, Fc-доменом) антитела или полное антитело, и/или указанный нацеливающий участок T2 может содержать иммуноглобулиновый модуль I2, который в свою очередь может содержать V_L -домен, сцепленный с V_H -доменом, предпочтительно иммуноглобулиновый модуль I2, который может содержать scFv (одноцепочечный варибельный фрагмент) антитела, Fab или $F(ab')_2$ (например, с дополнительными участками, например, Fc-доменом) антитела или полное антитело.

Указанный нацеливающий участок T1 и/или указанный нацеливающий участок T2 может содержать иммуноглобулиновый модуль, который содержит варибельный домен V_H антитела лам, антитела верблюдов или антитела акул.

Указанный нацеливающий участок T1 и/или указанный нацеливающий участок T2 также может представлять собой аптамер или встречающийся в естественных условиях лиганд указанного антигена A1 или антигена A2 соответственно.

Указанный нацеливающий участок T1 и/или указанный нацеливающий участок T2 может содержать Fv или scFv ((одноцепочечный) варибельный фрагмент) антитела.

Имуноглобулиновый модуль, входящий в нацеливающие участки T1 и T2, может содержать V-домен, выбранный из группы, включающей:

(I) V-домен антитела к HLA-A2, который содержит V_L -домен, содержащий SEQ ID NO: 78 и 79 (CDR 1 и 3) и DAS (CDR 2), и/или V_H -домен, содержащий SEQ ID NO: 75-77 (CDR 1-3);

(II) V-домен антитела к HLA-Cw6, который содержит V_L -домен, содержащий SEQ ID NO: 83 и 84 (CDR 1 и 3) и DDS (CDR 2), и/или V_H -домен, содержащий SEQ ID NO: 80-82 (CDR 1-3);

(III) V-домен антитела к EpCAM, который содержит V_L -домен, содержащий SEQ ID NO: 88 и 89 (CDR 1 и 3) и WAS (CDR 2), и/или V_H -домен, содержащий SEQ ID NO: 85-87 (CDR 1-3);

(IV) V-домен антитела к Her2, который содержит V_L -домен, содержащий SEQ ID NO: 93 и 94 (CDR 1 и 3) и SAS (CDR 2), и/или V_H -домен, содержащий SEQ ID NO: 90-92 (CDR 1-3);

(V) V-домен антитела к EGFR1, который содержит V_L -домен, содержащий SEQ ID NO: 98 и 99 (CDR 1 и 3) и DAS (CDR 2), и/или V_H -домен, содержащий SEQ ID NO: 95-97 (CDR 1-3);

(VI) V-домен антитела к CEA, который содержит V_L -домен, содержащий SEQ ID NO: 103 и 104 (CDR 1 и 3) и SAS (CDR 2), и/или V_H -домен, содержащий SEQ ID NO: 100-102 (CDR 1-3);

(VII) V-домен антитела к CD45, который содержит V_L -домен, содержащий SEQ ID NO: 107 и 108 (CDR 1 и 3) и LAS (CDR 2), и/или V_H -домен, содержащий SEQ ID NO: 105 и 106 (CDR 1 и 2) и CDR3 или SEQ ID NO: 132-134 (CDR 1-3);

(VIII) V-домен антитела к CD138, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 112 и 113 (CDR 1 и 3) и YTS (CDR 2), и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 109-111 (CDR 1-3); и

(IX) V-домен антитела к CD19, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 158 и 159 (CDR 1 и 3) и DAS (CDR 2), и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 155-157 (CDR 1-3).

Иммуноглобулиновый модуль, входящий в нацеливающий участок T1 и/или T2, может содержать V-домен, выбранный из группы, включающей:

(I) V-домен антитела к HLA-A2, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 52, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 51;

(II) V-домен антитела к HLA-Cw6, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 54, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 53;

(III) V-домен антитела к EpCAM, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 56, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 55;

(IV) V-домен антитела к Her2, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 58, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 57;

(V) V-домен антитела к EGFR1, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 60, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 59;

(VI) V-домен антитела к CEA, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 62, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 61;

(VII) V-домен антитела к CD45, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 64, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 63; и

(VIII) V-домен антитела к CD138, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 66, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 65;

(IX) V-домен антитела к CD19, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 153, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 152.

Иммуноглобулиновый модуль, входящий в нацеливающий участок T1 и/или T2, содержит V-домен, может содержать любую одну из SEQ ID NO: 67-74 и 154.

Кроме того, полипептид P1 может иметь общую структуру F1-T1 и/или полипептид P2 может иметь общую структуру F2-T2. F-фрагмент и T-участки могут быть разделены линкером (например, F1-линкер-T1 и/или F2-линкер-T2) и/или фланкированы дополнительным(ыми) аминокислотным(и) сегментом(ами) 1 и/или 2 (сегмент-F1-(линкер)-T1-сегмент2 и/или сегмент1-F2-(линкер)-T2-сегмент2). Предпочтительно, чтобы указанная выше общая структура простиралась от N-конца к C-концу полипептидов, т.е. N-F1-T1-C и/или N-F2-T2-C, N-F1-линкер-T1-C и/или N-F2-линкер-T2-C и N-сегмент1-F1-(линкер)-T1-сегмент2-C и/или N-сегмент1-F2-(линкер)-T2-сегмент2-C. В случае, когда нацеливающий участок представляет собой или содержит иммуноглобулиновый модуль I, типа Fv или scFv, полипептид P1 может иметь общую структуру F1-VH1-VL1 и/или полипептид P2 может иметь общую структуру F2-VH2-VL2, или полипептид P1 может иметь общую структуру F1-VL1-VH1, и/или полипептид P2 может иметь общую структуру F2-VL2-VH2. Также и в этих случаях F-фрагмент и T-участки могут быть разделены линкером (например, F1-линкер-VH/VL1-VL/VH1 и/или F2-линкер-VH/VL2-VL/VH2), и/или фланкированы дополнительным(и) аминокислотным(и) сегментом(ами) 1 и/или 2 (сегмент1-F1-(линкер)-VH/VL1-VL/VH1-сегмент2 и/или сегмент1-F2-(линкер)-VH/VL2-VL/VH2-сегмент2). В этом случае также предпочтительно, чтобы указанная выше общая структура простиралась от N-конца к C-концу полипептидов, т.е. N-F1-VH/VL1-VL/VH1-C и/или N-F2-VH/VL2-VL/VH2-C, N-F1-линкер-VH/VL1-VL/VH1-C, и/или N-F2-линкер-VH/VL2-VL/VH2-C и N-сегмент1-F1-(линкер)-VH/VL1-VL/VH1-сегмент2-C, и/или N-сегмент1-F2-(линкер)-VH/VL2-VL/VH2-сегмент2-C. Кроме того, линкер также может присутствовать между VH и VL или VL и VH.

Указанный выше линкер, в частности, расположенный между V-доменами, может содержать от 1 до 25 аминокислот, предпочтительно от 12 до 20 аминокислот, предпочтительно от 12 до 16 или от 15 до 20 аминокислот. Указанный выше линкер может содержать один или несколько мотивов (G₃S) и/или (G₄S), в частности 1, 2, 3, 4, 5 или 6 мотивов (G₃S) и/или (G₄S), предпочтительно 3 или 4 мотива (G₃S) и/или (G₄S), более предпочтительно 3 или 4 мотива (G₄S).

Указанный иммуноглобулиновый модуль II и указанный фрагмент F1 могут быть разделены линкером, который содержит от 1 до 12, предпочтительно от 3 до 12 аминокислот, и/или указанный иммуноглобулиновый модуль I2 и указанный фрагмент F2 разделены линкером, который содержит от 1 до 12, предпочтительно от 3 до 12 аминокислот.

V_L-домен модуля I1 может быть сцеплен с V_H-доменом модуля II с помощью линкера, который содержит от 12 до 25 аминокислот, предпочтительно линкера, имеющего последовательность (G₃S)₃ или (G₃S)₄, или (G₄S)₃, или (G₄S)₄ и/или V_L-домен модуля I2 сцеплен с V_H-доменом модуля I2 с помощью линкера, который содержит от 12 до 25 аминокислот, предпочтительно линкера, имеющего последовательность (G₃S)₃ или (G₃S)₄, или (G₄S)₃, или (G₄S)₄.

Как отмечалось ранее, линкер, указанный выше, может содержать мотивы (G₃S) и/или (G₄S). Альтернативные линкеры могут состоять из мотива GEGTSTGSGGSGGSGGAD или содержать его. Специалист в данной области может без дополнительных усилий найти и применять другие (пептидные) линке-

ры, известные в данной области.

Указанные дополнительные аминокислотные сегменты 1 и/или 2 могут состоять из 1-200, 1-100, 1-70, 1-65, 1-50, 1-25 или 1-20 аминокислот или содержать их.

Указанный антиген A1 и/или указанный антиген A2 могут представлять собой антиген, который экспрессируется на поверхности клеток опухоли или на поверхности прародителей/предшественников клеток опухоли, предпочтительно антиген, который экспрессируется на поверхности клеток гематологической опухоли, более предпочтительно антиген, который экспрессируется на поверхности клеток, выбранных из группы, включающей клетки острого миелолейкоза, клетки хронического миелолейкоза, клетки острого лимфолейкоза, клетки хронического лимфолейкоза, клетки лимфомы, клетки миелопролиферативного синдрома, клетки миелодиспластического синдрома, более предпочтительно клетки миеломы, или указанный антиген A1 и/или указанный антиген A2 может представлять собой антиген, который экспрессируется на поверхности клеток негематологической опухоли, предпочтительно клетки, выбранной из группы, включающей клетки ренальной карциномы, клетки рака мочевого пузыря, клетки рака легкого, клетки мезотелиомы, клетки рака предстательной железы, клетки рака головного мозга, клетки рака костного мозга, клетки саркомы, клетки рака мягких тканей, клетки рака яичника, клетки рака шейки матки, клетки рака молочной железы, клетки рака эндометрия, клетки рака матки, клетки опухоли из половых клеток, клетки анального рака, клетки ректальной карциномы, клетки карциномы ободочной кишки, клетки карциномы тонкого кишечника, клетки карциномы желудка, клетки гастроинтестинальной стромальной опухоли, клетки карциномы печени, клетки карциномы поджелудочной железы, клетки карциномы желчных протоков, клетки карциномы желчного пузыря, клетки рака головы и шеи, клетки гипорфаренгиального рака, клетки ларингеального рака, клетки рака пищевода, клетки рака кожи, предпочтительно клетки меланомы, клетки детского рака, клетки эндокринной опухоли, клетки карциноидной опухоли, клетки тимомы, клетки рака щитовидной железы, клетки опухоли из островковых клеток, клетки опухоли из клеток надпочечников, клетки нейроэндокринной опухоли и клетки рака неизвестной основы (рак неизвестного первоначального происхождения). Подробная информация об указанных видах рака указана в соответствующей литературе, такой как "Cancer Medicine", под ред. J.F. Holland, E. Frei, изд-во McGraw-Hill Professional, 8-е изд., 2010 и в процитированных в указанной публикации ссылках.

Комбинация антигена A1 и антигена A2 может присутствовать только на клетках крови или клетках-предшественниках клеток крови, предпочтительно только на одном типе клеток крови.

Комбинация антигена A1 и антигена A2 может присутствовать только на мишени, в частности, на раковых клетках, и отсутствовать (или присутствовать лишь в очень незначительных количествах) на клетках, которые не представляют собой клетки-мишени, в частности, не являются раковыми. Комбинация антигена A1 и антигена A2 может быть специфической для раковых клеток определенного типа рака.

Комбинация антигена A1 и антигена A2 позволяет отличать определенный тип клеток, предпочтительно определенный тип раковых клеток от любых других клеток.

"Определенный тип рака" в этом контексте может означать тип рака, характерный для одного и того же органа, в котором образуется рак, или предпочтительно тип рака, характеризующийся одной и той же парой (абберантных) антигенов A1 и A2.

Комбинация антигена A1 и антигена A2 может присутствовать на клетках-прародителях/предшественниках, которые представляют собой клетки-прародители/предшественники опухоли, но не представляют собой клетки-прародители/предшественники, которые не являются клетками-прародителями/предшественниками опухоли.

Указанный антиген A1 может представлять собой антиген, специфический для злокачественного статуса клетки, и указанный антиген A2 может представлять собой антиген, специфический в отношении клеточного типа или клеточной линии дифференцировки указанной клетки.

Так а) антиген A1 может представлять собой EpCAM (эпителиальная молекула клеточной адгезии), а антиген A2 представлять собой CD10 (кластер дифференцировки 10), HER2/neu (рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2), VEGF-R (рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста), EGFR (рецептор эпидермального фактора роста; который обозначают также как HER1 (рецептор эпидермального фактора роста 1) или ErbB1) или MDR (белок устойчивости ко многим лекарственным средствам), или

б) антиген A1 может представлять собой MCSP (меланома-ассоциированный хондроитин сульфат протеогликан), а антиген A2 - меланоферрин или EpCAM, или

в) антиген A1 может представлять собой CA125 (раковый антиген 125/углеводный антиген 125), а антиген A2 - CD227 (PEM (полиморфный эпителиальный муцин) или MUC1 (муцин-1)), или

г) антиген A1 может представлять собой CD56, а антиген A2 - CD140b (PDGFRP (рецептор тромбоцитарного фактора роста бета)) или ганглиозид GD3, или

д) антиген A1 может представлять собой EGFR, а антиген A2 - HER2, или

е) антиген A1 может представлять собой PSMA (специфический для простаты мембранный антиген), а антиген A2 - HER2, или

ж) антиген 1 может представлять собой сиалил-Льюис, а антиген 2 - EGFR, или

з) антиген 1 может представлять собой CD44, а антиген 2 - ESA (эпителиальный поверхностный антиген) (CD326, EpCAM), CD24, CD133, MDR (белок устойчивости ко многим лекарственным средствам) или CD117, или

и) антиген 1 может представлять собой CD34, а антиген 2 - CD19, CD79а, CD2, CD7, HLA-DR (человеческий лейкоцитарный антиген DR), CD13, CD117, CD33 или CD15, или

к) антиген 1 может представлять собой CD33, а антиген 2 - CD19, CD79а, CD2, CD7, HLA-DR (человеческий лейкоцитарный антиген DR), CD13, CD117 или CD15, или

л) антиген 1 может представлять собой MUC1, а антиген 2 - CD10, CEA или CD57, или

м) антиген 1 может представлять собой CD38, а антиген 2 - CD138, или

н) антиген 1 может представлять собой CD 24, а антиген 2 - CD29 или CD49f, или

о) антиген 1 может представлять собой угольную ангидразу IX, а антиген 2 - аквапорин, предпочтительно аквапорин-2.

Указанный антиген A1 и/или указанный антиген A2 можно выбирать из группы, включающей HLA-A (HLA-A, главный комплекс гистосовместимости, класса I, A (Homo sapiens); база данных Gene ID: 3105, модернизированная 13 января 2013 г.; DAQB-90C11.16-002; хромосома: 6; NC_000006.11 (29910247.29913661); для HLA-A2: 1. мПНК = LOCUS NM_001242758 = версия NM_001242758.1 GL337752169 = GenBank: AY191309.1 PRI 13-JAN-2013; 2. Белок = P79495 [UniParc]. Последняя модификация 1 мая 1997 г., версия 1.; для HLA-Cw6: мПНК = LOCUS HUMMHCCW6A = GenBank: VERSION M28160.1 GI:531197PRI (18 августа 1994 г.); белок = Q29963 (UniParc). Последняя модификация 22 августа 2003 г., версия 2.); EpCAM (EPICAM, эпителиальная молекула клеточной адгезии (Homo sapiens); обозначена также как ESA; KSA; M4S1; МК-1; DIAR5; EGP-2; EGP40; KS1/4; MIC18; TROP1; EGP314; HNPCC8; TACSTD1.; Gene ID: 4072, модернизированная 6 января 2013 г.; мПНК = ВЕРСИЯ NM_002354.2 GI:218505669PRI 6 января 2013 г.; белок = P16422 (UniParc). Последняя модификация 13 ноября, 2007 г., версия 2.); CD45 (PTPRC, протеинтирозинфосфатаза, рецептор тип, C (Homo sapiens); обозначена также как LCA; LY5; B220; CD45; L-CA; T200; CD45R; GP180; Gene ID: 5788, модернизированная 13 января 2013 г.; мПНК = версия NM_002838.4 GI:392307006 PRI 13-JAN-2013; белок = P08575-1 = изоформа 1, последняя модификация 19 июля 2003 г., версия 2.; белок = P08575-2 = изоформа 2); Her2 (ERBB2 v-erb-b2, вирусный гомолог онкогена эритробластного лейкоза 2, гомолог онкогена, выведенный из нейро/глиобластомы (птичьей) (Homo sapiens); обозначенный также как NEU; NGL; HER2; TKR1; CD340; HER-2; MLN 19; HER-2/neu; gene ID: 2064, модернизированная 13 января 2013 г.; мПНК-транскрипт, вариант 1 = версия NM_004448.2 GL54792095, PRI 06-JAN-2013; мПНК-транскрипт, вариант 2 = версия NM_001005862.1 GI:54792097, PRI 06-JAN-2013; белок = P04626-1 = изоформа 1, последняя модификация 13 августа 1987 г., версия 1.; белок = P04626-2 = изоформа 2; белок = P04626-3 = изоформа 3; белок = P04626-4 = изоформа 4); EGFR (EGFR, рецептор эпидермального фактора роста (Homo sapiens); обозначенный также как ERBB; HER1; mENA; ERBB1; PIG61; Gene ID: 1956, модернизированная 13 января 2013 г.; мПНК-транскрипт, вариант 1 = версия NM_005228.3 GI:41327737, PRI 13-JAN-2013; мПНК-транскрипт, вариант 2 = версия NM_201282.1 GI:41327731, PRI 13-JAN-2013; мПНК-транскрипт, вариант 3 = версия NM_201283.1 GI:41327733, PRI 13-JAN-2013; мПНК - транскрипт, вариант 4 = версия NM_201284.1 GI:41327735, PRI 13-JAN-2013; белок = P00533-1 = изоформа 1, последняя модификация 1 ноября 1997 г., версия 2; белок = P00533-2 = изоформа 2; белок = P00533-3 = изоформа 3; белок = P00533-4 = изоформа 4); CD138 (SDC1, синдекан 1 (Homo sapiens); Gene ID: 6382, модернизированная 6 января 2013 г.; мПНК-транскрипт, вариант 1 = версия NM_001006946.1 GL55749479, PRI 06-JAN-2013; мПНК-транскрипт, вариант 2 = версия NM_002997.4 GI:55925657, PRI 06-JAN-2013; белок = P18827 (UniParc). Последняя модификация 5 мая 2009 г., версия 3.); CEA (CEACAM5, родственная карциноэмбриональному антигену молекула клеточной адгезии 5 (Homo sapiens); обозначенная также как CEA; CD66e; Gene ID: 1048, модернизированная 13 января 2013 г.; мПНК = версия M004363.2 GI:98986444, PRI 13-JAN-2013; P06731, последняя модификация 11 января 2011 г., версия 3.); и CD19 (CD19, CD19-молекула (Homo sapiens); обозначенная также как B4; CVID3; Gene ID: 930, модернизированная 5 января 2013 г.; мПНК-транскрипт 1 = ВЕРСИЯ NM001178098.1 GI:296010920, PRI 06-JAN-2013; мПНК-транскрипт 2 = ВЕРСИЯ NM_001770.5 GI:296010919, PRI 06-JAN-2013; белок = P15391 (UniParc). Последняя модификация 13 ноября 2007 г., версия 6).

Кроме того, указанный антиген A1 и/или указанный антиген A2 может представлять собой антиген ГКГ, предпочтительно аллельный вариант любого из HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQ, HLA-DR или HLA-DM, более предпочтительно аллельный вариант молекулы ГКГ класса I, более предпочтительно аллельный вариант, выбранный из группы, включающей HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A25, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B35, HLA-B44, HLA-Cw3, HLA-Cw4, HLA-Cw6 и HLA-Cw7.

Указанный антиген A1 и/или указанный антиген A2 также может быть выбран из группы, включающей CD45, аквапорин, предпочтительно аквапорин-2, сквенджер-рецептор (рецептор - "уборщик мусора") класса V, представитель 1 (SCARB1), CD34, CD33, CD138, CD15, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD20, CD23, CD31, CD43, CD56, CD57, CD68, CD79а, CD146, синаптофизин, CD56, CD57, рецептор никотин-ацетилхолина, специфическую для мышц киназу (MUSK), потенциализируемый кальциевый канал (P/Q-типа), потенциалзависимый калиевый канал (VGKC), N-метил-D-аспаратный рецептор

(NMDA), рецептор TSH (тиреотропный гормон), амфифизин, HerPar-1, ганглиозид GQ1B, ганглиозид GD3, ганглиозид GM1 и гликофорин-А.

Например, указанный антиген А1 может представлять собой антиген ГКГ, а указанный антиген А2 - специфический для определенного клеточного типа или клеточной линии дифференцировки.

Указанный функциональный домен F может представлять собой иммуноглобулиновый модуль, предпочтительно scFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент) антитела, более предпочтительно Fv (вариабельный фрагмент) антитела, или флуоресцентную молекулу, предпочтительно молекулу, участвующую в бимолекулярной флуоресцентной комплементации, предпочтительно GFP или вариант GFP, или молекулу, которая обладает способностью опосредовать биолюминесценцию, предпочтительно молекулу люциферазы, более предпочтительно люциферазы Gaussia.

Указанный функциональный домен F может специфически связывать или обладать способностью к специфическому связыванию с антигеном. При этом указанный антиген может представлять собой антиген, который присутствует на клетках иммунной системы человека. Указанное связывание может активировать указанные клетки иммунной системы человека.

Указанный функциональный домен F может быть доменом привлечения Т-клеток (активирующий Т-клетки домен), предпочтительно доменом привлечения Т-клеток, который специфически связывается с CD2, CD3, CD5, Т-клеточным рецептором или CD28, более предпочтительно доменом привлечения Т-клеток, который специфически связывается с CD3s, доменом привлечения НК-клеток (естественная клетка-киллер), предпочтительно доменом привлечения НК-клеток, который специфически связывается с CD1a, CD16a или CD56, доменом привлечения макрофага, предпочтительно доменом привлечения макрофага, специфически связывающийся с C16a, CD32a, CD32b, CD89 или CD64, доменом привлечения моноцита, предпочтительно доменом привлечения моноцита, который специфически связывается с CD32a, CD32b, CD64 или CD89, доменом привлечения гранулоцита, предпочтительно доменом привлечения гранулоцита, который специфически связывается с CD16b, CD32a, CD32b, CD64 или CD89, доменом привлечения нейтрофильного гранулоцита, предпочтительно доменом привлечения нейтрофильного гранулоцита, который специфически связывается с CD89 (Fc α RI), или доменом привлечения активированного нейтрофильного гранулоцита, моноцита и/или макрофага, предпочтительно доменом привлечения активированного нейтрофильного гранулоцита, моноцита и/или макрофага, который специфически связывается с CD64 (Fc γ RI).

Указанный функциональный домен F может представлять собой домен, который специфически связывается с антигеном, сцепленным с диагностическим или терапевтическим соединением.

Указанный функциональный домен F может представлять собой домен, который специфически связывается с молекулой-носителем или аффинной меткой (метка по средству). Предпочтительно указанная молекула-носитель сцеплена с диагностическим или терапевтическим соединением. Предпочтительно указанная аффинная метка сцеплена с диагностическим или терапевтическим соединением.

Предпочтительно указанную аффинную метку выбирают из группы, включающей FLAG-метку, тус-метку, глутатион-S-трансферазную (GST)-метку, гемагглютининовую (HA)-метку, полигистидиновую (His)-метку, диоксигениновую (DIG)-метку и метку, представляющую собой связывающий мальтозу белок (MBP).

Предпочтительно указанная молекула-носитель представляет собой пептидную или углеводную молекулу. Указанный функциональный домен F может представлять собой домен, который специфически связывается с молекулой-носителем, предпочтительно молекулой-носителем, которая сцеплена с диагностическим или терапевтическим соединением, где указанную молекулу-носитель выбирают из группы, включающей желатин, инулин, декстран и гидроксипропилкрахмал.

Указанное терапевтическое соединение может представлять собой радиоактивное соединение, предпочтительно радиоактивное соединение, содержащее ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, ¹³¹I, ³²P, ¹⁰B или ²¹³Bi. Указанное терапевтическое соединение может представлять собой токсин. Предпочтительно указанный токсин выбирают из группы, включающей фактор отека В, anthracis, летальный фактор В. anthracis, иота-токсин С. perfringens, С2-токсин С. botulinum, АДФ-рибозилтрансферазу С. difficile, фрагмент А дифтерийного токсина С. diphtheriae, шига-токсин Burgholderia sp. (субъединица А), токсин рfо А перфринголизин О из Clostridium perfringens str. 13, цепь А рицина, растительный RIP (рибосом-инактивирующий белок) буганин, человеческую рибонуклеазу RNASE3 (PHКаза А, семейство, 3) и эндопептидазу летального фактора возбудителя сибирской язвы. Другим примером токсина является (но, не ограничиваясь только им) токсин, который имеет или содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 160-168.

Указанное диагностическое соединение может представлять собой радиоактивное соединение, предпочтительно радиоактивное соединение, содержащее ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁸²Rb или ²⁰¹Tl. Указанное диагностическое соединение может представлять собой флуоресцентное соединение, предпочтительно GFP, вариант GFP или флуоресцентное низкомолекулярное соединение, такое как ФИТЦ (флуоресцеинизотиоцианат), ФЭ (фикоэритрин), краситель alexa fluog (такой как AlexaFluog488 или аналогичные красители) или цианиновый краситель (такой как Cy3 (индокарбоцианин) или Cy5 (индодикарбоцианин) или

аналогичные красители). Указанное диагностическое соединение также может представлять собой молекулу, которая обладает способностью опосредовать биолюминесценцию, предпочтительно молекулу люциферазы, более предпочтительно люциферазы *Gaussia*.

Указанный фрагмент F1 может содержать V_L-домен антитела, а указанный фрагмент F2 - V_H-домен этого же антитела, где предпочтительно указанное антитело представляет собой антитело к CD3, более предпочтительно антитело к CD3ε, или антитело к His, или антитело к DIG, или указанный фрагмент F1 может содержать V_H-домен антитела, и указанный фрагмент F2 - V_L-домен этого же антитела, где предпочтительно указанное антитело представляет собой антитело к CD3, более предпочтительно антитело к CD3ε, или антитело к His, или антитело к DIG.

V_L- и V_H-домены, которые могут входить в F1- и P2-фрагмент соответственно, или в F2- и F1-фрагмент соответственно, могут также быть получены из двух различных антител, либо специфических в отношении одного и того же антигена (и одного и того же или различных эпитопов), либо в отношении различных антигенов. Например, для этого можно создавать новые спецификации (например, подходы на основе фагового дисплея).

Иммуноглобулиновый модуль, который входит в F-домен, может содержать V-домен, выбранный из группы, включающей:

(I) V-домен антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 18-20 (CDR 1-3), и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 15-17 (CDR 1-3);

(II) V-домен антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 24-26 (CDR 1-3), и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 21-23 (CDR 1-3);

(III) V-домен антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 30-32 (CDR 1-3), и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 27-29 (CDR 1-3);

(IV) V-домен антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 36 и 37 (CDR 1 и 3) и DTS (CDR 2), и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 33-35 (CDR 1-3);

(V) V-домен антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 41 и 42 (CDR 1 и 3) и YTN (CDR 2), и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 38-40 (CDR 1-3); и

(VI) V-домен антитела к His, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 46 и 47 (CDR 1 и 3) и KVS (CDR 2), и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 43-45 (CDR 1-3);

(VII) V-домен антитела к DIG, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 50 и 131 (CDR 1 и 3) и YSS (CDR 2), и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 48 и 49 (CDR 1 и 2) и A (CDR 3).

Иммуноглобулиновый модуль, который входит в F-домен, может содержать V-домен, выбранный из группы, включающей:

(I) V-домен антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 2, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 1;

(II) V-домен антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 4, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 3;

(III) V-домен антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 6, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 5;

(IV) V-домен антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 8, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 7;

(V) V-домен антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 10, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 9; и

(VI) V-домен антитела к His, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 1 2, и/или V_H-домен SEQ ID NO: 11;

(VII) V-домен антитела к DIG, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 14, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 30.

Функциональный домен F может представлять собой домен, который специфически связывается с молекулой токсина, предпочтительно молекулой токсина, которая сама не способна проникать через клеточную мембрану человеческой клетки, и поэтому предпочтительно она интернализуется в человеческую клетку после ассоциации с клеточной мембраной указанной клетки, при этом предпочтительно указанная ассоциация с клеточной мембраной указанной клетки опосредуется специфическим связыванием с гетеродимером, образованным двумя молекулами, предпочтительно двумя молекулами, ассоциированными с указанной клеточной мембраной, где предпочтительно указанные две молекулы представляют собой полипептиды P1 и P2, указанные в настоящем описании. Функциональный домен F может представлять собой домен, который специфически связывается с A-компонентом (активный компонент) бактериального двухкомпонентного токсина А-В. Функциональный домен F, кроме того, может представлять собой домен, который специфически связывается с токсином, выбранным из группы, включающей фактор отека *B. anthracis*, летальный фактор *B. anthracis*, иота-токсин *C. perfringens*, C2-токсин *C. botulinum*, АДФ-рибозилтрансферазу *C. difficile*, фрагмент А дифтерийного токсина *C. diphtheriae*, шига-токсин *Burg-holderia* sp. (субъединица А), токсин pfoA перфринголизин О из *Clostridium perfringens* str. 13, цепь А

рицина, растительный RIP буганин, человеческую рибонуклеазу RNASE3 (PHКаза А, семейство, 3) и эндопептидазу летального фактора возбудителя сибирской язвы. Другим примером токсина, является (но, не ограничиваясь только им) токсин, который имеет или содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 160-168.

Функциональный домен F также может представлять собой домен, который специфически связывается с флуоресцентной молекулой, предпочтительно флуоресцентной молекулой, которая сама не обладает способностью проникать через клеточную мембрану человеческой клетки. Предпочтительно указанная флуоресцентная молекула представляет собой GFP, вариант GFP, или молекулу, которая представляет собой или содержит флуоресцентное низкомолекулярное соединение, такое как ФИТЦ (флуоресцеинизотиоцианат), ФЭ (фикоэритрин), краситель alexa fluor (такой как AlexaFluor488 или аналогичные красители) или цианиновый краситель (такой как Cy3 (индокарбоцианин) или Cy5 (индодикарбоцианин) или аналогичные красители).

Указанный функциональный домен F может представлять собой домен, который специфически связывается с молекулой, которая обладает способностью опосредовать биолюминесценцию, предпочтительно молекулой люциферазы, более предпочтительно люциферазы Gaussia.

А также указанный функциональный домен F может представлять собой флуоресцентную молекулу, предпочтительно молекулу, участвующую в бимолекулярной флуоресцентной комплементации, более предпочтительно GFP или вариант GFP, такой как YFP, CFP, Venus или Cerulean.

Примерами конкретных полипептидов P1 или P2, входящих в набор полипептидов, могут быть полипептиды, которые содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 114-129 и 197.

Итак, указанный набор полипептидов может представлять собой набор полипептидов, предназначенный для применения при лечении пациента, страдающего опухолью или раком, или для диагностического применения на пациенте, страдающем опухолью или раком, предпочтительно для применения при лечении пациента, который страдает опухолью или раком и подвергается аллогенной трансплантации ткани или клетки, или предполагается, что будет подвергаться указанной трансплантации, или для диагностического применения на пациенте, который страдает опухолью или раком и подвергается или предполагается, что будет подвергаться аллогенной трансплантации ткани или клетки, где предпочтительно указанный набор полипептидов вводят указанному пациенту.

Примерами опухолей, которые можно лечить или диагностировать, являются опухоли, для которых описаны выше опухолевые или раковые клетки касательно антигенов A1 и/или A2.

При этом указанное лечение может включать элиминацию у реципиента ткани/клеток определенного клеточного типа, предпочтительно ракового типа клеток, или клеток-предшественников в организме реципиента, которые превращаются в клетки определенного клеточного типа, предпочтительно клетки ракового типа, необязательно после трансплантации или параллельно с трансплантацией реципиенту донорских тканей/клеток указанного того же самого клеточного типа или донорских клеток-предшественников, которые превращаются в указанный тот же самый клеточный тип.

Набор полипептидов может быть предназначен для применения в процедуре аллогенной трансплантации при гематопозитических неоплазиях, например, при несовместимых антигенах HLA, в частности для применения в терапевтическом подходе к указанной связанной с несовместимостью ситуации. В этой приведенной в качестве примера ситуации двойная информация о гаплотипе HLA пациента (HLA_{пациента}) и происхождении линии дифференцировки гематопозитических клеток (CD45) отображается исключительно на лейкозных бластных клетках и других гематопозитических клетках пациента. Все другие клетки, полученные из организма реципиента, экспрессируют гаплотип реципиента, но не гаплотип гематопозитической клеточной линии дифференцировки, маркером которой является антиген CD45 (например, негематопозитические клетки реципиента являются позитивными по HLA-A2, но негативными по CD45). Аналогично этому, все гематопозитические клетки донора экспрессируют молекулы гаплотипа HLA, это означает, что они являются CD45-позитивными, но HLA-A2-негативными в ситуации несовместимой трансплантации, когда пациент, но не донор является позитивным по HLA-A2. Таким образом, возможно получение бимолекулярных и способных к комплементации конструкций одноцепочечных антител к HLA-A2 в случаях, когда пациент, но не донор является HLA-A2-позитивным, и второй конструкции, специфической в отношении маркера гематопозитической клеточной линии дифференцировки CD45, специфической мишенью которой являются все гематопозитические клетки пациента, включая гематологические неоплазмы. Таким образом, первый полипептид P1 может содержать конструкцию, включающую одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела к HLA пациента (нацеливающий участок T1), слитую с V_L-фрагментом F1 антитела к CD3 (например, фрагментом F1). Второй полипептид P2 может содержать конструкцию, включающую одноцепочечный вариабельный фрагмент, специфическую в отношении маркера гематопозитической клеточной линии дифференцировки (например, CD45; нацеливающий участок T2), слитую с расщепленным V_H-фрагментом F2 антитела к CD3-Fv (фрагмент F2).

Указанная элиминация включает разрушение ткани/клеток или клеток-предшественников указанного пациента клетками иммунной системы, токсином или радиоактивным соединением.

Указанный набор полипептидов может представлять собой набор полипептидов для диагностиче-

ского применения на пациенте, которого подвергают аллогенной трансплантации ткани или клетки, где предпочтительно указанный пациент представляет собой пациента, страдающего опухолью.

Итак, указанное диагностическое применение может включать специфическую детекцию клеток реципиента определенного клеточного типа или клеточной линии, дифференцировку клеток реципиента другого клеточного типа или другой клеточной линии, дифференцировку клеток донора такого или другого типа или дифференцировку клеточной линии.

Указанное диагностическое применение может включать специфическую детекцию клеток реципиента, которые являются злокачественными клетками, среди клеток реципиента, которые не являются злокачественными, и среди клеток донора. Причем указанный набор полипептидов вводят пациенту.

Предпочтительно указанный пациент представляет собой млекопитающее, более предпочтительно представляет собой человека.

Указанное введение можно осуществлять посредством болюсного введения или посредством непрерывного введения.

Полипептиды P1 и P2 из указанного набора полипептидов можно вводить параллельно. Полипептиды P1 и P2 из указанного набора полипептидов можно вводить последовательно.

Один из полипептидов P1 или P2 из указанного набора полипептидов можно ввести посредством болюсного введения, а другой - посредством непрерывного введения.

Количество вводимого полипептида, при этом, может составить от 0,5 до 500 мкг/м² в день для полипептида P1 или для полипептида P2, или для каждого из полипептидов P1 и P2, предпочтительно - от 5 до 200 мкг/м² в день для полипептида P1 или для полипептида P2 или для каждого из полипептидов P1 и P2, более предпочтительно - от 10 до 80 мкг/м² в день для полипептида P1 или для полипептида P2 или для каждого из полипептидов P1 и P2.

Количество вводимого полипептида примерно составляет от 0,05 до 0,5 мкг/м² в день для полипептида P1 или для полипептида P2, или для каждого из полипептидов P1 и P2.

Количество вводимого полипептида P1 может отличаться от количества вводимого полипептида P2. Количество вводимого полипептида может составлять от 0,5 до 50 мкг/м² в день для полипептида P1 или для полипептида P2, или для каждого из полипептидов P1 и P2. Количество вводимого полипептида может составлять от 50 до 100 мкг/м² в день для полипептида P1 или для полипептида P2, или для каждого из полипептидов P1 и P2. Количество вводимого полипептида может составлять от 100 до 200 мкг/м² в день для полипептида P1 или для полипептида P2, или для каждого из полипептидов P1 и P2. Количество вводимого полипептида может составлять от 200 до 300 мкг/м² в день для полипептида P1 или для полипептида P2, или для каждого из полипептидов P1 и P2. Количество вводимого полипептида может составлять от 300 до 400 мкг/м² в день для полипептида P1 или для полипептида P2, или для каждого из полипептидов P1 и P2. Количество вводимого полипептида может составлять от 400 до 500 мкг/м² в день для полипептида P1 или для полипептида P2, или для каждого из полипептидов P1 и P2. Количество вводимого полипептида может составлять от 500 мкг/м² в день до 1 мг/м² в день для полипептида P1 или для полипептида P2, или для каждого из полипептидов P1 и P2.

Дополнительные отправные точки для определения количества полипептидов P1 и P2, которое следует вводить, можно получать также с учетом экспертных исследований, осуществленных с использованием конструкций биспецифических антител (например, см. Bargou R. и др., *Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody*, 321(5891), 2008, с. 974-977; и Topp M.S. и др., *Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab of chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolonged leukemia-free survival*. *J. Clin Oncol.*, 29, 2011, с. 2493-2498).

Причем указанное введение можно осуществлять постоянно в течение по меньшей мере 12 ч или по меньшей мере в течение 1 дня, или по меньшей мере в течение 2 дней, или по меньшей мере в течение 3 дней, или по меньшей мере в течение 4 дней, или по меньшей мере в течение 5 дней, или по меньшей мере в течение 6 дней, или по меньшей мере в течение 7 дней, или по меньшей мере в течение 8 дней, или по меньшей мере в течение 9 дней, или по меньшей мере в течение 10 дней, или по меньшей мере в течение 11 дней, или по меньшей мере в течение 12 дней, или по меньшей мере в течение 13 дней, или по меньшей мере в течение 14 дней, или по меньшей мере в течение 15 дней, или по меньшей мере в течение 16 дней, или по меньшей мере в течение 17 дней, или по меньшей мере в течение 18 дней, или по меньшей мере в течение 19 дней, или по меньшей мере в течение 20 дней, или по меньшей мере в течение 21 дня, или по меньшей мере в течение 22 дней, или по меньшей мере в течение 23 дней, или по меньшей мере в течение 24 дней, или по меньшей мере в течение 25 дней, или по меньшей мере в течение 26 дней, или по меньшей мере в течение 27 дней, или по меньшей мере в течение 28 дней, или по меньшей мере в течение 29 дней, или по меньшей мере в течение 30 дней, или по меньшей мере в течение 5 недель, или по меньшей мере в течение 6 недель.

Указанное введение указанного набора полипептидов или одного из полипептидов из указанного набора полипептидов можно осуществлять внутривенно, предпочтительно посредством внутривенной инъекции.

Указанное введение указанного набора полипептидов или одного из полипептидов из указанного

набора полипептидов может осуществлять подкожно, предпочтительно посредством подкожной инъекции.

Указанный набор полипептидов можно вводить в сочетании с одним или несколькими лекарственными средствами, выбранными из группы, включающей иммуномодулирующее лекарственное средство и/или стероид, предпочтительно преднизолон или преднизон.

Указанный набор полипептидов можно вводить в сочетании с радиоактивным соединением, предпочтительно радиоактивным соединением, сцепленным с антигеном, молекулой-носителем или аффинной меткой, при этом указанное радиоактивное соединение, указанный антиген, указанная молекула-носитель или указанная аффинная метка специфически связывается с указанным функциональным доменом F.

Указанный набор полипептидов можно также вводить в сочетании с токсином, предпочтительно токсином, сцепленным с антигеном, молекулой-носителем или аффинной меткой, при этом указанный токсин, указанный антиген, указанная молекула-носитель или указанная аффинная метка специфически связывается с указанным функциональным доменом F.

Указанный набор полипептидов можно вводить в сочетании с флуоресцентной молекулой, предпочтительно флуоресцентной молекулой, сцепленной с антигеном, молекулой-носителем или аффинной меткой, при этом указанный флуорофор, указанный антиген, указанная молекула-носитель или указанная аффинная метка специфически связывается с указанным функциональным доменом F.

Указанный функциональный домен F может представлять собой домен, который специфически связывается с антигеном, который не распознается в качестве чужеродного иммунной системой указанного пациента, которому вводят указанный набор полипептидов.

Два набора полипептидов, указанных выше (первый набор полипептидов и второй набор полипептидов) можно вводить одновременно или последовательно. Причем указанный первый набор полипептидов может иметь фрагменты F1 и F2, которые отличаются от фрагментов из указанного второго набора полипептидов. Указанный первый набор полипептидов также может иметь такие же фрагменты F1 и F2, что и второй указанный набор полипептидов. Нацеливающие участки T1 и T2 из указанного первого набора полипептидов могут связываться с теми же антигенами, что и нацеливающие участки T1 и T2 из указанного второго набора полипептидов. А также нацеливающие участки T1 и T2 из указанного первого набора полипептидов могут связываться с антигенами, отличными от тех, с которыми связываются нацеливающие участки T1 и T2 из указанного второго набора полипептидов.

Указанный пациент может подвергаться противораковому лечению до начала лечения указанным набором полипептидов, где указанное противораковое лечение предпочтительно представляло собой химиотерапию, лучевую терапию или оперативное удаление опухоли, или подвергаться противораковому лечению параллельно с лечением указанным набором полипептидов, где указанное противораковое лечение предпочтительно представляет собой химиотерапию, лучевую терапию или оперативное удаление опухоли.

Указанный набор полипептидов или один из полипептидов из указанного набора полипептидов можно получать с помощью прокариотической или эукариотической экспрессионной системы или *de novo* с помощью пептидного синтеза.

Указанный набор полипептидов или один из полипептидов из указанного набора полипептидов можно создавать в организме указанного пациента путем экспрессии белка с нуклеиновой кислоты, интродуцированной в организм указанного пациента.

Большое количество пациентов страдает аллергическими или аутоиммунными заболеваниями. Во многих таких случаях клональная В-клеточная популяция продуцирует "сбившееся с пути" антитело, которое вступает в реакцию с антигенами, которые экспрессируются в тканях пациента, или образуют комплекс с аллергеном, вызывая анафилактические реакции. В обоих случаях требуется специфически элиминировать "сбившийся с пути" В-клеточный клон.

Для этой цели можно модифицировать комбинаторную систему таким образом, чтобы одно плечо (P1 или P2, в частности, T1 или T2) распознавало ассоциированный с В-клетками антиген (например, CD19, CD20, CD38 или CD138), а другое плечо (P2 или P1, в частности, T2 или T1 соответственно) представляло собой аллерген или субстрат, связанный с антителом, которое вызывает аутоиммунное заболевание. Когда эти две конструкции связываются с В-клеткой, которая представляет собой CD19- (CD20-, CD38- или CD138)-позитивную клетку и одновременно экспонирует на своей поверхности клонотипическое антитело, то присоединенные V_H и V_L антитела к CD3 могут взаимодействовать и реконструировать сайт связывания CD3 точно на В-клетке. Указанная аллергенспецифическая или антигенспецифическая сборка должна приводить в конце концов к клональному истощению В-клеток-мишеней.

Таким образом, любой из указанных антигенов A1 и A2 может представлять собой также клонотипическое антитело, находящееся на поверхности В-клетки, в частности, В-клетки, которая вызывает аутоиммунное нарушение.

В этом контексте, например, один из указанных антигенов A1 и A2 может представлять собой CD19, а другой может представлять собой клонотипическое антитело на поверхности В-клетки, в частности В-клетки, которая вызывает аутоиммунное нарушение.

Любой один из указанных нацеливающих участков T1 и T2 может содержать аллерген или субстрат, который связывается с клонотипическим антителом на поверхности В-клетки, и/или который после связывания с клонотипическим антителом может вызывать аутоиммунное нарушение. Примерами аллергенов, входящих в любой один из указанных нацеливающих участков T1 и T2, являются (но, не ограничиваясь только ими) аллергены-волосы, типа, например, собачьего волоса, кошачьего волоса (например, Fel d 1, Feld d1A, Feld d1B) или аллергены-волосы морских свинок, или пыльцевые аллергены, типа например, пыльцевых аллергенов березы, трав. Другими примерами являются (но, не ограничиваясь только ими) аллергены клещей (домашней пыли) (например, Tug p 2, Der P1, Der f 2), кошачьи аллергены (например, Fel d 1, Feld d1A, Feld d1B), аллергены арахиса (например, конглоутин-7 (Conglutin-7)), аллергены грибов, вызывающих гнили (например, Alt a 1), собачьи аллергены (например, Can f 1), аллергены спру пшеницы (например, альфа/бета-глиадин), аллергены рыжего таракана (например, вариант аллергена Bla g 1.02), аллергены растения березы или (главным образом) аллергены пыльцы березы (например, Суп d 1, Pha a 1, Dac g 3, Phl p 2, Phl p 1, профилин (Profilin), Bet v 1-L, Bet v 1-A), основные аллергены яблок (например, Mal d 1), аллергены коровьего молока (например, альфа-лактальбумин, альфа-S1-казеин), аллергены куриного яйца (например, лизоцим С, овальбумин) и аллергены лошадей (например, латерин, Equ c 1) и т.п. В дополнительном примере аллерген, входящий в любой один из указанных нацеливающих участков T1 и T2, представляет собой антиген человеческой клеточной линии миеломы U266 антитела IgE-ND. В другом дополнительном примере аллерген, входящий в любой один из указанных нацеливающих участков T1 и T2, представляет собой или содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 169-195.

Набор полипептидов предназначен для лечения или предупреждения нарушения, выбранного из группы, включающей:

- (I) аутоиммунные нарушения и
- (II) связанные с гиперчувствительностью нарушения.

Примерами аутоиммунных нарушений, которые можно лечить или предупреждать, являются (но, не ограничиваясь только ими) нарушения, выбранные из группы, включающей:

- (I) аллергические нарушения;
- (II) рассеянный склероз;
- (III) псориаз;
- (IV) системную красную волчанку;
- (V) синдром Шегрена;
- (VI) ревматоидный артрит;
- (VII) идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру;
- (VIII) диабет;
- (IX) васкулит;
- (X) болезнь Крона и
- (XI) амилоидоз.

Конкретными примерами связанных с гиперчувствительностью нарушений, которые можно лечить или предупреждать, являются (но, не ограничиваясь только ими), нарушения, выбранные из группы, включающие аллергии (реакция гиперчувствительности типа I согласно классификации Кумбса и Гелла), антителозависимая цитотоксическая реакция (реакция гиперчувствительности типа II), болезнь иммунных комплексов (реакция гиперчувствительности типа III), гиперчувствительность замедленного типа (реакция гиперчувствительности типа IV) и опосредованное рецептором аутоиммунное заболевание (реакция гиперчувствительности типа V).

Указанное аутоиммунное или связанное с гиперчувствительностью нарушение является следствием или запускается аллогенной трансплантацией стволовых клеток (т.е. связано с нарушением гиперчувствительности типа I-типа V согласно классификации Кумбса и Гелла).

Многие клетки, которые инфицируются патогеном (например, вирусом типа, например, ВИЧ, EBV, CMV), экспрессируют кодируемые патогеном белки на своей клеточной поверхности. Таким образом, любой из указанных антигенов A1 и A2 может также представлять собой такой кодируемый патогеном белок, например, типа белка ВИЧ, EBV или CMV, на поверхности клетки. Набор полипептидов предназначен для применения при лечении или предупреждении инфекционного заболевания, например, вирусного инфекционного заболевания. Конкретные примеры кодируемых патогенами белков можно почерпнуть на сайте <http://www.uniprot.org/uniprot/>, и они представляют собой gp120 ВИЧ(Q78706); LMP-2 EBV (P13285); gB CMV (P06473); HBS HBV (Q9JG36); E1 HCV (C4B751); E2 HCV (Q6TRB1); HAAdV-2 человеческого аденовируса С серотипа 2.

Молекула нуклеиновой кислоты или набор молекул нуклеиновых кислот может содержать одну или несколько нуклеотидных последовательностей, представленных в любой одной из SEQ ID NO: 135-150 и 196.

Указанный набор полипептидов могут входить в указанный комплект, т.е. может находиться в одном флаконе или в разных флаконах.

Один или несколько полипептидов из указанного набора полипептидов могут входить в указанный

комплект, высушенный сушкой вымораживанием.

Один или несколько полипептидов из указанного набора полипептидов могут входить в указанный комплект, т.е. находиться в растворе.

В контексте настоящего изобретения предполагается лечение пациента, который страдает:

(I) опухолью или раком и/или подвергается аллогенной трансплантации клетки или ткани;

(II) аутоиммунным нарушением; или

(III) связанным с гиперчувствительностью нарушением.

Указанный способ может включать стадии, на которых:

получают набор полипептидов, где указанный набор полипептидов содержит

первый полипептид P1, который содержит:

(I) нацеливающий участок T1,

где указанный нацеливающий участок T1 специфически связывается с антигеном A1, и

(II) фрагмент F1 функционального домена F,

где ни сам указанный фрагмент F1, ни сам указанный полипептид P1 не обладает функцией, соответствующей функции указанного домена F, и

второй полипептид P2, который содержит:

(I) нацеливающий участок T2,

где указанный нацеливающий участок T2 специфически связывается с антигеном A2, и указанный антиген A2 представляет собой молекулу клеточной поверхности, которая является специфической для определенного клеточного типа или клеточной линии дифференцировки, и

(II) фрагмент F2 функционального домена F,

где ни сам указанный фрагмент F2, ни сам указанный полипептид P2 не обладают функцией, соответствующей функции указанного домена F,

где указанный антиген A1 отличается от указанного антигена A2,

где указанный полипептид P1 и указанный полипептид P2 не ассоциируются друг с другом в отсутствии субстрата, который содержит оба антигена A1 и A2 на своей поверхности, более конкретно клетки, которая несет оба антигена A1 и A2 на своей клеточной поверхности, и

где после димеризации указанного фрагмента F1 указанного полипептида P1 с указанным фрагментом F2 указанного полипептида P2 образовавшийся в результате димер приобретает функцию, соответствующую функции указанного домена F;

вводят указанный набор полипептидов указанному пациенту.

В контексте настоящего описания понятие "полипептид" относится к линейной молекулярной цепи аминокислот, содержащей более 30 аминокислот. Необязательно полипептид может включать один или несколько дисульфидных мостиков или быть химически модифицирован. Кроме того, необязательно небелковый элемент (такой как флуорофор, РНК-аптамер, ДНК-аптамер или малая молекула) может быть присоединен к указанной линейной молекулярной цепи аминокислот. Указанные полипептиды можно получать любым известным методом. Полипептид можно получать, например, путем экспрессии из нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный полипептид, или его можно синтезировать методами твердофазного синтеза или получать путем конъюгации или связывания существующих молекул, например, с помощью химической связи.

В контексте настоящего описания понятие "полипептид P1" относится к полипептиду, который содержит (I) нацеливающий участок, где указанный нацеливающий участок специфически связывается с антигеном, и (II) фрагмент функционального домена, где ни сам указанный фрагмент, ни сам указанный полипептид P1 не обладают функцией, соответствующей функции указанного функционального домена. В контексте настоящего описания понятие "полипептид P2" относится к полипептиду, который содержит (I) нацеливающий участок, где указанный нацеливающий участок специфически связывается с антигеном, и (II) фрагмент функционального домена, где ни сам указанный фрагмент, ни сам указанный полипептид P2 не обладает функцией, соответствующей функции указанного функционального домена. В контексте настоящего описания понятие "домен" относится к линейной молекулярной цепи аминокислот, которая включает аминокислотную последовательность полного полипептида или части полипептида. Необязательно домен может включать один или несколько дисульфидных мостиков или быть химически модифицирован. Кроме того, необязательно домен может содержать небелковый элемент (такой как флуорофор). Однако в данном изобретении под понятие "домен" не подпадают соединения, которые являются химически модифицированными или содержат небелковый(ые) элемент(ы).

В контексте настоящего описания понятие "функциональный домен" означает домен, который обладает способностью осуществлять определенную функцию, такую как специфическое связывание с определенным партнером по связыванию или антигеном, специфическая активация определенного рецептора, опосредование токсических действий или флуоресценция после возбуждении светом с соответствующей длиной волны.

Предпочтительно подразумевается, что "функциональный домен F" включает также небелковые соединения. Однако в изобретении оно относится к белковому соединению или его функциональной области.

В контексте настоящего описания понятие "фрагмент домена" относится к линейной молекулярной цепи аминокислот, которая соответствует части домена, но не полному домену. Необязательно фрагмент домена может включать один или несколько дисульфидных мостиков или может быть химически модифицированным. Кроме того, необязательно домен может содержать небелковый элемент или часть указанного небелкового элемента.

В контексте настоящего описания понятие "фрагмент F1" относится к фрагменту функционального домена. В контексте настоящего описания понятие "фрагмент F2" относится к фрагменту функционального домена.

В контексте настоящего описания парные сокращения P1, P2; T1, T2; F1, F2; A1, A2; и I1, I2 применяются для обозначения различных полипептидов, нацеливающих участков, фрагментов, антигенов иммуноглобулиновых модулей соответственно. Они являются синонимами понятиям первый полипептид, второй полипептид; первый нацеливающий участок, второй нацеливающий участок; первый фрагмент, второй фрагмент; первый антиген, второй антиген; и первый иммуноглобулиновый модуль, второй иммуноглобулиновый модуль соответственно.

В контексте настоящего описания понятие "участок" относится к линейной молекулярной цепи аминокислот, которая включает аминокислотную последовательность полного полипептида или части полипептида. Необязательно участок может включать один или несколько дисульфидных мостиков или может быть химически модифицированным. Кроме того,

необязательно участок может содержать небелковый элемент (такой как олигонуклеотид). Однако в изобретении под понятие "участок" не подпадают соединения, которые являются химически модифицированными или содержат небелковый(ые) элемент(ы).

В контексте настоящего описания понятие "нацеливающий участок T1" означает участок, который специфически связывается с антигеном, например, антигеном A1. В контексте настоящего описания понятие "нацеливающий участок T2" означает участок, который специфически связывается с антигеном, например, антигеном A2.

В контексте настоящего описания понятие "линкер" означает последовательность аминокислот внутри полипептида, которая соединяет две части указанного полипептида или два домена, содержащихся в указанном полипептиде.

В контексте настоящего изобретения понятие "молекула нуклеиновой кислоты" означает линейную молекулярную цепь, состоящую более чем из 30 нуклеотидов. Под понятие подпадают ДНК, такая как кДНК или геномная ДНК, и РНК.

В контексте настоящего описания понятие "конструкция" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей одну или несколько рекомбинантных нуклеотидных последовательностей. Под понятие подпадают также полипептиды, который экспрессируются рекомбинантной нуклеотидной последовательностью, или созданные искусственно, или рекомбинантные молекулы, которые содержат две или большее количество аминокислотных последовательностей, которые в естественных условиях не присутствуют в одном и том же белке.

В контексте настоящего изобретения понятие "специфически связывается с" или "специфически связывает" в контексте молекулы или домена, которая/который специфически связывается в партерном во взаимодействие или антигеном, или которая/который специфически связывается с партнером по взаимодействию или антигеном, означает, что молекула или домен связывается с указанным партнером по взаимодействию или антигеном предпочтительно посредством нековалентного связывания, или обладает способностью связывать указанного партнера по взаимодействию или антиген, предпочтительно посредством нековалентного связывания, и не дает или практически не дает перекрестную реакцию с каким-либо другим партнером по взаимодействию или антигеном, который имеет структуру, сходную со структурой партнера по взаимодействию или антигена.

В контексте нацеливающего участка (такого как нацеливающий участок T1 или T2), который специфически связывается с антигеном (таким как антиген A1 или A2) понятие "специфически связывается с" относится к ситуации, когда указанный нацеливающий участок обладает способностью специфически связываться с указанным антигеном, или фактически связывается с ним.

В контексте домена привлечения Т-клетки, домена привлечения НК-клеток, домена привлечения макрофагов, домена привлечения моноцитов, домена привлечения гранулоцитов, домена привлечения нейтрофильных гранулоцитов или домена привлечения активированных нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов и/или макрофагов понятие "специфически связывается с" антигеном или молекулой или "специфически связывает" антиген или молекулу относится к ситуации, когда соответствующий домен обладает способностью специфически связываться с указанным антигеном или молекулой, или фактически связывается с ними.

В контексте функционального домена, представляющего собой домен, который "специфически связывает" антиген, молекулу, соединение, молекулу-носитель или аффинную метку, понятие "специфически связывает" относится к ситуации, когда либо указанный функциональный домен обладает способностью специфически связываться с указанным антигеном, молекулой, соединением, молекулой-носителем или аффинной меткой, либо фактически связывается с ними.

В контексте токсина, флуорофора, антигена, молекулы-носителя или аффинной метки, которые "специфически связаны" с помощью функционального домена, это понятие относится к ситуации, когда либо указанный функциональный домен обладает способностью специфически связываться с указанными токсином, флуорофором, антигеном, молекулой-носителем или аффинной меткой, либо фактически связывается с ними.

В контексте настоящего описания молекула или антиген является "специфической/специфическим в отношении определенного клеточного типа или клеточной линии дифференцировки", если он/она экспрессируется указанным клеточным типом/клетками указанной клеточной линии дифференцировки, но не (или только в очень незначительной степени) другими клеточными типами или клетками другой клеточной линии дифференцировки. Молекула или антиген может быть "специфической/специфическим в отношении определенного клеточного типа или клеточной линии дифференцировки", если он/она экспрессируется указанным клеточным типом/клетками указанной клеточной линии дифференцировки и не более чем несколькими другими клеточными типами или клетками другой клеточной линии дифференцировки помимо указанного клеточного типа/клеток указанной другой клеточной линии дифференцировки, которые экспрессируют указанный антиген, а также, если большинство других клеточных типов или клеток другой клеточной линии дифференцировки помимо указанного клеточного типа/клеток указанной клеточной линии дифференцировки не могут экспрессировать указанный антиген (или экспрессируют его лишь в очень незначительной степени). Понятие "специфический в отношении определенного клеточного типа или клеточной линии дифференцировки" может означать также, что указанная молекула или указанный антиген экспрессируется указанным клеточным типом/клетками указанной клеточной линии дифференцировки с более высокой скоростью или с более высоким относительным содержанием или в более высоком количестве, чем другими клеточными типами /клетками других линий клеточной дифференцировки, в том смысле, что может иметь место невысокий, но выявляемый уровень экспрессии указанной молекулы также в других клетках/клетках других клеточных линий дифференцировки. В настоящем описании понятие "маркер" в контексте маркера определенного клеточного типа или определенной клеточной линии дифференцировки, может относиться к молекуле или антигену, которая/который является специфической/специфическим для клеточного типа или клеток клеточной линии дифференцировки соответственно, которые описаны выше.

В контексте настоящего описания понятие "аптамер" относится к небольшому соединению, состоящему из олигонуклеиновой кислоты (такой как РНК или ДНК) или пептидной или непептидной молекуле, которая связывается со специфической молекулой-мишенью с высокой аффинностью.

В контексте настоящего описания понятие "молекула-носитель" означает молекулу или часть молекулы, которая не распознается как чужеродная иммунной системой пациента, которому вводят набор полипептидов, предлагаемый в изобретении, или которая не вызывает или вызывает лишь слабый иммунный ответ у пациента, которому вводят набор полипептидов, предлагаемый в изобретении. Предпочтительно указанная "молекула-носитель" связана или обладает способностью к связыванию с другой молекулой, такой как антитело. "Молекула-носитель" представляет собой молекулу или часть молекулы, при этом молекула-носитель присоединена с помощью ковалентной или нековалентной связи ко второй молекуле или части второй молекулы, например, флуорофору или токсину.

Понятие "ГКГ" относится к главному комплексу гистосовместимости, который представляет собой набор генов, кодирующих группу молекул, содержащую молекулы клеточной поверхности, которые необходимы для презентации антигена Т-клеткам и которые ответственны также за быстрое отторжение трансплантата. У людей ГКГ включает гены HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR. В настоящем описании понятие используют для обозначения генов главного комплекса гистосовместимости, а также генных продуктов, кодируемых указанными генами. Понятие "HLA" относится к человеческим лейкоцитарным антигенам. В контексте настоящего описания "HLA" обозначает человеческую форму "ГКГ".

В контексте настоящего описания понятие "аллельный вариант" относится к любой из двух или большего количества альтернативных форм гена, занимающих один и тот же локус на хромосоме. Например, HLA-A1, HLA-A2 и HLA-A3 представляют собой три аллельных варианта HLA-A. В контексте настоящего описания понятие "аллельный вариант" относится также к белку, кодируемому аллельным вариантом гена.

В контексте настоящего описания понятие "антиген" относится к молекуле, для которой известно, что она специфически связывается или обладает способностью к специфическому связыванию с антителом или антигенсвязывающим участком антитела. В наиболее широком смысле понятие "антиген A1" относится к указанному выше антигену. В наиболее широком смысле понятие "антиген A2" относится к указанному выше антигену.

Обозначения "антиген A1" и "антиген A2" выбраны для того, что бы иметь возможность отличать "антиген A1" от "антигена A2". "Антиген ГКГ" представляет собой антиген, который также представляет собой молекулу, принадлежащую к главному комплексу гистосовместимости. Антигены ГКГ включают антигены класса I ГКГ (у человека антигены HLA-A, -B и -C) и антигены ГКГ класса II (у человека антигены HLA-DP, -DQ и -DR). Фраза "клетка несет антиген" или "несет антиген на своей клеточной поверх-

ности" означает ситуацию, когда клетка экспрессирует антиген, который присутствует на клеточной поверхности указанной клетки и доступен для антитела, находящегося вне указанной клетки. Фраза субстрат "имеет антиген на своей поверхности" означает, что ситуацию, когда указанный антиген присутствует на поверхности указанного субстрата и доступен для антитела, нанесенного на указанный субстрат.

В контексте настоящего описания понятие "антиген, специфический в отношении злокачественного состояния клетки" относится к антигену, который злокачественная клетка определенного клеточного типа (такая как злокачественная В-клеточная опухолевая клетка) несет на своей клеточной поверхности, но который не несет на своей клеточной поверхности (или содержит лишь в незначительном количестве) клетка такого же клеточного типа, которая не является злокачественной (такая как незлокачественная В-клетка).

В контексте настоящего описания понятие "антиген/молекула, который/которая является специфическим/специфической для злокачественного типа клеток" относится к антигену/молекуле, который/которую злокачественная клетка определенного клеточного типа (такая как злокачественная В-клеточная опухолевая клетка) несет на своей клеточной поверхности, но который/которую не несет (или содержит лишь в незначительном количестве) на своей клеточной поверхности клетка такого же клеточного типа, которая не является злокачественной (такой как незлокачественная В-клетка) или клетка другого клеточного типа (такая как Т-клетки или гепатоциты). Понятие "антиген/молекула, который/которая является специфическим/специфической для злокачественного типа клеток" относится к антигену/молекуле, который/которую злокачественная клетка определенного клеточного типа (такая как злокачественная В-клеточная опухолевая клетка) несет на своей клеточной поверхности, но который/которую клетка такого же клеточного типа, которая не является злокачественной (такой как незлокачественная В-клетка) не несет (или содержит лишь в незначительной степени) на своей клеточной поверхности, и который/которую клетки, относящиеся лишь к небольшому количеству других клеточных типов помимо указанного клеточного типа, несут на своей клеточной поверхности, в то время как клетки большинства других клеточных типов не несут (или содержат лишь в незначительном количестве). Понятие "антиген/молекула, который/которая является специфическим/специфической для злокачественного типа клеток" может означать также, что указанный антиген/указанная молекула экспрессируется указанной злокачественной клеткой определенного клеточного типа с более высокой скоростью или с более высоким относительным содержанием или в более высоком количестве по сравнению с клеткой такого же клеточного типа, которая не является злокачественной, в том смысле, что может иметь место невысокий, но выявляемый уровень экспрессии указанной молекулы также и в клетке такого же клеточного типа, которая не является злокачественной. В настоящем описании понятие "маркер" в контексте маркера злокачественного состояния определенной клетки или злокачественного клеточного типа, может относиться к молекуле или антигену, которая/который является специфической/специфическим для злокачественного состояния определенной клетки или для злокачественного клеточного типа соответственно, которые описаны выше.

В контексте настоящего описания понятие "иммуноглобулиновый домен" относится к домену, который практически состоит из глобулярной области цепи антитела. Иммуноглобулиновые домены отличаются тем, что они сохраняют иммуноглобулиновую укладку, характерную для молекул антител. Иммуноглобулины, такие как IgG, IgE или IgM, состоят из различного количества тяжелых и легких цепей. Каждая тяжелая и легкая цепь содержит константную область и переменную область. Каждая переменная область легкой цепи (V_L) и каждая переменная область тяжелой цепи (V_H) содержит три гиперпеременных участка, которые обозначают также как "определяющие комплементарность участки" или "CDR". За связывание иммуноглобулина с антигеном ответственны прежде всего CDR.

Понятия " V_H " или " V_H -домен" применяют взаимозаменяемо, и они относятся к переменной области иммуноглобулиновой тяжелой цепи антитела. Понятия " V_L " или " V_L -домен" применяют взаимозаменяемо, и они относятся к переменной области иммуноглобулиновой легкой цепи антитела.

В контексте настоящего описания понятие "иммуноглобулиновый модуль" относится к молекуле, части молекулы или молекулярному набору, которые содержат один или большее количество, предпочтительно два или большее количество иммуноглобулиновых доменов и которые обладают способностью связываться с антигеном. Предпочтительно "иммуноглобулиновый модуль" содержит линейную молекулярную цепь аминокислот, которая включает аминокислотную последовательность одного или большего количества, предпочтительно двух или большего количества иммуноглобулиновых доменов. Необязательно "иммуноглобулиновый модуль" содержит один или большее количество, предпочтительно два или большее количество дисульфидных мостиков. Под понятие "иммуноглобулиновый модуль" подпадают молекулы или части молекул, которые содержат или состоят из "одноцепочечного переменного фрагмента" антитела. Под понятие "иммуноглобулиновый модуль" подпадают также молекулы или части молекул, которые содержат или состоят из V_H -домена антитела лам, антитела верблюдов или антитела акул.

В контексте настоящего описания понятие "иммуноглобулиновый модуль II" относится к иммуноглобулиновому модулю, содержащему V_L -домен, сцепленный с V_H -доменом. Указанный V_L -домен и указанный V_H -домен указанного иммуноглобулинового модуля II можно вывести из одного и того же анти-

тела. Указанный V_L -домен и указанный V_H -домен указанного иммуноглобулинового модуля II могут образовывать димер. Указанный димер может обладать способностью специфически связываться с антигеном. Антиген может представлять собой, например, антиген A1. Указанный "иммуноглобулиновый модуль II" может содержать "одноцепочечный варибельный фрагмент" антители, который обладает способностью специфически связываться с антигеном, например, антигеном A1.

В контексте настоящего описания понятие "иммуноглобулиновый модуль I2" относится к иммуноглобулиновому модулю, содержащему V_L -домен, сцепленный с V_H -доменом. Указанный V_L -домен и указанный V_H -домен указанного иммуноглобулинового модуля I2 можно вывести из одного и того же антители. Указанный V_L -домен и указанный V_H -домен указанного иммуноглобулинового модуля I2 могут образовывать димер. Указанный димер может обладать способностью специфически связываться с антигеном. Указанный антиген может представлять собой, например, антиген A2. Указанный "иммуноглобулиновый модуль I2" может содержать "одноцепочечный варибельный фрагмент" антители, который обладает способностью специфически связываться с антигеном, например, антигеном A2.

В конструкции иммуноглобулинового модуля, содержащего V_L -домен, сцепленный с V_H -доменом, V_L -домен может быть расположен в N- или C-концевом направлении относительно соответствующего V_H -домена. Специалист в данной области может определять, какое расположение V_H - и V_L -доменов является более приемлемым для конкретного домена, представляющего собой одноцепочечный варибельный фрагмент.

В контексте настоящего описания понятия "Fv" и "варибельный фрагмент" относятся к фрагменту антители, которое представляет собой минимальный фрагмент антители, содержащий полный антиген-распознающий и связывающий сайт. Эта область состоит из димера из варибельных областей одной тяжелой и одной легкой цепи, которые находятся в тесной нековалентной ассоциации (V_H - V_L -димер). В указанной конфигурации V_H - и V_L -домен вместе образуют антигенсвязывающий сайт, обладающий антигенной специфичностью связывания, который находится на поверхности V_H - V_L -димера.

Понятия "scFv", "одноцепочечный Fv" и "одноцепочечный варибельный фрагмент" применяют взаимозаменяемо, и они обозначают антители или часть антители, в которой варибельная область тяжелой цепи (V_H) и варибельная область легкой цепи (V_L) канонического двухцепочечного антители сцеплены с образованием одной цепи. Как правило, между двумя цепями встраивают линкер, обеспечивающий правильную укладку и создание активного сайта связывания.

В контексте настоящего описания понятие "антитело лам" относится к антители или части антители, полученного из организма лам. В контексте настоящего описания понятие "антитело верблюдов" относится к антители или части антители, полученного из организма верблюдов. В контексте настоящего описания понятие "антитело акул" относится к антители или части антители, полученного из организма акул. Антители лам, верблюдов и акул имеют антигенсвязывающий участок, который состоит из индивидуального домена, V_HH , (а не V_H - и V_L -цепи).

В контексте настоящего описания понятие "домен привлечения Т-клетки" относится к домену, который специфически связывается с антигеном, который присутствует на поверхности Т-клеток. Предпочтительно связывание указанного домена привлечения Т-клетки с указанным антигеном активирует указанную Т-клетку. Аналогично этому, понятие "домен привлечения НК-клетки" относится к домену, который специфически связывается с антигеном, который присутствует на клеточной поверхности естественных клеток-киллеров. Предпочтительно связывание указанного домена привлечения НК-клетки с указанным антигеном активирует указанные естественные клетки-киллеры. Понятие "домен привлечения макрофагов" относится к домену, который специфически связывается с антигеном, который присутствует на клеточной поверхности макрофагов. Предпочтительно связывание указанного домена привлечения макрофагов с указанным антигеном активирует указанные макрофаги. Понятие "домен привлечения моноцитов" относится к домену, который специфически связывается с антигеном, который присутствует на клеточной поверхности моноцитов. Предпочтительно связывание указанного домена привлечения моноцитов с указанным антигеном активирует указанные моноциты. Понятие "домен привлечения гранулоцитов" относится к домену, который специфически связывается с антигеном, который присутствует на клеточной поверхности гранулоцитов. Предпочтительно связывание указанного домена привлечения гранулоцитов с указанным антигеном активирует указанные гранулоциты. Понятие "домен привлечения нейтрофильных гранулоцитов" относится к домену, который специфически связывается с антигеном, который присутствует на клеточной поверхности нейтрофильных гранулоцитов. Предпочтительно связывание указанного домена привлечения нейтрофильных гранулоцитов с указанным антигеном активирует указанные нейтрофильные гранулоциты. Понятие "домен привлечения нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов и/или макрофагов" относится к домену, который специфически связывается с антигеном, который присутствует на клеточной поверхности нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов и/или макрофагов. Предпочтительно связывание указанного домена привлечения нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов и/или макрофагов с указанным антигеном активирует указанные моноциты и/или макрофаги.

В контексте настоящего описания понятие "молекула, обладающая способностью опосредовать биолуминесценцию", относится к молекуле (или функциональной области молекулы), обладающей ферментативной активностью, которая в присутствии соответствующего(их) субстрата(ов) катализирует

реакцию, вызывающую биолюминесценцию. Под понятие попадают люциферазы, такие как люциферазы светляка или глубоководного рачка *Gaussia*.

В контексте настоящего описания понятие "вариант GFP" относится к молекуле, которая имеет аминокислотную последовательность, выведенную из аминокислотной последовательности зеленого флуоресцентного белка из *Aequorea victoria*, путем интродукции изменений, которые приводят к повышенной флуоресценции или флуоресценции других цветов. Подразумевается, что понятие относится среди прочего к YFP (желтый флуоресцентный белок), CFP (циановый флуоресцентный белок), белок Venus (Nagai T. и др., A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications, *Nat Biotechnol.* 20(1), январь 2002 г., с. 87-90), Cerulean (усиленный CFP с заменами S72A, Y145A и H148D).

Понятие "усиленный GFP" (и аналогично "усиленный YFP", "усиленный CFP") относится к GFP (YFP, CFP), который был "гуманизирован" согласно методу, описанному у Kain и др., *Biotechniques* 19(4), 1995, с. 650-655. Понятие "гуманизация" относится к изменениям, сделанным в нуклеотидной последовательности GFP (YFP, CFP) для оптимизации кодонов для экспрессии белка в человеческих клетках.

В контексте настоящего описания понятие "молекула, участвующая в бимолекулярной флуоресцентной комплементации" относится к флуоресцентной молекуле, которая может присутствовать в виде двух фрагментов, которые сами по себе не являются флуоресцентными, но которые после гетеродимеризации двух фрагментов образуют димер, который обладает способностью к флуоресценции.

В контексте настоящего описания понятие "терапевтическое соединение" относится к соединению, предназначенному для предупреждения, лечения, облегчения или излечения заболевания или болезненного состояния. Предпочтительно "терапевтическое соединение" представляет собой соединение, которое после проникновения в клетку обладает способностью вызывать гибель указанной клетки. Терапевтическое соединение может представлять собой химическое или радиоактивное соединение, которое повреждает жизненно важные клеточные структуры или нарушает жизненно важные клеточные процессы.

В контексте настоящего описания понятие "диагностическое соединение" относится к соединению, которое можно обнаруживать с помощью обычных методов детекции, например, методов, которые применяют в клинических или биохимических, или медицинских диагностических лабораториях, например, флуоресцентное соединение, радиоактивное соединение или опосредующая биолюминесценцию молекула.

Понятие "клетки-прародители/предшественники" относится к незрелым, недифференцированным или частично дифференцированным клеткам, которые, как правило, присутствуют после рождения у животных/людей и имеют предрасположенность к дифференцировке в конкретный клеточный тип или конкретные клеточные типы. Понятие "клетки-прародители/предшественники опухоли" означает клеток-прародителей/предшественников с измененными свойствами (например, касательно из пролиферативного поведения или схемы геной экспрессии), которые превращаются в опухолевые клетки. Примеры указанных клеток-прародителей/предшественников опухоли являются, например, лейкозные клетки-предшественники или прародители.

В контексте настоящего описания понятие "рак" относится к злокачественной клетке, группе клеток или злокачественной неоплазии. Под понятие попадают карциномы, саркомы, лимфомы, лейкозы, опухоли из зародышевых клеток и бластомы. "Раковая клетка" представляет собой клетку, которая является частью или выведена из раковой опухоли. Понятие "опухоль" применяют взаимозаменяемо с понятием "рак".

В контексте настоящего описания понятие "гематологическая опухоль" относится к раку крови или кроветворной системы (например, клетки костного мозга, кроветворные клетки и клетки-предшественники зрелых кровяных клеток). Понятие "гематологическая опухоль" относится и к гематологической неоплазии. В контексте настоящего описания понятие "негематологическая опухоль" относится к опухоли, которая не представляет собой гематологическую опухоль.

В контексте настоящего описания понятие "пациент, который подвергается аллогенной трансплантации ткани или клеток" относится к ситуации, когда пациент получает или получал трансплантированные клетки или трансплантированную ткань, которые(ая) были(а) получены(а) из другой особи. В этом аспекте предпочтительной является ситуация с несовместимыми HLA-антигенами. В настоящем описании понятие единица "мкг/м²" в контексте количества вводимого полипептида означает определенное количество полипептида на квадратный метр поверхности тела пациента, которому вводят указанный полипептид (пептид можно вводить с помощью любого пригодного пути введения, такого как внутривенная или подкожная инъекция). Например, выражение "количество вводимого полипептида составляет 50 мкг/м² в день в случае полипептида P1" относится к ситуации, когда количество вводимого полипептида P1 в день составляет 50 мкг на квадратный метр поверхности тела пациента, которому вводят полипептид P1. В случае, когда поверхность тела пациента 2 м², то это может означать, что в день вводят 100 мкг полипептида P1.

С помощью набора полипептидов, предлагаемых в изобретении, можно идентифицировать клетки со специфической комбинацией двух антигенов и/или элиминировать их с высокой специфичностью и

пониженными побочными действиями.

Одним из преимуществ комбинаторной стратегии, предлагаемой в изобретении, является то, что не применяют предварительно созданные F-звенья (например, звенья антитела к CD3). Гетеродимеризация V_H и V_L F1 и CD3 не происходит ни *per se*, ни даже в присутствии агента, который стабилизирует их димеризацию (например, антигена, который обладает способностью связываться с доменом F, типа, например CD3, HIS или DIG), и таким образом не получают функциональный F-домен (например, не стимулируют T-клетки). Только в ситуациях, когда обе комплементирующие друг друга конструкции P1 и P2 одновременно связываются на поверхности данной клетки, два компонента F1 и F2 реконструируют F-домен (например, сайт связывания CD3). Таким образом, функция F-домена (например, T-клеточная активация) имеет место только при необходимости, а не систематически. Можно предположить, что комбинаторная стратегия должна обладать меньшими токсическими воздействиями, например, по сравнению со стандартными стратегиями, основанными на применении биспецифических антител. Это подтверждается также в приведенных ниже примерах, в частности, на модели *in vivo* аллогенной трансплантации, на которой продемонстрировано, что HLA-A2-позитивные мыши не страдали какими-либо клиническими симптомами после инфузии реактивных в отношении HLA-A2 конструкций.

В частности, для клеток-мишеней, которые экспрессируют предварительно определенную антигенную сигнатуру, создавали двухцепочечные полипептиды в качестве частей конечной, состоящей из двух частей (двухкомпонентной) (бимолекулярной) конструкции (бимолекулярная/триспецифическая конструкция антитела), каждая из которых состояла из антигенсвязывающего одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv) и либо варибельного домена легкой цепи (V_L), либо варибельного домена тяжелой цепи (V_H) антитела. Когда эти два гибридных фрагмента связываются с их соответствующими антигенами на поверхности одной клетки, то V_L - и V_H -домены взаимодействуют друг с другом, реконструируя подлинный антигенсвязывающий сайт, и таким образом удовлетворяют указанным требованиям.

Как отмечалось выше, одним из преимуществ набора полипептидов, предлагаемого в изобретении, является то, что для функциональной гетеродимеризации необходимо связывание с обоими антигенами-мишенями на клеточной поверхности. Самосборку двух комплементарных частей и последующую T-клеточную стимуляцию после связывания только одного плеча с его антигеном можно исключать, что согласуется с опубликованными данными, демонстрирующими, что связывание самих V_H или V_L происходит с низкой аффинностью и что гетеродимеры V_H/V_L имеют тенденцию к быстрой диссоциации в отсутствие антигена (Colman, Nature 326, 1987, с. 358-363; Amit Science 233, 1986, с. 747-753; Law, Int Immunol 14, 2002, с. 389-400; Ueda, Nat Biotechnol 14, 1996, с. 1714-1718).

В отличие от гомо- или гетеродимеризации доменов, хорошо известных в данной области (лейциновая молния, Fc-домены, "выступ-во-впадине" и т.д.), взаимодействия V_H и V_L характеризуются низкой аффинностью. Однако было установлено, что V_H/V_L -взаимодействие может стабилизироваться после связывания со специфическим антигеном. Не ограничиваясь какой-либо теорией, можно предположить, что V_H/V_L -взаимодействие согласно настоящему изобретению имеет место только в ситуациях, когда оба фрагмента предварительно связаны с родственными антигенами-мишенями, например, на поверхности клеточных мишеней. Также, не ограничиваясь какой-либо теорией, можно предположить, что после одновременного связывания на мишени конструкции оказываются в непосредственной близости друг к другу, в результате чего они могут образовывать тримерный комплекс с антигеном. Таким образом, полученный на мишени путем взаимных дополнений (комплементированный) триспецифический гетеродимер, предлагаемый в изобретении, обладает функцией, соответствующей функции домена F, например, обеспечивает привлечение и стимуляцию T-клеток в отношении деструкции опухолевых клеток, если воссоздается антитело к CD3.

Помимо одного указанного преимущества конструкций P1 и P2, предлагаемых в изобретении, такого, например, как комбинаторная природа вызываемого иммунного ответа, при создании настоящего изобретения неожиданно было установлено, что бимолекулярная конструкция с разрушенным F-доменом, например, scFv-анти-CD3, характеризуется отсутствием нецелевых воздействий.

Набор полипептидов, предлагаемый в настоящем изобретении, в частности полипептиды P1 и P2, входящие в него, обладают дополнительным преимуществом, заключающемся в том, что они являются более стабильными и/или обладают удлиненной продолжительностью жизни (в частности, при 4°C) по сравнению с общепринятыми биспецифическими конструкциями типа ViTE-конструкций. Указанные общепринятые биспецифические конструкции имеют тенденцию к агрегации (в частности, при 4°C).

Следует предположить, что полипептиды P1 и P2, предлагаемые в изобретении, более конкретно входящие в них F1 и F2, более конкретно V_H и V_L , которые могут входить в их состав, благодаря из гидрофобной поверхности раздела должны обладать способностью связываться с альбумином. Это приводит к удлиненному времени удерживания; т.е. более продолжительной биодоступности *in vivo*, а также и *in vitro*, например, в образцах сыворотки или крови.

Набор полипептидов, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит первый полипептид P1 и второй полипептид P2. Первый полипептид P1 содержит первый нацеливающий участок T1 (который обладает способностью специфически связываться с антигеном A1), слитый с первым фрагментом F1

функционального домена F (см. фиг. 1А, верхняя часть). Второй полипептид P2 содержит второй нацеливающий участок T2 (который обладает способностью специфически связываться с антигеном A2), слитый со вторым фрагментом F2 функционального домена F (см. фиг. 1 А, нижняя часть). Важно отметить, что фрагменты F1 соответственно F2 функционального домена сами по себе являются нетоксичными и не могут проявлять какую-либо биологическую функцию, если отсутствует спаривание между двумя полипептидами P1 и P2. Когда оба полипептида P1 и P2 одновременно связываются с их антигенами на поверхности одной клетки, которая экспрессирует оба антигена A1 и A2, то фрагменты F1 и F2 функционального домена F оказываются в тесной близости, происходит их гетеродимеризация и в результате комплементация требуемой биологической функции (см. фиг. 1Б). С другой стороны, клетка, которая экспрессирует либо только антиген A1 (фиг. 1В), либо только антиген A2 (фиг. 1Г), либо ни один из антигенов, не может вызывать комплементацию биологической функции. Так, высоко специфическая биологическая функция достигается только в присутствии клеток, которые имеют оба антигена A1 и A2 на их клеточной поверхности, после одновременного связывания обоих полипептидов P1 и P2 с указанной клеткой. В зависимости от природы функционального домена F можно осуществлять выполнение различных задач, таких как специфическая идентификация/детекция или элиминация клеток, которые экспрессируют оба антигена A1 и A2.

Указанный новый подход применяют для специфической элиминации опухолевых клеток.

Новые гистопатологические анализы и анализы, проведенные с помощью проточной цитометрии, продемонстрировали, что опухолевые клетки можно выявлять и отличать их от нетрансформированных копий не с помощью индивидуальных поверхностных маркеров, а по экспрессии аномальных комбинаций/профилей антигенов, которые известны для гематологических неоплазм и рака и раковых стволовых клеток из различных других источников. Таким образом, в то время как одного антигена может оказаться недостаточным для специфической идентификации некоторых опухолевых клеток, специфическая комбинация двух антигенов может позволять отличать опухолевую клетку от любого другого типа клеток.

Например, набор полипептидов, предлагаемый в изобретении, можно применять для специфической элиминации раковых клеток, отличающихся одновременной экспрессией антигенов CD33 и CD19 на своей клеточной поверхности. Такая комбинация антигенов обнаружена на определенных типах клеток острого лейкоза, и она отличает эти клетки от всех других клеток (таких как незлокачественные клетки), которые могут нести либо CD33, либо CD19 на своей клеточной поверхности, но не могут нести оба антигена CD33 и CD19 на своей клеточной поверхности (Ossenkoppele и др., Review of the relevance of aberrant antigen expression by flow cytometry in myeloid neoplasms, Br J. Haematol, 153(4), 2011, с. 421-436).

Для специфической элиминации указанных лейкозных клеток, которые несут и CD33, и CD19 на своей клеточной поверхности, первый нацеливающий участок T1 первого полипептида P1 может представлять собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), специфический в отношении CD33. В качестве фрагмента F1 функционального домена F можно выбирать вариабельный домен легкой цепи V_L антитела к CD3. Второй нацеливающий участок T2 второго полипептида P2 может представлять собой scFv, специфический в отношении CD19. В качестве фрагмента F2 функционального домена F можно выбирать вариабельный домен тяжелой цепи V_H указанного антитела к CD3. Вариабельный домен легкой цепи V_L и вариабельный домен тяжелой цепи V_H антитела к CD3 каждый является нетоксичным сам по себе. Они также не могут осуществлять их биологическую функцию (т.е. эффективно связывать антиген CD3), если не существует взаимодействия партеров, т.е. полипептидов P1 и P2.

В присутствии лейкозной клетки, несущей и CD33, и CD19 на своей клеточной поверхности, оба полипептида P1 и P2 одновременно связываются с указанной клеткой. В результате фрагменты F1 и F2 функциональной группы F (т.е. Fv тяжелой и легкой цепи вариабельного анти-CD3 домена антитела к CD3) оказываются в непосредственной близости друг к другу, они гетеродимеризуются и в результате комплементируют требуемую биологическую функцию, позволяя димеру P1 и P2 специфически связываться с CD3.

CD3 представляет собой молекулу клеточной поверхности, которая присутствует на поверхности Т-клеток. Эта молекула является частью Т-клеточного сигнального комплекса и перекрестное сшивание молекулы CD3 на поверхности Т-клетки после связывания с CD3-специфическим антителом приводит к активации Т-клетки. Благодаря привлечению антигенов CD3, находящихся на поверхности Т-клетки, гетеродимеры полипептидов P1 и P2 обладают способностью опосредовать рекрутмент Т-клеток и активировать их. В результате индуцируются типичные эффекторные механизмы цитотоксического Т-клеточного ответа, которые приводят к лизису клетки, такие как: высвобождение литических гранул, содержащих цитотоксические белки перфорин, гранзимы и гранулизин. Перфорин образует поры в мембране клетки-мишени, через которые могут проникать гранзимы и индуцировать апоптоз. Эти действия приводят к специфической деструкции лейкозных клеток, которые несут на своей клеточной поверхности антигены и CD33, и CD19.

Клетки, отличные от лейкозных клеток, не могут иметь на их клеточной поверхности оба антигена CD33 и CD19. Поэтому они не могут рекрутировать оба полипептида P1 и P2 и не могут приводить к комплементации способности связывать CD3 и достигать привлечения CD3-позитивных Т-лимфоцитов.

Таким образом, другие, отличные от лейкозных, клетки не поражаются, и достигается деструкция злокачественных клеток с высокой специфичностью.

Это является выраженным отличием от общепринятых биспецифических антител. Общепринятая биспецифическая конструкция, которая привлекает Т-клетки и обладает специфичностью в отношении клеток, которые экспрессируют

CD33, может опосредовать деструкцию всех CD33-положительных клеток. Поскольку CD33 является маркером миелоидной линии дифференцировки, который экспрессируется на многих миелоидных клетках и миелоидных клетках-предшественниках, то деструкция этих клеток может приводить к длительной аплазии и, вероятно, смерти пациента. Общепринятая биспецифическая конструкция, которая привлекает Т-клетки и обладает специфичностью в отношении CD19-положительных клеток, может приводить к элиминации всех клеток, которые несут антиген CD19 на клеточной поверхности. CD19 экспрессируется на большой субпопуляции В-лимфоцитов. Деструкция этих клеток может приводить к серьезному дефекту иммунной системы. Таким образом, помимо элиминации лейкозных клеток, которые одновременно экспрессируют на поверхности CD33 и CD19, применение общепринятых биспецифических антител, специфических в отношении CD33 и CD19, может приводить к элиминации миелоидных клеток и большой субпопуляции В-лимфоцитов.

Так, в то время как общепринятые биспецифические антитела распознают только один антиген на клетке, подлежащей элиминации, активация эффекторных функций, предлагаемая в настоящем изобретении, требует одновременного распознавания двух специфических антигенов на поверхности клеток, которые должны быть идентифицированы/элиминированы. В результате настоящее изобретение позволяет достигать существенного повышения специфичности и снижения побочных воздействий.

Специалисту в данной области должно быть очевидно в соответствии с принципом настоящего изобретения, что возможны различные модификации приведенных выше в качестве примеров вариантов осуществления изобретения.

Например, подход, описанный выше, можно легко адаптировать для идентификации/элиминации других типов опухолевых клеток помимо CD33- и CD19-положительных лейкозных клеток просто путем выбора соответствующих нацеливающих участков T1 и T2, которые специфически связываются с антигенами A1 и A2 соответственно, которые присутствуют одновременно на клетках, подлежащих идентификации/элиминации, но не присутствуют одновременно на других типах клеток. Как указано выше, многие, если не все, раковые клетки (а также клетки-предшественники раковых клеток) экспрессируют на клеточной поверхности целый ряд молекул, которые *per se* часто экспрессируются на здоровых тканях, но являются индикативным показателем злокачественного фенотипа, если экспрессируются в нефизиологической комбинации. Например, CD34 является маркером гематопозитических стволовых клеток, а CD7 может присутствовать на субпопуляции лимфоидных клеток. Однако комбинация CD34 и CD7 в очень значительной степени ассоциирована со злокачественностью, и для большей части случаев острых миелолейкозов характерна аномальная коэкспрессия двух антигенов (Ossenkoppele и др., *Review of the relevance of aberrant antigen expression by flow cytometry in myeloid neoplasms*, *Br J Haematol*, 153(4), 2011, с. 421-436.). Аналогично этому, аномальная коэкспрессия CD44 и CD117 описана для раковых стволовых клеток яичника, CD44 и CD24 - для клеток, инициирующих рак поджелудочной железы, а комбинация EpCAM и CD44 - для раковых стволовых клетках ободочной кишки и молочной железы (Natasha Y. Frank, Tobias Schatton, Markus H. Frank; *The therapeutic promise of the cancer stem cell concept*, *J Clin Invest.*, 120, 2010, с. 41-50). Обнаружено, что экспрессия CD24 и CD29, а также CD24 и CD49f является специфической для карциномы молочной железы (Vassilopoulos A. и др., *Identification and characterization of cancer initiating cells from BRCA1 related mammary tumours using markers for normal mammary stem cells*, *Int J Biol Sci*, 4, 2008, с. 133-142). Кроме того, комбинации антигенов с высокими уровнями экспрессии являются индикативными для ряда злокачественных заболеваний, например, CD38 и CD138 для миеломы.

Помимо перечисленных выше и известных из научной литературы комбинаций антигенов, специфических для рака, специалист в данной области может определять с помощью несложных средств дополнительные комбинации двух антигенов, которые одновременно экспрессируются на конкретных опухолевых клетках, но не на других клетках.

Во-первых, специалист в данной области может выявлять комбинацию антигенов, специфическую для определенного типа рака, путем объединения антигена, специфического в отношении злокачественного состояния соответствующего клеточного типа, с помощью приемлемого маркера данного клеточного типа клеток или маркера клеточной линии дифференцировки.

Например, угольная ангидраза IX является маркером, который в значительной степени ассоциирован с почечно-клеточной карциномой и метастазами почечно-клеточной карциномы, и таким образом, является маркером злокачественного состояния почечных клеток. Однако, указанный локализованный на мембране маркер экспрессируется также на здоровых клетках кишечника. Путем выбора второго антигенного маркера клеток почечной линии дифференцировки, такого как аквапорин, полученная в результате комбинация двух антигенов является специфической для клеток почечно-клеточной карциномы и клеток из метастазов почечно-клеточной карциномы, но отобранная пара антигенов не является характе-

ристической ни для незлокачественных клеток почки (которые не экспрессируют угольную ангидразу IX), ни для клеток из кишечника (которые не экспрессируют аквапорины).

Подробную информацию о маркерах злокачественного состояния различных клеточных типов и маркерах многочисленных клеточных типов или линий клеточной дифференцировки можно почерпнуть из литературы и доступных на веб-сайтах ресурсов (см. ниже подробности) или можно получать с помощью несложных экспериментов (см. ниже).

Примеры маркеров злокачественного состояния клетки включают E-кадгерин для эпителиальных клеток и клеток карциномы молочной железы дуктального типа; Ca-125 для злокачественных эпителиальных клеток и раковых клеток яичника, клеток аденокарциномы и клеток рака молочной железы; Her-2/neu для клеток рака молочной железы; белок опухолей апокринных потовых желез (белок BRST-2) для клеток рака молочной железы; BSA-225 (ассоциированный с карциномой молочной железы гликопротеин) для рака легкого и рака молочной железы; CA 19-9 (углеводный антиген 19-9) для клеток рака поджелудочной железы, желчных протоков и кишечника; CEA для клеток колоректального рака; CD117 (c-kit) для клеток g1st (стромальная опухоль желудочно-кишечного тракта (и миелоидных и тучных клеток); CD30 для клеток Рид-Штернберга (и Ki-1-активированных Т-клеток и В-клеток); эпителиальный антиген (BER-EP4), эпителиальный мембранный антиген и связанный с эпителием антиген (MOC-31) для клеток рака эпителия; рецептор эпителиального фактора роста (HER1) для клеток различных типов рака; рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) альфа для клеток различных видов рака; меланомаассоциированный маркер/Mart 1/Melan-A для клеток меланомы; CD133 для популяций рака из стволовых клеток и других клеток; TAG 72 (ассоциированный с опухолью gp 72) для клеток аденокарциномы.

Другими примерами маркеров для злокачественного состояния клетки/клеток являются EpCAM, CD19, HER-2, HER-3, HER-4, PSMA, MUC-1 (муцин), MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, Lewis-Y, CD20, CD33, CD44v6, Wue-1, 1 антиген плазматических клеток, (связанный с мембраной) IgE, меланома-ассоциированный хондроитин сульфат протеогликан (MCSP), STEAP, мезотелин, антиген стволовых клеток простаты (PSCA), sTn (сиалилированный Tn-антиген), FAP (антиген активации фибробластов), EGFRvIII, Iga, IgP, MT-MMPs, Coга-антиген, EphA2, L6 и CO-29, CCR5, β HCG, ганглиозид GD3, 9-O-ацетил-GD3, GM2, Globo H, фукозил-GM1, Poly SA, GD2, угольная ангидраза IX (MN/CA IX), Sonic Hedgehog (Shh), CCR8, предшественник TNF-альфа, A33-антиген, Lu-6, десмоглеин 4, E-кадгерина неозпитоп, фетальный ацетилхолиновый рецептор, CD25, субстанция, вызывающая регрессию мюллеровых протоков (MIS), рецептор типа II, эндосиалин, SAS, CD63, TF-антиген, CD7, CD22, Iga(CD79a), Ig β (CD79b), G250, gp100, F19-антиген и EphA2.

Примерами антигенов, специфических для определенного клеточного типа/клеточной линии дифференцировки или для нескольких клеточных типов/клеточных линий дифференцировки (маркеры клеточных типов/маркеры клеточных линий дифференцировки) являются CD45 для гематопоэтических клеток; CD34 для эндотелиальных клеток, стволовых клеток и клеток стромы; CD33 для миелоидных клеток; CD138 для плазматических клеток и субпопуляции эпителиальных клеток; CD15 для эпителиальных, миелоидных клеток и клеток Рид-Штернберга; CD1a для кортикальных тимоцитов и клеток Лангерганса; CD2 для клеток тимуса, Т-клеток и естественных клеток-киллеров (NK); CD3 для Т-клеток; CD4 для Т-клеток-хелперов; CD5 для Т-клеток, субпопуляции В-клеток и клеток карциномы вилочковой железы; CD8 для цитотоксических Т-клеток; CD20 для В-клеток; CD23 для активированных В-клеток; CD31 для эндотелиальных клеток; CD43 для Т-клеток, миелоидных клеток, субпопуляции В-клеток, гистиоцитов и плазматических клеток; CD56 для NK-клеток; CD57 для нейроэндокринных клеток и NK-клеток; CD68 для макрофагов; CD79a для В-клеток и плазматических клеток; CD146 для эндотелиальной клеточной линии дифференцировки; белки сурфактанта для клеток легкого; синаптофизин, CD56 или CD57 для нейроэндокринных клеток; никотин-ацетилхолиновый рецептор или специфическая для мышц киназа (MUSK) для мышечных клеток; потенциалзависимый кальциевый канал (P/Q-типа) или потенциалзависимый калиевый канал (VGKC), N-метил-D-аспарататный рецептор (NMDA) для мышечных клеток и нейронов; рецептор TSH (тиреотропный гормон) для щитовидной железы, амфилизин для мышечных клеток, HerPar-1 для гепатоцитов; ганглиозид GQ1B, ганглиозид GD3 или GM1 для нейронов; и гликофорин-A для клеток эритропоэтической клеточной линии дифференцировки.

Следует отметить, что существуют ситуации, в которых может оказаться целесообразным для реализации целей настоящего изобретения рассматривать антиген с менее жесткой специфичностью в отношении представляющего интерес клеточного типа или представляющей интерес клеточной линии дифференцировки. Например, в ситуациях, в которых не известен антиген, который характерен исключительно для представляющего интерес клеточного типа или представляющей интерес клеточной линии дифференцировки, или в ситуациях, в которых невозможно подтвердить исключительную специфичность антигена, указанный подход можно рассматривать также в случае антигенов, которые присутствуют на одном или большем количестве других клеточных типов/клеточных линий дифференцировки помимо представляющего интерес клеточного типа/представляющей интерес клеточной линии дифференцировки. Аналогичные положения можно отнести к маркерам злокачественного состояния клетки или даже к специфичности комбинации из двух антигенов. Так, известны примеры ситуаций, в которых для

целей настоящего изобретения выбирают комбинацию двух антигенов, специфическую не только в отношении представляющих интерес клеток, но также в отношении одного или большего количества (нескольких) других клеточных типов/клеточных линий дифференцировки/типов злокачественных клеток.

Во-вторых, специалист в данной области может выявлять комбинацию антигенов, специфическую для определенного типа рака с помощью несложных экспериментов. Они могут включать стадии, на которых (1) определяют поверхностные антигены на опухолевых клетках, которые подлежат элиминации, и (2) идентифицируют среди этих антигенов поверхности опухолевой клетки два антигена, которые не присутствуют одновременно на других типах клеток (или присутствуют лишь на небольшом количестве других клеточных типов).

Часто экспериментальные процедуры могут не требоваться для определения поверхностных антигенов на опухолевых клетках, которые подлежат элиминации, поскольку такая информация уже может быть доступна для соответствующего типа рака из печатных изданий (см., например, David J. Dabbs, *Diagnostic immunohistochemistry*, изд-во Churchill Livingstone, 3-е изд., 2010; или F. Lin и J. Prichard, *Handbook of Practical Immunohistochemistry: Frequently Asked Questions*, изд-во Springer, New York, 1-е изд., 2011). Еще более обширную информацию можно получить из ресурсов, доступных на веб-сайтах. Например, в рамках проекта по анатомии ракового генома (Cancer Genome Anatomy Project (CGAP) Национального института рака США (U.S. National Cancer Institute (NCI)) систематически определяют профили генной экспрессии различных здоровых, предраковых и раковых клеток (Strausberg R.L., *The Cancer Genome Anatomy Project: building a new information and technology platform for cancer research*, в: *Molecular Pathology of Early Cancer*, под ред. Srivastava S., Henson D.E., Gazdar A., изд-во IOS Press, 1999, с. 365-370). К ресурсам, созданным по инициативе CGAP, имеется свободный доступ (<http://cgap.nci.nih.gov/>), и они включают доступ ко всем, полученным в рамках CGAP данным и необходимым инструментам исследования. Аналогично этому, инициативная группа по характеристике ракового генома (Cancer Genome Characterization Initiative (CGCI) Национального института рака сфокусировал свои усилия на инструментах характеристики геномных изменений, обнаруженных в различных опухолях, например, методах характеристики генома, которые включают анализ экзона и транскриптома с использованием секвенирования второго поколения. Данные, полученные CGCI, находятся в публично доступной базе данных (<http://cgap.nci.nih.gov/cgci.html>). Таким образом, во многих случаях информацию о присутствии или отсутствии различных известных белков клеточной поверхности на представляющих интерес опухолевых клетках можно получать просто путем поиска в указанных публично доступных базах данных. При необходимости затем эту информацию можно подтверждать на второй стадии путем иммуноцитологического/иммуногистохимического анализа опухолевых клеток/тканей с помощью описанных ниже методов.

Если нет никакой доступной информации о белках, которые экспрессируются на представляющих интерес опухолевых клетках/ткани, то специалист в данной области может осуществлять характеристику антигенов на опухолевых клетках/ткани с помощью иммуноцитохимических/иммуногистохимических методов с использованием панели антител (см., например, "Handbook of Practical Immunohistochemistry: Frequently Asked Questions", под ред. F. Lin и J. Prichard, изд-во Springer New York, 1-е изд. 2011; или "Using Antibodies: A Laboratory Manual", под ред. E. Harlow и D. Lane, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998). В целом, метод состоит в следующем: гистологический препарат или клетки, выделенные из опухоли, инкубируют с первым антителом, мишенью которого является потенциальный поверхностный антиген, и после стадии промывки инкубируют со вторым антителом, мишенью которого является Fc-домен первого антитела. Это второе антитело метят флуорофором или ферментом типа HRP (пероксидаза из хрена) для того, чтобы визуализировать экспрессию антигенов-мишеней. Панели антител, которые можно применять для целей высокопроизводительного профилирования антигенов поверхностных антигенов клеток поступают в продажу от различных производителей.

Кроме того, специфические инструменты для высокопроизводительной протеомной клеточной характеристики, предназначенные для идентификации и анализа экспрессии белков клеточной поверхности, поступают в продажу, например, в виде набора для осуществления основанной на FACS (флуоресцентный метод разделения клеток) высокопроизводительной агау-технологии BD FACS™ CAP ((Combinational Antibody Profile), комбинаторное профилирование антител) фирма Becton, Dickinson & Company.

Иммуноцитохимическому/иммуногистохимическому/протеомному анализу, описанному выше, может предшествовать (или в некоторых случаях заменять его) профилирование экспрессии широкого спектра геномов опухолевых клеток или масс-спектрометрический анализ белков, которые экспрессируются представляющими интерес опухолевыми клетками/тканью. Например, определение профиля экспрессии широкого спектра геномов опухолевых клеток можно осуществлять для контроля экспрессии различных молекул клеточной поверхности, и присутствие указанных антигенов на клеточной поверхности опухолевых клеток затем можно подтверждать с помощью метода окрашивания на основе антител, которые описаны выше.

Дополнительную информацию о подходах к характеристике поверхностных антигенов (раковых) клеток можно почерпнуть из соответствующей научной литературы (например, Zhou J., Belov L., Huang

P. Y., Shin J.S., Solomon M.J., Chapuis P.H., Bokey L., Chan C, Clarke C, Clarke S.J., Christopherson R.I., Surface antigen profiling of colorectal cancer using antibody microarrays with fluorescence multiplexing, *J Immunol Methods*, 355, 2010, с. 40-51; или Carter P., Smith L., Ryan M., Identification and validation of cell surface antigen for antibody targeting in oncology, *Endocr Relat Cancer*, 11, 2004, с. 659-687).

На следующей стадии специалист в данной области может идентифицировать среди расположенных на поверхности клеток антигенов опухолевых клеток комбинацию из двух антигенов, которые не экспрессируются одновременно на других типах клеток.

Часто уже на стадии изучения литературы или публично доступных баз данных можно получать подробную информацию о присутствии или отсутствии антигенов из других типов клеток.

Экспрессия различных молекул клеточной поверхности на различных клеточных типах систематически изучена исследователями в последние несколько десятилетий с помощью иммунофенотипирования и профилирования геной экспрессии практически на всех клеточных типах организма. Например, подробная информация об экспрессии более 360 антигенов "кластера дифференцировки" (или CD-антигенов) опубликована в научной литературе (например, Zola H., Swart B., Nicholson I. и Voss E., "Leukocyte and Stromal Cell Molecules: The CD Markers", изд-во Wiley & Sons, 1-е изд., 2007) и доступна в онлайн-режиме в депозитариях (e.g. www.hcdm.org/MolecularInformation/tabid/54/Default.aspx), и она включает информацию о распределении в тканях и уровнях экспрессии антигенов, а также информацию о реактивных в отношении антигенов антителах и эпитопах, с которым связываются указанные антитела.

Кроме того, существуют доступные публичные базы данных, в которых есть доступ к большому количеству данных о геномах, полученных научным сообществом. Например, в платформе для анализа геной экспрессии Gene Expression Omnibus (GEO) Национального центра по биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) США (Barrett T. и др., NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--10 years on. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Database issue):D1005-10) заархивирована и доступна гигантская коллекция микроэкреев (микрочипов), данных, полученных методом секвенирования следующего поколения, и других форм полученных высокопроизводительными методами данных о функции генома, и дополнительно представлены веб-интерфейсы и приложения для легкого доступ к указанной информации (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

После того, как с помощью указанных исследований идентифицирована пара из двух антигенов, которая, вероятно, отсутствует на других клеточных типах, кроме представляющих интерес опухолевых клеток, специалист в данной области легко может осуществить валидацию приемлемости комбинации антигенов для дальнейшей разработки конструкций, включающих P1- и P2-полипептиды. Указанную валидацию того, что идентифицированная комбинация двух антигенов действительно не экспрессируется одновременно на других типах клеток, кроме опухолевых клеток, можно осуществлять с помощью иммуногистохимических/иммуноцитохимических анализов (оптимально крупной) коллекции отсортированных клеточных типов и/или тканей с использованием антител к двум антигенам. Клетки и ткани любого типа можно получать из АТСС (Американская коллекция типовых культур), из департаментов патологии и их банков тканей университетов и исследовательских институтов. Приемлемая комбинация антигенов определяется парой антител, которые окрашивают исключительно опухолевые клетки, но не окрашивают здоровые ткани или здоровые клетки (т.е. оба антитела из пары окрашивают опухолевые клетки, но оба антитела не окрашивают никакие другие ткани/клетки).

Следует отметить, что, хотя во многих ситуациях желательной естественно является наивысшая степень специфичности (предпочтительно абсолютная специфичность), существуют ситуации, в которых возможна более низкая степень специфичности. Например, если набор полипептидов применяют для диагностических целей, то некоторая степень перекрестной реактивности с другими клеточными типами или тканями может быть допустима (особенно в случае плотных (солидных) опухолей, поскольку дополнительная позиционная информация помогает отличать опухолевые клетки от дающих перекрестную реакцию клеток). Кроме того, если набор полипептидов применяют для терапевтических целей, то некоторая степень перекрестной реактивности с другими клеточными типами или тканями также может быть допустима в зависимости от серьезности заболевания у подлежащего лечению пациента и от клеточных типов/тканей, которые могут поражаться вследствие перекрестной реактивности. Другие ситуации, в которых меньшая степень специфичности может оказаться приемлемой, могут возникать в контексте процедуры трансплантации (см. ниже).

В случаях, когда сведений о приемлемой комбинации антигенов не удается получить из литературы или публичных баз данных, присутствие/отсутствие антигенов клеточной поверхности опухолевых клеток из других клеточных типов можно выявлять с помощью несложных экспериментов. Для этой цели широкое разнообразие клеточных типов и/или тканей, полученных из указанных выше источников, можно подвергать протеомной характеристике клеток, иммуноцитохимическому/иммуногистохимическому анализу и/или профилированию геной экспрессии. (Следует отметить, что указанный анализ неопухолевых клеток/тканей следует осуществлять только для получения данных, которые можно использовать для создания различных конструкций, которые можно адаптировать для широкого разнообразия терапевтических или диагностических ситуаций). Путем сравнения полученных результатов с информацией об антигенах клеточной поверхности представляющих интерес опухолевых клеток, легко можно идентифи-

цировать комбинацию двух антигенов, которые не присутствуют на каких-либо других клетках кроме представляющих интерес опухолевых клеток.

Аналогичный системный подход для идентификации пары из двух антигенов, которая является специфической для опухолевых клеток, описан также в современной публикации Balagurunathan, которая основана на определении профиля экспрессии широкого спектра геномов с последующим иммуногистохимическим анализом (Yoganand Balagurunathan, Gene expression profiling-based identification of cell-surface targets for developing multimeric ligands in pancreatic cancer, *Mol Cancer Ther*, 7, 2008 сс. 3071-3080). Используя микро ДНК-микрочипы (микроэррей) авторы статьи создали базы данных профилей генной экспрессии мРНК для значительного количества видов рака поджелудочной железы и образцов здоровой ткани. Данные об экспрессии генов, кодирующих молекулы клеточной поверхности, анализировали с помощью компьютеризированного подхода, основанного на правиле мультивариантности, для того, чтобы идентифицировать комбинации генов, которые экспрессируются главным образом на опухолевых клетках, но не в здоровых тканях. Аномальную коэкспрессию антигенов, входящих в специфическую для опухоли комбинацию антигенов, затем подтверждали с использованием стандартных иммуногистохимических методов на ткани опухоли поджелудочной железы и микрочипах здоровых тканей.

Располагая идентифицированной и валидированной указанной комбинацией антигенов, которая является специфической для представляющих интерес опухолевых клеток, можно создавать конструкции полипептида P1 и полипептида P2 с помощью стандартных методик белковой инженерии и методов молекулярной биологии (см., например, G. Howard и M. Kaser, *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook*, изд-во CRC Press, 1-е изд., 2006; Sambrook и др., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001).

Для многих расположенных на клеточной поверхности молекул специфические моноклональные антитела охарактеризованы и в результате легкодоступны. Так, во многих случаях специалист в данной области может иметь доступные клетки гибридомы, секретирующие моноклональные антитела, которые являются специфическими для антигенов из идентифицированной комбинации антигенов. Имея возможность выбирать из панели антител, специфических в отношении данного антигена, специалист в данной области может выбирать реактивное антитело, которое связывается с эпитопом, близким к мембране, для того, чтобы минимизировать расстояние между антигеном, экспрессируемым клеткой, и эффекторной клеткой (Blumel C., Hausmann S., Fluhr P., Sriskandarajah M., Stallcup W.B., Baeuerle P.A., Kufer P., Epitope distance to the target cell membrane and antigen size determine the potency of T cell-mediated lysis by BiTE antibodies specific for a large melanoma surface antigen, *Cancer Immunol. Immunother*, 59(8), август 2010 г., с. 1197-1209). Если недоступно антитело к одному или обоим антигенам из идентифицированной комбинации антигенов, то моноклональные антитела к антигенам можно создавать с помощью стандартных методик (см., например, G. Howard и M. Kaser, *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook*, изд-во CRC Press, 1-е изд., 2006). Кроме того, различные компании предлагают полный спектр услуг по созданию на заказ моноклональных антител и клеток гибридомы.

ДНК или мРНК, кодирующие варибельные домены представляющих интерес моноклональных антител, можно получать из гибридом с помощью ПЦР-амплификации или клонирования (Orlandi R., Gussow P.T., Jones, Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(10), 1989, с. 3833-3837; Wang Z., Raifu M., Howard M., Smith L., Hansen D., Goldsby R., Ratner D., Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *J Immunol Methods*, 233(1-2), 2000, с. 167-177; Essono S., Frobert Y., Grassi J., Cremino C, Boquet D., A general method allowing the design of oligonucleotide primers to amplify the variable regions from immunoglobulin cDNA. *J Immunol Methods*, 279, 2003, с. 251-266; G. Howard и M. Kaser, *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook*, изд-во CRC Press, 1-е изд., 2006) или из уже созданных векторов, содержащих ДНК-последовательность варибельного фрагмента соответствующего антитела. Часто данные о последовательности можно получать из публичных баз данных, в которых депонировано много последовательностей, и затем конструкцию можно даже получать путем генного синтеза, поскольку она предлагается различными коммерческими службами провайдеров (например, фирмой Creative Biolabs, Ширли, США).

Для получения конструкции полипептида P1 последовательность, кодирующую варибельный фрагмент Fv антитела, специфического в отношении первого антигена из идентифицированной пары антигенов (или необязательно последовательность одноцепочечного варибельного фрагмента, выведенного из указанной последовательности), применяют для первого нацеливающего участка (T1) и связывают через приемлемый линкер (кодирующий, например, менее 12 ак) с последовательностью, которая кодирует первый фрагмент F1 функционального домена (например, V_L-домен антитела к CD3). Аналогично этому, для получения конструкции полипептида P2 последовательность, кодирующую варибельный фрагмент Fv антитела, специфического в отношении второго антигена из идентифицированной пары антигенов (или необязательно последовательность одноцепочечного варибельного фрагмента, выведенного из указанной последовательности), применяют для второго нацеливающего участка (T2) и связывают через приемлемый линкер с последовательностью, которая кодирует второй фрагмент F1 функционального домена (например, V_H-домен антитела к CD3).

Для любой конструкции полипептида P1 или P2, можно применять модификации конструкции или последовательностей, которые используют для создания конструкции, для того, чтобы адаптировать конструкцию к конкретным целям. Например, конструкцию можно модифицировать для снижения или устранения ее иммуногенности для людей. Если последовательность получают из родительского антитела животного кроме человека, такого как мышинное антитело, то можно осуществлять модификации последовательности, которые приводят к пониженной иммуногенности для людей с сохранением или практически с сохранением антигенсвязывающих свойств родительского антитела (специалисту в данной области такой подход известен под термином "гуманизация" антитела/конструкции).

Специалисту в данной области очевидны различные модификации описанной выше процедуры для соответствия представленным в настоящем описании вариантам осуществления изобретения и их вариациям.

Помимо вариаций, затрагивающих антигены, с которыми специфически связываются нацеливающие участки T1 и T2, возможны различные другие модификации. Например, вместо одноцепочечных варибельных фрагментов (scFv) в качестве нацеливающих участков T1 и/или T2 можно применять другие типы одновалентных антител или антителоподобных структур. Например, можно применять антитело/антителоподобную структуру из лам, верблюдов или акул. Поскольку антитела лам, верблюдов и акул имеют антигенсвязывающий участок, состоящий из одного единичного домена (в отличие от V_H- и V_L-цепи), образовавшийся полипептид P1 или P2 имеет существенно меньший размер и поэтому может лучше проникать в ткани опухоли.

Кроме того, поскольку многие соответствующие опухолям антигены представляют собой связанные с клеточной поверхностью рецепторы, то одноцепочечный Fv нацеливающего участка T1 и/или T2 можно заменять на встречающийся в естественных условиях или искусственный лиганд, такой как связанный с клеточной поверхностью рецептор. Подобно антителам указанные встречающиеся в естественных условиях или искусственные лиганды придают очень высокую специфичность в отношении рецептора-мишени. Альтернативно этому, нацеливающий участок T1 и/или T2 может представлять собой аптамер.

Кроме того, для повышения аффинности связывания нацеливающего участка с антигеном нацеливающий участок можно мультимеризировать и/или изменять путем гликозилирования или других типов пост-трансляционной или химической модификации или можно оптимизировать с помощью сайтнаправленного мутагенеза или процесса отбора на основе фагового дисплея.

Кроме того, фрагменты F1 и F2 (т.е. V_L- и V_H-фрагменты Fv антитела к CD3) можно заменять на фрагменты другого функционального домена F с получением другого биологического действия после комплементации двух фрагментов. Путем использования фрагментов антитела к CD56, антитела к CD1a или антитела к CD16a можно осуществлять рекрутмент и активацию естественных клеток-киллеров. Путем использования фрагментов антитела к CD16 можно осуществлять рекрутмент и активацию естественных клеток-киллеров, нейтрофильных полиморфноядерных лейкоцитов, моноцитов и макрофагов. Путем использования фрагментов антитела к CD32a, антитела к CD32b, антитела к CD89, антитела к CD16a или антитела к CD64 можно осуществлять рекрутмент и активацию макрофагов. Путем использования фрагментов антитела к CD32a, антитела к CD32b, антитела к CD64 или антитела к CD89 можно осуществлять рекрутмент и активацию моноцитов. Путем использования фрагментов антитела к CD16b, антитела к CD89, антитела к CD32a, антитела к CD32b или антитела к CD64 можно осуществлять рекрутмент и активацию гранулоцитов. Кроме того, альтернативно применению анти-CD3, можно также можно осуществлять рекрутмент и активацию T-клеток путем использования фрагментов антитела к CD2, антитела к CD5, антитела к CD28 или антитела к TCR (T-клеточный рецептор). Дополнительную информацию или дополнительные варианты, касающиеся рекрутмента и активации эффекторных клеток посредством связывания с антителом, можно почерпнуть из опубликованной литературы, например, из "Bispecific Antibodies", под ред. Roland E. Kontermann, изд-во Springer Berlin Heidelberg; 1-е изд., 2011.

Дополнительным вариантом является применение набора полипептидов P1 и P2 с фрагментами F1 и F2 функционального домена F, которые связываются с антигеном на эффекторной клетке после комплементации двух фрагментов, но при этом связывание с указанным антигеном эффекторной клетки не может вызывать активацию указанной эффекторной клетки. Такой набор полипептидов ("первый набор полипептидов") затем применяют (например, вводят пациенту) в сочетании со вторым набором полипептидов с фрагментами функционального домена F, который после комплементации связывается со вторым, отличным от первого антигеном на этой же эффекторной клетки, но при этом и в данном случае связывание эффекторной клетки с указанным антигеном не может вызывать активацию эффекторной клетки. Антигены, с которыми связываются первый и второй наборы полипептидов, выбирают так, что, хотя связывание только одного из двух антигенов на эффекторной клетке не приводит к активации эффекторной клетки, одновременное связывание обоих антигенов на эффекторной клетке приводит к активации эффекторной клетки. Преимущества указанного подхода состоят в том, что (1) можно применять антигены на эффекторных клетках, которые не функционируют индивидуально, а нуждаются в коstimуляции второго антигена, и (2) количество различных антигенов, обуславливающих специфичность, благодаря которой определенная клетка (такая как раковая клетка) отличается от других клеток, можно по-

вышать с двух (если первый и второй набор полипептидов имеют одинаковые нацеливающие участки T1 и T2 соответственно) вплоть до четырех различных антигенов (если первый и второй набор полипептидов не имеют общих нацеливающих участков).

Аналогичных действий можно достигать с помощью двух наборов полипептидов с различными нацеливающими участками, но с одинаковым функциональным доменом: указанные наборы полипептидов создают так, чтобы они имели функциональный домен, направленный против антигена эффекторной клетки, который в норме позволяет каждому набору полипептидов индивидуально активировать эффекторную клетку. Однако оба набора полипептидов применяют в концентрации, которая является слишком низкой, чтобы вызывать эффективную активацию эффекторной клетки. Если в обоих наборах полипептиды присутствуют одновременно (например, их одновременно вводят пациенту), то каждый набор полипептидов сам по себе не обладает способностью активировать эффекторную клетку (из-за его слишком низкой концентрации), в то время как комбинация обоих наборов (поскольку два набора действуют синергетически, в чью результате сумма действий, вызываемых двумя наборами полипептидов, оказывается достаточной для активации эффекторной клетки).

Другой альтернативой рекрутмента/активации эффекторных клеток может являться подход "предварительного нацеливания", который детально разработан для конструкций биспецифических антител (Goldenberg D.M., Chatal J.F., Barbet J., Boerman O., Sharkey R.M., *Cancer Imaging and Therapy with Bispecific Antibody Pretargeting*, Update Cancer Ther. 2(1), март 2007 г., с. 19-31). Для этой цели F1 и F2 заменяют V_H- и V_L-фрагментами антитела, специфического для антигена, молекулы-носителя (т.е. молекулы/части молекулы, которая не распознается как чужеродная иммунной системой пациента, которому вводят набор полипептидов, или молекула, которая не вызывает вообще или вызывает лишь слабый иммунный ответ у пациента, которому ее вводят), или аффинной метки. Затем (или одновременно) с введением полипептидов P1 и P2 вводят терапевтическое или диагностическое соединение, сшитое с указанным антигеном, молекулой-носителем или аффинной меткой. Только клетки, которые несут оба антигена A1 и A2 на их поверхности, связываются как с полипептидом P1, так и с полипептидом P2. Таким образом, только на этих клетках функциональная комплементация приводит к созданию сайта связывания, способного обеспечивать привлечение терапевтического или диагностического соединения посредством указанного антигена, молекулы-носителя или аффинной метки. Такой подход позволяет обеспечивать направленность исключительно к клеткам мишеням в сочетании с возможностью точного введения и дозирования терапевтических соединений типа токсинов или радиоактивных субстанций, или диагностических соединений, но при этом отсутствует воздействие на клетки, которые не экспрессируют антигены или которые экспрессируют только один из антигенов.

Приемлемая молекула-носитель может представлять собой пептидную или углеводную молекулу. Предпочтительно молекула-носитель может представлять собой желатин, декстран или гидроксипропилкрахмал, которые являются обычными метаболически инертными наполнителями плазмы, сохраняются в крови и, если они являются достаточно малыми, элиминируются почками. Альтернативно этому, молекула-носитель может представлять собой инулин, метаболически инертную молекулу, которую, как правило, применяют для клинического определения клубочкового клиренса (и, кроме того, известны антитела, которые специфически распознают инулин).

Приемлемой аффинной меткой может быть, например, Flag-метка, мус-метка, глутатион-S-трансферазная (GST)-метка, гемагглютининовая (HA)-метка, полигистидиновая (His)-MeTKa или метка, представляющая собой связывающий мальтозу белок (MBP), диоксигениновая (DIG)-метка.

Терапевтическое соединение, сшитое с антигеном, молекулой-носителем или аффинной меткой, может представлять собой, например, радиоактивное соединение или токсин.

Приемлемыми радиоактивными соединения являются, например, соединения, которые содержат ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, ¹³¹I, ³²P, ¹⁰B или ²¹³Bi. Привлечение антигена, молекулы-носителя или аффинной метки, сцепленной с радиоактивным соединением, к клеткам, которые экспрессируют и первый, и второй антиген, приводит к накоплению радиоактивности в области опухоли, что приводит к специфической деструкции опухолевых клеток/ткани.

Альтернативно этому, терапевтическое соединение, сцепленное с антигеном, молекулой-носителем или аффинной меткой, может представлять собой, например, токсическое соединение, которое не обладает способностью проходить через клеточную мембрану без предварительного связывания с клеточной поверхностью.

Этому условию удовлетворяют А-компоненты классических АВ-токсинов, выведенных из целого ряда патогенных бактерий типа *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, *C. difficile*, *B. anthracis* и др. АВ-токсины представляют собой двухкомпонентные белковые комплексы, которые оказывают воздействие на внутренние клеточные функции. А-компонент представляет собой "активный" компонент (т.е. он уничтожает клетку после проникновения через мембрану), но он сам не может проходить через мембрану. В-компонент представляет собой "связывающий" компонент, который сам является нетоксичным, но играет существенную роль в поглощении мембраной и проникновении через нее компонента А.

Например, протективный антиген *Bacillus anthracis* (PA) является классическим В-компонентом токсина, который опосредует поглощение фактических эндотоксинов фактора отека и летального факто-

ра (LF) сибирской язвы. LF без РА-компонента является нетоксичным, поскольку LF сам не может проникать через мембрану и поэтому не может проявлять свои патогенные свойства (Pezard C, Berche P., Mock M. "Contribution of individual toxin components to virulence of *Bacillus anthracis*" *Infect. Immun.* 59 (10), 1991, с. 3472). Однако после связывания с молекулами клеточной поверхности LF интернализуется и обладает высокой токсичностью для клетки.

После димеризации полипептидов P1 и P2 функция функционального домена F реконструируется. Благодаря взаимодействию реконструированного функционального домена с антигеном, молекулой-носителем или аффинной меткой, сшитых с токсином, происходит привлечение токсина к клеточной мембране клеток-мишеней, включение в клетки и уничтожение клеток.

Специалисту в данной области должно быть очевидно, как адаптировать указанный принцип для целей изобретения, поскольку он уже широко используется в так называемых иммунотоксинах, в которых нацеливающий участок, чаще всего антителоподобный домен или встречающийся в естественных условиях лиганд, сшиваются с компонентом токсина (см., например, *Immunotoxins for targeted cancer therapy* (Kreitman R.J., AAPS J. 18;8(3), август 2006 г., с. 532-551). Примерами являются иммунотоксины на основе дифтерийного токсина (такие как Денилейкин дифтитокс (U.S. товарный знак Ontak), который разрешен FDA для лечения некоторых Т-клеточных лимфом) или на основе летального фактора *B. anthracis* (Pastan I, Hassan R., FitzGerald D.J., Kreitman R.J. "Immunotoxin treatment of cancer". *Annu. Rev. Med.* 58, 2007, с. 221-237).

Приемлемыми А-компонентами АВ-токсинов могут являться, например, фактор отека *B. anthracis*, летальный фактор *B. anthracis*, йота-токсин *C. perfringens*, С2-токсин *C. botulinum* С2, АДФ-рибозилтрансфераза *C. difficile*, фрагмент А дифтерийного токсина *C. diphtheriae*.

Альтернативно этому, терапевтическое соединение может представлять собой, например, цитотоксическое соединение, которое является токсичным после проникновения в клетку и обладает способностью проникать через клеточную мембрану само без предварительного связывания с клеточной поверхностью. В этом случае антиген, молекулу-носитель или аффинная метка, с которыми сшивают терапевтическое соединение, выбирают так, чтобы они препятствовали проникновению через клеточную мембрану и проникновению в клетку образовавшемуся конъюгату (т.е. терапевтическому соединению, связанному с антигеном/молекулой-носителем/аффинной меткой) до предварительного связывания конъюгата с клеточной поверхностью (приемлемая молекула-носитель может представлять собой, например, гидроксипропилкрахмал). Таким образом, указанный конъюгат не проникает в клетки без предварительного связывания с клеточной поверхностью; однако после связывания указанного конъюгата с клеточной поверхностью он интернализуется в клетку и токсическое соединение уничтожает клетку. Конъюгат не может связываться с клеткой, если только он не привлекается благодаря присутствию предлагаемого в изобретении набора полипептидов к клеткам, на которых происходит одновременная экспрессия обоих антигенов А1 и А2 на их клеточной поверхности. Указанные клетки связывают и рекрутируют оба полипептида Р1 и Р2 и реконструированный функциональный домен специфически связывается и рекрутирует антиген/молекулу-носитель/аффинную метку, что, в свою очередь, приводит к интернализации терапевтического соединения. В результате происходит специфическое уничтожение клеток, которые несут оба антигена А1 и А2 на своей поверхности. Цитотоксические соединения, которые можно применять в этом контексте, включают, например, ауристин, рицин, сапонин, бриодин 1, боуганин, гелонин, анти-вирусный белок фитоллаки американской (РАР), антифолаты, алкалоиды барвинка, антрациклины, калихеамицин, рибонуклеазу, абрин, модецин или листериолизин О.

Диагностическое соединение, сшитое с антигеном, молекулой-носителем или аффинной меткой, может представлять собой, например, радиоактивное соединение, флуорофор или соединение, обладающее способностью опосредовать биолюминесценцию.

Приемлемыми радиоактивными соединениями являются, например соединения, содержащие ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{82}Kb или ^{201}Tl . Указанные соединения можно выявлять в клинических условиях с помощью хорошо известных медицинских процедур визуализации.

Альтернативно этому, в качестве диагностического соединения можно применять флуоресцентное соединение, такое как GFP (зеленый флуоресцентный белок) или вариант GFP (например, BFP (синий флуоресцентный белок), CFP (циановый флуоресцентный белок) или YFP (желтый флуоресцентный белок)) или флуоресцентное низкомолекулярное соединение типа ФИТЦ (флуоресцеинизотиоцианат) или ФЭ (фикоэритрин), красители alexa fluor (такие как AlexaFluor488 и аналогичные красители фирмы Molecular Probes, например) или цианиновые красители (такие как Cy3 (индокарбоцианин) или Cy5 (индикарбоцианин) или аналогичные красители).

Альтернативно этому, в качестве диагностического соединения можно применять соединение, которое обладает способностью опосредовать биолюминесценцию, такое как люцифераза, например, люцифераза *Gaussia* (Chopra A. *Gaussia princeps luciferase*, в: *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* (онлайн база данных), Бетезда, шт. Мэриленд, National Library of Medicine (US), NCBI; 2004-2012, доступна на сайте: <http://micad.nih.gov>). Применение люциферазы *Gaussia* для визуализации *in vivo* хорошо известно (см., например, Santos E.B. и др., *Sensitive in vivo imaging of T cells using a membrane-bound Gaussia princeps luciferase*, *Nat Med.*, 15(3), март 2009 г., с. 338-344. Epub 2009 от 15 февраля;

или Inoue Y. и др., *Gaussia luciferase for bioluminescence tumor monitoring in comparison with firefly luciferase*, *Mol Imaging*. 1; 10(5), октябрь 2011, с. 377-385. doi: 10.2310/7290.2010.00057, Epub, 26 апреля 2011 г., см. также ниже более подробное описание).

Кроме того, фрагменты F1 и F2 (т.е. V_L- и V_H-фрагменты Fv антитела к CD3) можно заменять на V_L- и V_H-фрагменты антитела, специфического в отношении терапевтического или диагностического соединения (т.е. в этом случае функциональный домен F обладает способностью непосредственно связываться с терапевтическим или диагностическим соединением). В этом случае можно применять те же терапевтические и диагностические соединения, которые описаны выше в контексте подхода "предварительного нацеливания".

Кроме того, фрагменты F1 и F2 (т.е. V_L- и V_H-фрагменты Fv антитела к CD3) можно заменять на фрагменты флуоресцентного или биoluminesцентного соединения, которое само является биологически неактивным, но приобретает свою функцию (т.е. способность опосредовать флуоресценцию или биoluminesценцию) после ассоциации двух фрагментов и функциональной комплементации, позволяя тем самым осуществлять специфическую идентификацию клеток, которые несут оба антигена A1 и A2.

Ряд флуоресцентных молекул, которые можно применять в данном контексте, хорошо известны и охарактеризованы в данной области, они включают (но, не ограничиваясь только ими) GFP (зеленый флуоресцентный белок), производные GFP (типа YFP (желтый флуоресцентный белок) и CFP (циановый флуоресцентный белок), Venus (Nagai T. и др., *A variant of yellow fluorescent protein fast and efficient maturation for cell-biological applications*. *Nat Biotechnol*. 20(1), январь 2002 г., с. 87-90) или Cerulean (усиленный CFP с заменами S72A, Y145A и H148D)). Для этих молекул, описаны расщепленные фрагменты, способные к самосборке в ситуации создания тесной близости в процессе так называемой бимолекулярной флуоресцентной комплементации (BiFC).

Например, GFP, CFP, Venus, Venus с M153T-заменой или Cerulean можно расщеплять за аминокислотой 155 (т.е., например, фрагмент F1 может содержать аминокислоты 1-155 GFP, а фрагмент F2 может содержать аминокислоты 156-245 GFP или наоборот). Альтернативно этому, YFP или Venus можно расщеплять за аминокислотой 173. Дополнительные подробности расщепленных GFP и расщепленных вариантов GFP описаны у Kerppola T.K., *Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation*. *Chem Soc Rev*. 38, 2009, с. 2876-2886.

Примером молекулы, которая опосредует биoluminesценцию и которую можно применять в данном контексте, является расщепленная люцифераза. Наиболее пригодной является люцифераза глубоководного морского рачка *Gaussia princeps*, которой не требуются кофакторы для проявления активности и способности катализировать окисление субстрата из представителей типа кишечнополостных (медуз) люциферина (коелентеразин) в реакции, в которой испускается синий цвет, или производные люциферазы *Gaussia* (Remy I. и Michnick S., *A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase*. *Nature Methods* - 3, 2006, с. 977-979). Например, фрагмент F1 может содержать фрагмент из N-конца люциферазы *Gaussia*, простирающийся до Gly-93, а фрагмент F2 может содержать фрагмент, простирающийся от Glu-94 до C-конца люциферазы *Gaussia*, или наоборот (см. подробно у Remy I. и Michnick S., *Nature Methods*, 2006). Разработано применение расщепленной люциферазной системы *Gaussia in vivo* (Luker и др., *In vivo imaging of ligand receptor binding with Gaussia luciferase complementation*, *Nature Medicine* 2011, doi:10.1038/nm.2590), которое специалист в данной области легко может адаптировать для целей настоящего изобретения.

Прижизненная визуализация опухолевых повреждений является чрезвычайно важной в случаях, когда раковые клетки инфильтруются в ткани, и полная элиминация всех трансформированных клеток является предпосылкой исцеления. Для поиска во время операции диссеминированных раковых клеток в операционном поле можно применять GFP или расщепленные производные GFP, слитые с нацеливающими участками, и лазер, снабженный системой мультиспектральной флуоресцентной камеры, для детекции клеток с аномальной экспрессией целевого антигенного профиля, аналогично внутриоперативному применению флуоресценции или биoluminesценции, что уже используется в некоторых клинических процедурах (van Dam G.M. и др., *Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor-a targeting: first in-human results*, *Nat Med*. 18;17(10), сентябрь 2011 г., с. 1315-1319; Luker и др., *In vivo imaging of ligand receptor binding with Gaussia luciferase complementation*. *Nature Medicine* 2011, doi:10.1038/nm.2590).

Для детекции комплементированной расщепленной люциферазы обязательно применение субстрата для люциферазы, который может представлять собой люциферин или коелентеразин. Коелентеразин является предпочтительным, поскольку коелентеразин испускает свет, не зависящий от АТФ, и хорошо изучен для визуализации *in vivo* и применений *in vivo*. Хирург может визуализировать раковые клетки после мечения опухоли с помощью полипептида P1 и P2 и внутривенной инъекции в нетоксичном количестве коелентеразина.

Заявляемый принцип можно рассматривать в контексте пациента, который страдает гематопозитической опухолью и которому трансплантированы здоровые гематопозитические клетки другого индивидуума (донора). При этом набор полипептидов, предлагаемых в изобретении, можно использовать для спе-

цифической элиминации (или детекции) оставшихся злокачественных гематопоэтических клеток реципиента после трансплантации здоровых гематопоэтических клеток донора.

Для деструкции злокачественных гематопоэтических клеток в организме пациента, страдающего гематопоэтической опухолью, пациента можно подвергать химиотерапии и/или лучевой терапии. После этого пациенту трансплантируют здоровые гематопоэтические клетки донора.

Для минимизации риска отторжения трансплантата или реакции трансплантат-против-хозяина, как правило, является предпочтительной трансплантация ткани/клеток (например, костного мозга) донора, которая(ые) имеет(ют) такой же набор молекул ГКГ (главный комплекс гистосовместимости). Однако часто не удается найти донора с таким же набором молекул ГКГ ("HLA-идентичный донор"). По этой причине возрастает применение трансплантатов с одним или двумя мисмэтчами в наборе вариантов ГКГ, с несоответствующей пуповинной кровью, включающей вплоть до трех мисмэтчей, или гаплоидентичных трансплантатов. Таким образом, как правило, присутствует по меньшей мере одно характерное (отличительное) различие между набором молекул ГКГ, который экспрессируются клетками реципиента, и клетками донора.

При трансплантации используют клетки донора, отличающиеся от клеток реципиента по меньшей мере одним HLA-вариантом. Это означает, что по меньшей мере один "отличительный антиген" присутствует на клеточной поверхности клеток реципиента, но не на клеточной поверхности клеток донора. Например, отличительный антиген может представлять собой HLA-A2, если пациент (т.е. реципиент) является HLA-A2-позитивным, а донор является HLA-A2-негативным.

Несмотря на химиотерапию/лучевую терапию, отдельные злокачественные гематопоэтические клетки реципиента могут избегать уничтожения. Поскольку выжившие злокачественные гематопоэтические клетки являются клетками реципиента, то они несут отличительный антиген, позволяющий различать клетки реципиента и клетки донора. В то же время они представляют собой клетки из гематопоэтической клеточной линии дифференцировки и поэтому имеют маркеры этой клеточной линии дифференцировки, например, CD45, на своей клеточной поверхности. Лейкозные бласты и другие гематопоэтические клетки пациента представляют собой только те клетки, которые одновременно экспонируют отличительный антиген (в данном случае HLA-A2) и маркеры гематопоэтической клеточной линии дифференцировки (в данном случае CD45). По этой причине с помощью набора полипептидов, предлагаемого в изобретении, можно специфически элиминировать указанные клетки.

Для этой цели первый нацеливающий участок T1 первого полипептида P1 может являться scFv-специфическим для отличительного антигена, который присутствует только на клетках реципиента (в данном случае HLA-A2). В качестве фрагмента F1 функционального домена F можно выбирать варируемую область легкой цепи (V_L) CD3 ϵ -специфического антитела. Вторым нацеливающим участком T2 второго полипептида P2 может представлять собой одноцепочечный варируемый фрагмент (scFv), специфический в отношении CD45. В качестве фрагмента F2 функционального домена F можно выбирать варируемую область тяжелой цепи (V_H) указанного CD3 ϵ -специфического антитела. (Естественно, что равным образом можно применять варируемую область тяжелой цепи (V_H) CD3 ϵ -специфического антитела в качестве фрагмента F1 и варируемую область легкой цепи (V_L) указанного CD3 ϵ -специфического антитела в качестве фрагмента F2. Как должно быть очевидно специалисту в данной области, вышеуказанное является общим принципом, и, как правило, можно менять местами фрагменты, применяемые в качестве фрагмента F1 и фрагмента F2). Ни V_L CD3 ϵ -специфического антитела не может привлекаться к CD3 ϵ в отсутствие V_H , ни V_H CD3 ϵ -специфического антитела не может привлекаться к CD3 ϵ в отсутствие V_L . Таким образом, ни P1, ни P2, сами по себе не обладают способностью связываться с CD3 ϵ .

Однако, если и отличительный антиген (например, HLA-A2) и антиген CD45 присутствуют на одной индивидуальной клетке, то связывание их с соответствующими антигенами приводит к тому, что два полипептида P1 и P2 оказываются в непосредственной близости друг от друга. В результате этого неспаренные V_H - и V_L -домены объединяются, что приводит к гетеродимеризации полипептидов P1 и P2 и образованию из V_H - и V_L -доменов функционального варируемого фрагмента антитела Fv, который обладает способностью связываться с CD3 ϵ (см. фиг. 2).

В результате происходит рекрутмент и активация T-клеток посредством CD3 ϵ , и клетка, которая несет и HLA-A2, и CD45 на своей клеточной поверхности, специфически элиминируется благодаря цитотоксическому T-клеточному ответу.

Специалисту в данной области должно быть очевидно, что в соответствии с принципом настоящего изобретения возможны различные модификации этого указанного в качестве примера варианта осуществления изобретения.

Например, в полипептиде P2 scFv-фрагмент, который распознает маркер гематопоэтической клеточной линии дифференцировки CD45, можно заменять на scFv-фрагмент, который распознает маркер другой клеточной линии дифференцировки или другого клеточного типа, т.е. нацеливающий участок T2 может представлять собой домен, который специфически связывается с антигеном, специфическим в отношении клеточной линии дифференцировки, отличной от гематопоэтической клеточной линии диф-

ференцировки, или в отношении определенного клеточного типа (подробный перечень маркеров различных клеточных линий дифференцировки и маркеров клеточных типов, которые можно применять в указанном контексте, см. у David J. Dabbs, *Diagnostic immunohistochemistry*, изд-во Churchill Livingstone, 3-е изд., 2010 или у F. Lin и J. Prichard, *Handbook of Practical Immunohistochemistry: Frequently Asked Questions*, изд-во Springer, New York, 1-е изд., 2011). Для адаптации набора полипептидов к маркеру альтернативной клеточной линии дифференцировки/маркеру клеточного типа, достаточно заменить нацеливающий участок T2 полипептида P2 на нацеливающий участок, который может специфически связываться с маркером требуемой альтернативной клеточной линии дифференцировки/маркером клеточного типа.

Например, в том случае, если представляющими интерес клетками являются клетки метастатической почечно-клеточной карциномы (RCC), специалист в данной области может осуществлять поиск в указанных выше базах данных в отношении информации о белках клеточной поверхности, экспрессия которых ограничена клетками почки. Специалист может получить информацию о том, что среди многих других молекул экспрессия определенных представителей семейства аквапоринов ограничена клетками почки и эритроцитами. После получения указанной информации специалист в данной области может сконструировать полипептид P2, который распознает представителя семейства аквапоринов, который присутствует только на клетках почки и эритроцитах, слитый с вариабельной областью тяжелой цепи (V_H) CD3ε-специфического антитела. В том случае, когда пациент, страдающий почечно-клеточной карциномой, является HLA A2-позитивным, а трансплантат почки из здорового донора является HLA A2-негативным, то лечащий врач пациента может использовать две конструкции (антитело к аквапорину, слитое с анти-CD3(V_H), и антитело к HLA A2, слитое с легкой цепью (V_L) указанного CD3ε-специфического антитела). В этом случае все клетки, одновременно экспрессирующие указанный аквапорин и HLA A2, т.е. клетки, представляющие собой клетки почечно-клеточной карциномы и метастатических тканей, должны являться мишенью для лизиса Т-клетками. Клетки почки, пересаженные из здорового донора, являются HLA A2-негативными, и поэтому они не должны атаковаться. Поскольку в эритроцитах экспрессия HLA снижается в процессе онтогенеза, и поэтому они не несут HLA-молекул на своей поверхности, они должны продолжать размножаться, несмотря на экспрессию больших количества аквапоринов. И в этом случае не обладающее способностью к комплементации биспецифическое антитело к аквапорину может опосредовать уничтожение всех клеток почки донора и реципиента, а также эритроцитов. Биспецифическое антитело к HLA A2 с большой вероятностью будет смертельным для HLA A2-позитивного пациента, поскольку все клетки реципиента, за исключением эритроцитов, экспрессируют HLA A2 и могут быть атакованы переориентированными Т-клетками.

Другим примером является гепатоклеточная карцинома (HCC). Гепатоциты в значительной степени вовлечены в ряд метаболических процессов, включая трафик липопротеинов. Для этой цели гепатоциты экспрессируют на поверхности рецепторы для липопротеинов высокой плотности (HDL) (представитель 1 скавенджер-рецептора класса В, SCARB1). Лечение HLA A2-позитивного пациента, страдающего HCC, при которой происходит экспрессия SCARB1 на поверхности опухолевых клеток и метастазов, можно осуществлять с помощью конструкции полипептида P2, содержащей scFv-домен, мишенью которого является SCARB1, слитый с вариабельной областью тяжелой цепи (V_H) указанного CD3ε-специфического антитела, и полипептид P1 (анти-HLA A2 scFv, слитый с легкой цепью (V_L) указанного CD3ε-специфического антитела), и путем трансплантации клеток печени из здорового HLA A2-негативного донора. В этом случае все гепатоциты и выведенные из гепатоцитов злокачественные клетки, экспрессирующие и SCARB1 и HLA A2, должны становиться мишенью для лизиса Т-лимфоцитами. Гепатоциты донора, лишенные HLA A2, должны сохраняться также как и здоровые SCARB1 - негативные клетки донора, экспрессирующие HLA A2. Поскольку есть данные об экспрессии SCARB1 также на клетках, участвующих в синтезе стероидов в надпочечнике, эти клетки, приводящие к болезни Аддисона, с большой долей вероятностью также должны разрушаться переориентированными Т-клетками.

Известны различные маркеры, которые являются специфическими для определенных клеточных типов или клеточных линий дифференцировки или для нескольких клеточных типов/клеточных линий дифференцировки (перечень примеров см. выше). Дополнительная информация о маркерах клеточных линий дифференцировки, дифференцировочных антигенах и тканевых маркерах, а также их распределении в тканях легкодоступна из опубликованных источников (см., например, David J. Dabbs, *Diagnostic immunohistochemistry*, изд-во Churchill Livingstone, 3-е изд., 2010 или у F. Lin и J. Prichard, *Handbook of Practical Immunohistochemistry: Frequently Asked Questions*, изд-во Springer, New York, 1-е изд., 2011 и публичные базы данных (такие как Gene Expression Atlas of the European Bioinformatics Institute (EBI), <http://www.ebi.ac.uk/gxa/>; или платформу Gene Expression Omnibus (GEO), см. выше). Кроме того, специалист в данной области может идентифицировать и/или верифицировать указанные маркеры с помощью несложного метода, используя такие же пути, что и описанные выше для идентификации специфических для опухоли комбинаций антигенов.

Иногда используют антиген, обладающий специфичностью в отношении определенного клеточного типа или клеточной линии дифференцировки, меньшей, чем идеальная (т.е. используют антиген, кото-

рый присутствует на более чем одной, а предпочтительно лишь на нескольких типах клеток или клеточных линиях дифференцировки) или антиген, который экспрессируется указанным типом клеток/клеточной линией дифференцировки с более высокой скоростью или в большем относительном содержании или количестве по сравнению с другими типами клеток/клеточными линиями дифференцировки в том смысле, что может иметь место невысокий, но поддающийся выявлению уровень экспрессии указанного антигена также в других типах клеток/клеточных линиях дифференцировки.

Концепцию можно адаптировать также к любым другим HLA-гаплотипам помимо HLA-A2, если клетки реципиента являются позитивными по указанному HLA-антигену, а клетки донора являются негативными по нему. Возможные HLA-антигены включают среди прочего HLA A1, HLA A2, HLA A3, HLA A25, HLA B7, HLA B8, HLA B35, HLA B44 и HLA Cw3, HLA Cw4, HLA Cw6, HLA Cw7. Для адаптации набора полипептидов к альтернативному HLA-антигену достаточно заменить нацеливающий участок T1 полипептида P1 на нацеливающий участок, который может специфически связываться с требуемым альтернативным HLA-антигеном. Путем соответствующего выбора нацеливающего участка T1, естественно, можно также специфически элиминировать клетки донора.

Кроме того, вместо V_L -домена и V_H -домена, которые после сборки образуют домен, обладающий способностью связываться с CD3ε (т.е. фрагмент F1 и фрагмент F2 полипептидов P1 и P2 соответственно), V_L -домен и V_H -домен можно заменять доменами/фрагментами, которые после сборки придают другую функцию образовавшемуся димеру. В этом плане равным образом можно применять все вариации, описанные выше, касающиеся элиминации/детекции опухолевых клеток, идентифицированных с помощью специфической комбинации двух расположенных на клеточной поверхности антигенов. Например, после сборки комплементирующий функциональный домен может опосредовать связывание/активацию эффекторных клеток, отличных от Т-клеток, может быть адаптирован для "предварительного нацеливания", может быть связан с терапевтическим или диагностическим соединением или может образовывать флуоресцентную молекулу/молекулу, обладающую способностью опосредовать биолюминесценцию.

Естественно, можно рассматривать также разнообразные подходы к выбору фрагментов F1 и F2 и к выбору нацеливающих участков T1 или T2, описанных выше, которые относятся к принципу специфической элиминации опухолевых клеток.

Из описанных вышеприведенных их вариацией специалисту в данной области должно быть очевидно, что указанный выше принцип можно применять не только для высокоспецифической идентификации/элиминации опухолевых клеток или сохранившихся злокачественных клеток реципиента после трансплантации клеток, но также и для идентификации/элиминации любого другого типа клеток, несущих специфическую комбинацию двух антигенов, которая позволяет отличать его от других типов клеток.

Ниже в описании сделаны ссылки на чертежи, на которых показано следующее.

На фиг. 1 проиллюстрирован принцип изобретения. Фиг. 1А: антигены и конструкция полипептидов P1 и P2. Фиг. 1Б: если клетка экспрессирует оба антигена 1 и 2 на своей клеточной поверхности, то одновременное связывание полипептида P1 и полипептида P2 с поверхностью этой клетки приводит к тому, что P1 и P2 оказываются в непосредственной близости друг к другу, это вызывает ассоциацию фрагментов F1 и F2 и восстановление биологической функции домена F в результате комплементации. Восстановление биологической функции не происходит, если на клеточной поверхности присутствует только антиген A1 (фиг. 1В) или только антиген A2 (фиг. 1Г).

На фиг. 2 в качестве примера представлен вариант осуществления изобретения в условиях аллогенной трансплантации при гематопозитических неоплазиях при наличии несовместимых антигенов HLA. В этой ситуации двойная информация о гаплотипе HLA пациента ($HLA_{\text{пациента}}$) и происхождении линии дифференцировки гематопозитических клеток (CD45) презентуется исключительно на лейкозных бластах и других гематопозитических клетках пациента. Первый полипептид P1 содержит конструкцию одноцепочечного варибельного фрагмента антитела к HLA пациента (нацеливающий участок T1), слитую с V_L -фрагментом антитела к CD3 (фрагмент F1). Второй полипептид P2 содержит конструкцию одноцепочечного варибельного фрагмента, специфического в отношении маркера гематопозитической клеточной линии дифференцировки CD45 (нацеливающий участок T2), слитую с расщепленным V_H -фрагментом Fv антитела к CD3 (фрагмент F2).

CD45: антиген, специфический для гематопозитических клеток. $HLA_{\text{пациента}}$: HLA-антиген, специфический для клеток пациента, т.е. аллельный вариант человеческого ГКГ, который присутствует на поверхности клеток пациента (а именно клеток реципиента, которому осуществляют трансплантации клеток), но отсутствует на поверхности донорских клеток. αCD45 scFv: scFv, специфически связывающийся с CD45. α $HLA_{\text{пациента}}$ scFv: scFv, специфически связывающийся с $HLA_{\text{пациента}}$. CD3(V_H): варибельная область иммуноглобулиновой тяжелой цепи антитела, специфически связывающегося с CD3. CD3(V_L): варибельная область иммуноглобулиновой легкой цепи антитела, специфически связывающегося с CD3.

После связывания двух конструкций посредством их scFv αCD45 и scFv α $HLA_{\text{пациента}}$ соответственно с клеткой, несущей как антиген CD45, так и антиген $HLA_{\text{пациента}}$, сборка CD3(V_H) с CD3(V_L) приводит

к функциональной комплементации антитела, обладающего специфичностью связывания в отношении CD3, тем самым позволяя осуществлять специфический рекрутмент и активацию Т-клеток посредством молекул CD3, присутствующих на их клеточной поверхности.

На фиг. 3 - конструкции, которые применяли в экспериментах, результаты которых представлены на фиг. 4-9. (Конструкция 85 отличается от конструкции 71 тем, что конструкция 85 несет Flag-метку, в то время как конструкция 71 несет мус-метку. Конструкция 75 отличается от конструкции 82 тем, что конструкция 75 несет Flag-метку, в то время как конструкция 82 несет мус-метку). V_H CD3: переменная область тяжелой цепи антитела к CD3; V_L CD3: переменная область легкой цепи антитела к CD3; V_H A2: переменная область тяжелой цепи антитела к HLA-A2; V_L A2: переменная область легкой цепи антитела к HLA-A2; V_L 45: переменная область тяжелой цепи антитела к CD45; V_H 45: переменная область легкой цепи антитела к CD45; L18, L7, L15, L6, L19: линкеры, состоящие из 18, 7, 15, 6, 19 аминокислот соответственно.

На фиг. 4 - общепринятые тандемные биспецифические одноцепочечные scFv-конструкции, которые применяли для контроля системы анализа. В целом процедура заключалась в следующем: биспецифические конструкции антител, обладающие специфичностью в отношении CD3 и HLA A2, титровали, как указано на чертежах, относительно совместной культуры HLA A2-позитивной, CD45-позитивной линии клеток миеломы U266 и HLA A2-негативных Т-клеток (моноклеарные клетки периферической крови с пониженным содержанием моноцитов), и оценивали производство интерлейкина 2 Т-клетками. Для двух FvCD3-HLA-A2-конструкций 85 и 71, отличающихся друг от друга их соответствующими Flag-или Мус-метками, была выявлена выраженная способность стимулировать Т-клетки (структуры доменов указанных конструкций представлены на фиг. 3). Биспецифические тандемные Fv-конструкции в HLA-A2-CD3-конфигурации оказались менее эффективными, а одноцепочечные конструкции, нацеленные либо на HLA-A2, либо на CD3, вообще не стимулировали Т-клетки. Положительный контроль осуществляли посредством неспецифической стимуляции с использованием ФГА-L (фитогемагглютинин).

На фиг. 5 - очень высокая и высокоспецифическая стимулирующая способность в отношении Т-клеток, достигаемая в том случае, когда применяли пару комплементирующих конструкций, предлагаемых в изобретении, но не в том случае, когда применяли индивидуально только одну из пары конструкций. В целом процедура заключалась в следующем. V_L CD3-scFvHLA-A2 (конструкция 42), V_H CD3-scFvCD45(V_L - V_H) (конструкция 45) и V_H CD3-scFvCD45(V_H - V_L) (конструкция 55) титровали по отдельности или в виде комбинаций конструкций 42 и 45 или 42 и 55 относительно совместной культуры U266 и Т-клеток как описано выше. Для комбинаций 42/45 или 42/55 была продемонстрирована высокая способность стимулировать Т-клетки, при этом наблюдалась лишь очень незначительная активность в том случае, когда применяли отдельно только одну из указанных конструкций. Эти результаты показывают, что требуется совместное участие V_L - и V_H -доменов FvCD3 в реконструкции или комплементации функции привлечения Т-клеток. Важным является то, что конфигурацию нацеливающего участка scFvCD45 можно изменять с (V_L - V_H)- на (V_H - V_L), это четко указывает на то, что модульный характер конструкций дает возможность заменять нацеливающий участок на другой нацеливающий участок, обладающий требуемой специфичностью. Систему анализа контролировали путем применения одноцепочечных конструкций CD45(V_L - V_H) и CD45(V_H - V_L), которые не обладали способностью стимулировать производство IL2 Т-клетками.

На фиг. 6 - результаты первых трех экспериментов по конкурентному блокированию. Биспецифическую тандемную конструкцию FvCD3-HLA-A2 (конструкция 71) вносили в совместные культуры клеток линии U266 и Т-клеток, описанные выше, и оценивали стимулирующую функцию по индуцированному производству IL2 Т-лимфоцитами. Стимулирующую Т-клетки функцию блокировали с помощью одноцепочечных конструкций, которые оккупировали эпитоп-мишень на молекуле HLA A2 (конструкция 4, концентрация $\times 100$). Исключали стимуляцию Т-клеток, присущую специфическим в отношении HLA A2 или CD3 одноцепочечным конструкциям (конструкция 4 (концентрация $\times 100$) или конструкция 36 (концентрация $\times 9$)). ФГА-L применяли в качестве положительного контроля.

На фиг. 7 - демонстрация того, что "тридоменные конструкции" (т.е. конструкции, предлагаемые в изобретении) сначала должны связаться на поверхности индивидуальной клетки для образования димеров и комплементации функций привлечения Т-клеток в экспериментах по конкурентному блокированию эпитопа. В целом процедура заключалась в следующем. Конструкции 42 и 45 вносили в совместные культуры клеток линии U266 и HLA-A2-негативных Т-лимфоцитов и оценивали стимулирующую способность по производству IL2 Т-клетками. В экспериментальных условиях, в которых эпитопы на молекулах HLA A2 или CD45 были заблокированы в результате конкуренции конструкциями 4 или 46 (обе в концентрациях $\times 100$), стимулирующая Т-клетки функция блокировалась. Эти результаты четко демонстрируют, что две соответствующие "тридоменные конструкции" должны одновременно связаться на поверхности клетки для достижения восстановления или комплементации функции привлечения Т-клеток. Стимулирующую активность, присущую любой каждой из конструкций (42, 45, 4, 46 и 36) исключали, используя различные концентрации.

На фиг. 8 - результаты эксперимента, аналогичного тому, результаты которого представлены на

фиг. 7, проведенного для комбинации конструкций 42 и 55. И в этом случае также способность комбинации двух "трехдоменных конструкций" стимулировать Т-клетки устранялась в результате конкурентного блокирования антигенных эпитопов на молекуле HLA A2 или CD45. Важно отметить, что эти результаты еще раз демонстрируют, что нацеливающий модуль можно легко заменять на другой модуль, обладающий соответствующей специфичностью. Более важным является то, что V_L - V_H - V_L -конфигурация конструкции 42 и V_H - V_H - V_L -конфигурация конструкции 55 препятствуют гомо-или гетеродимеризации, или самосборке конструкций без предварительного связывания с субстратом, экспрессирующим оба антигена, т.е. и HLA A2 и CD45.

На фиг. 9 - результаты оценки лизиса клеток линии U266 HLA A2-негативными Т-клетками в образце, содержащем и V_L CD3-scFvHLA-A2-, и V_H CD3-scFvCD45(V_H - V_L)-конструкцию ("обе конструкции"). В контрольных образцах, содержащих только одну из двух конструкций, не было обнаружено значимого лизиса.

На фиг. 10 - восстановление полипептидов на мишени. Связывание двух отдельных полипептидов (P1 и P2) с их соответствующими антигенами на клетке-мишени, каждый из которых состоял из специфического одноцепочечного варибельного фрагмента антитела (scFv, V_H - V_L), слитого с варибельным доменом легкой цепи (V_L) или варибельным доменом тяжелой цепи (V_H) CD3-специфического антитела (фрагмент F1 и F2), позволяло осуществлять V_H / V_L -гетеродимеризацию и формирование функционального CD3-связывающего сайта для привлечения Т-клеток.

На фиг. 11 - результаты, демонстрирующие, что V_H / V_L -димеризация CD3 позволяет привлекать Т-клетки и эта ситуация ограничена присутствием двух антигенов. Клетки миеломы линии U266, клетки первичного Т-клеточного пролимфоцитарного лейкоза (Т-PLL) и клетки острого миелолейкоза ТНР-1, все HLA-A2-позитивные и CD45-позитивные, зондировали HLA-A2-негативными донорскими мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) и полипептидами, как указано на чертеже. Привлечение Т-клеток оценивали по производству реактивного интерлейкина-2 (IL-2) (А) и лизису клеток-мишеней (Б). Биспецифическое тандемное антитело scFv (CD3(V_H - V_L) - HLA-A2(V_H - V_L)) применяли в качестве положительного контроля. (В) Связывание полипептидов на ТНР-1-клетках конкурентно блокировали, применяя избыток ингибиторов scFvCD45 (слева) и scFvHLA-A2 (справа) (блокирование индивидуальных антигенных эпитопов на клетке-мишени), как указано, и анализировали производство реактивного IL-2 донорскими PBMC. (Г) Зондировали полипептидами негативные по одному или двум антигенам клеточные линии RAJI и KMS-12-BM. ФГА-L применяли в качестве неспецифического контрольного стимула для PBMC.

На фиг. 12 - результаты направленной терапии на основе кондиционированной CD3 V_H / V_L -комплементации *in vivo*. (А) Выживание мышей (n = 6 на группу) после внутривенной инъекции 5×10^6 клеток острого лейкоза ТНР-1 в сочетании с $1,25 \times 10^5$ CMV-специфических HLA-A2-негативных донорских Т-клеток и полипептидами (0,5 мкг) (соотношение опухолевые клетки:Т-клетки = 40/1). (Б) Активацию каспазы оценивали *in vitro* с помощью проточной цитометрии на дважды HLA-A2/CD45-позитивных ТНР-1-клетках и CD45-позитивных, но HLA-A2-негативных "клетках-свидетелях" после совместного культивирования с донорскими Т-клетками и полипептидами (3 нМ), как указано. Биспецифическое тандемное антитело scFv (CD3(V_H - V_L) - HLA-A2(V_H - V_L)) применяли в качестве положительного контроля.

На фиг. 13 - результаты, демонстрирующие, что полипептиды, мишенью которых являются EGFR- и ЕрСАМ, привлекают Т-клетки, обеспечивая деструкцию клеток карциномы. Дважды позитивную (EGFR- и ЕрСАМ-позитивную) линию клеток человеческого рака ободочной кишки COLO-206F и линию клеток меланомы FM-55 (EGFR-позитивную, но ЕрСАМ-негативную) зондировали PBMC в присутствии полипептидов, обладающих специфичностью в отношении EGFR (CD3(V_H)-EGFR(V_H - V_L)) и ЕрСАМ (CD3(V_L)-ЕрСАМ(V_H - V_L)), как указано. Привлечение Т-клеток оценивали по производству реактивного интерферона- γ (IFN γ) (А) и активации каспазы 3 в клетках-мишенях (Б).

На фиг. 14 - результаты, демонстрирующие, что полипептиды, мишенью которых являются HLA-A2 и СЕА, переориентируют Т-клетки на деструкцию опухолевых клеток. Линию клеток человеческого рака ободочной кишки COLO-206F, линию клеток меланомы FM-55 и линию клеток рака яичника OVCAR зондировали PBMC в присутствии полипептидов, обладающих специфичностью в отношении HLA-A2 (CD3(V_L)-HLA-A2(V_H - V_L)) и СЕА (CD3(V_H)-СЕА(V_H - V_L)), как указано. Привлечение Т-клеток оценивали по производству реактивного IFN γ . Образцы обрабатывали и анализировали в двух повторностях.

На фиг. 15 - результаты, демонстрирующие, что полипептиды, мишенью которых являются HLA-A2 и EGFR, переориентируют Т-клетки на деструкцию опухолевых клеток. Человеческие линии клеток COLO-206F, FM-55 и OVCAR зондировали PBMC в присутствии полипептидов, обладающих специфичностью в отношении HLA-A2 (CD3(V_L)-HLA-A2(V_H - V_L)) и EGFR (CD3(V_H)-EGFR(V_H - V_L)), как указано. Привлечение Т-клеток оценивали по производству реактивного IFN γ . Образцы обрабатывали и анализировали в двух повторностях.

На фиг. 16 - результаты, демонстрирующие, что полипептиды, мишенью которых являются HLA-

A2 и Her2, переориентируют Т-клетки на деструкцию опухолевых клеток. Человеческие линии клеток COLO-206F, FM-55 и OVCAR зондировали PBMC в присутствии полипептидов, обладающих специфичностью в отношении HLA-A2 (CD3(V_L)-HLA-A2(V_H-V_L)) and Her2 (CD3(V_H)-Her2(V_H-V_L)), как указано. Привлечение Т-клеток оценивали по производству реактивного IFN γ . Образцы обрабатывали и анализировали в двух повторностях;

На фиг. 17 - результаты, демонстрирующие, что полипептиды, мишенью которых являются CD45 и HLA-A2, переориентируют Т-клетки на деструкцию опухолевых клеток. В этом эксперименте расщепленные анти-CD3-фрагменты (CD3(V_H) и CD3(V_L)) для анти-CD45- и анти-HLA-A2-нацеливающих участков были заменены друг на друга по сравнению с полипептидами, мишенями которых являлись CD45 и HLA-A2, представленными на фиг. 5,7-9, 11,12, 14-16. Линию клеток человеческой миеломы U266 зондировали PBMC в присутствии полипептидов, обладающих специфичностью в отношении CD45 (CD3(V_L)-CD45(V_H-V_L)) и HLA-A2 (CD3(V_H)-HLA-A2(V_H-V_L)), как указано. Привлечение Т-клеток оценивали по производству реактивного IFN γ . Образцы обрабатывали и анализировали в двух повторностях.

На фиг. 18 - результаты, демонстрирующие, что полипептиды, мишенью которых являются EGFR и EpCAM, переориентируют Т-клетки на разрушение опухолевых клеток. Линии клеток человеческого рака ободочной кишки COLO-206F и CX-1 и линию клеток рака яичника OVCAR зондировали PBMC в присутствии полипептидов, обладающих специфичностью в отношении EpCAM (CD3(V_L)-EpCAM(V_H-V_L)) и EGFR (CD3(V_H)-EGFR(V_H-V_L)), как указано. Привлечение Т-клеток оценивали по производству реактивного IFN γ . Образцы обрабатывали и анализировали в двух повторностях.

На фиг. 19 - результаты, демонстрирующие, что полипептиды, мишенью которых являются Her2 и EpCAM, переориентируют Т-клетки на разрушение опухолевых клеток. Линию клеток человеческого рака яичника OVCAR зондировали PBMC в присутствии полипептидов, обладающих специфичностью в отношении EpCAM (CD3(V_L)-EpCAM(V_H-V_L)) и Her2 (CD3(V_H)-Her2(V_H-V_L)), как указано. Привлечение Т-клеток оценивали по производству реактивного IFN γ . Образцы обрабатывали и анализировали в двух повторностях.

На фиг. 20 - результаты, демонстрирующие, что полипептиды, мишенью которых являются CD45 и CD138, переориентируют Т-клетки на разрушение опухолевых клеток. Линию клеток миеломы человека АМО-1 зондировали PBMC в присутствии полипептидов, обладающих специфичностью в отношении CD45 (CD3(V_L)-CD45(V_H-V_L), верхняя панель, CD3(V_H)-CD45(V_H-V_L), нижняя панель) и CD138 (CD3(V_H)-CD138(V_H-V_L), верхняя панель, CD3(V_L)-CD138(V_H-V_L), нижняя панель), как указано. Привлечение Т-клеток оценивали по производству реактивного IFN γ . Образцы обрабатывали и анализировали в двух повторностях.

На фиг. 21 - результаты, демонстрирующие, что нацеливание на один антиген (CD138) с помощью полипептидов, мишенью которых является CD138, переориентирует Т-клетки на разрушение опухолевых клеток. Линию клеток человеческой миеломы АМО-1 зондировали PBMC в присутствии полипептидов, обладающих специфичностью в отношении CD138 (CD3(V_L)-CD138(V_H-V_L) и (CD3(V_H)-CD138(V_H-V_L)), как указано. Привлечение Т-клеток оценивали по производству реактивного IFN γ . Образцы обрабатывали и анализировали в двух повторностях.

На фиг. 22 - результаты, демонстрирующие, что нацеливание на один антиген (CD45) с помощью полипептидов, мишенью которых является CD45, переориентирует Т-клетки на разрушение опухолевых клеток. Линии клеток человеческой миеломы АМО-1 и U266 зондировали PBMC в присутствии полипептидов, обладающих специфичностью в отношении CD45 (CD3(V_L)-CD45(V_H-V_L) и (CD3(V_H)-CD45(V_H-V_L)), как указано. Привлечение Т-клеток оценивали по производству реактивного IFN γ . Образцы обрабатывали и анализировали в двух повторностях.

На фиг. 23 - восстановление на мишени двух полипептидов, мишенью которых является один антиген на клеточной поверхности, нацеленных на два различных эпитопа (верхняя часть чертежа) или на один и тот же эпитоп (нижняя часть чертежа) на антигене. Проиллюстрировано связывание двух отдельных полипептидов (P1 и P2) с их соответствующим эпитопом на одном и том же антигене на клетке-мишени. Для нацеливания на два различных эпитопа нацеливающий участок каждого полипептида состоит из специфического одноцепочечного варибельного фрагмента антитела (scFv). Для нацеливания на один и тот же эпитоп нацеливающий участок каждого полипептида состоит из одного и того же одноцепочечного варибельного фрагмента антитела (scFv). Нацеливающие участки сливаются через пептидные линкеры с варибельным доменом легкой цепи (V_L) или варибельным доменом тяжелой цепи (V_H) CD3-специфического антитела (фрагменты F1 и F2), что позволяет осуществляться V_H/V_L-гетеродимеризации и формированию функционального сайта связывания CD3 (функциональный домен), требуемого для привлечения Т-клеток.

На фиг. 24 - возможность применения различных эффекторных путей для уничтожения клетки-мишени с помощью набора полипептидных компонентов. Для этой цели анти-CD3-модуль (F1 и F2) заменяют на анти-HIS-модуль (гексагистидин), который после одновременного связывания полипептидов 1 и 2 комплементирует сайт связывания гексагистидина и в результате связывает меченный гистидином "полезный груз" (например, меченный HIS токсин). Нацеливающий участок T1 (V_H-V_L) полипептида P1

специфически связывается с HLA-A2, нацеливающий участок T2 (V_H - V_L) полипептида P2 специфически связывается с CD45. Фрагмент F1 полипептида P1 содержит V_H -домен антитела к гексагистидинового метке, а фрагмент F2 полипептида P2 содержит V_L -домен того же самого антитела. Линию клеток человеческого миелолейкоза ТНР-1 зондировали меченым гистицином (His) компонентом Ia йота-токсина Clostridium perfringens в концентрации 0,01 мкг/мл в комбинации с указанными полипептидами. После культивирования в течение 48 ч оценивали жизнеспособность клеток с помощью анализа alamarBlue®. Результаты анализа свидетельствуют о снижении жизнеспособности по сравнению с исходным уровнем для клеток, зондированных комбинацией, но не индивидуальными полипептидами. Одновременно в качестве контроля выращивали клетки линии ТНР-1 в культуре, не содержащей токсин. Образцы обрабатывали и анализировали в двух повторностях.

На фиг. 25 - результаты, демонстрирующие, что полипептиды, мишенью которых являются HLA-A2 и CD45, содержащие расщепленное антитело к His-метке, уничтожают опухолевые клетки в результате действия меченой гистицином (His) субъединицы А шига-токсина в концентрации 0,01 мкг/мл. Применяли те же самые условия эксперимента, результаты которого представлены на фиг. 24.

На фиг. 26 - результаты, демонстрирующие, что полипептиды, мишенью которых являются HLA-A2 и CD45, содержащие расщепленное антитело к His-метке, уничтожают опухолевые клетки в результате действия меченой гистицином (His) субъединицы А шига-токсина в концентрации 0,1 мкг/мл. Применяли те же самые условия эксперимента, результаты которого представлены на фиг. 24/25.

На фиг. 27 - результаты, демонстрирующие, что полипептиды, мишенью которых являются EGFR и EpCAM, содержащие функциональный домен F, в котором F1 и F2 представляют собой V_H и V_L антитела, специфического для дигоксигенина (aDig), метят опухолевые клетки посредством меченой дигоксигенином молекулы пероксидазы из хрена (HRP). Нацеливающий участок T1 (V_H - V_L) полипептида P1 специфически связывается с EGFR, нацеливающий участок T2 (V_H - V_L) полипептида P2 специфически связывается с EpCAM. Фрагмент F1 полипептида P1 содержит V_H -домен антитела к дигоксигенину, а фрагмент F2 полипептида P2 содержит V_L -домен того же самого антитела. Линию клеток человеческого рака ободочной кишки Colo-206F сначала зондировали указанными полипептидами, после чего зондировали меченой дигоксигенином HRP. Образцы анализировали с использованием набора для ELISA Invitrogen™ и регистрировали поглощение с помощью ридера для микропланшетов фирмы BioRAD. Для анализа принимали результаты, полученные для образца без хромогена (без дигоксигенин-HRP), за 0. Образцы обрабатывали и анализировали в двух повторностях.

На фиг. 28 - результаты, демонстрирующие, что полипептиды, мишенью которых являются CD45 и HLA-CW6, переориентирует Т-клетки на разрушение клеток пациента. Применяли первичные клетки пациента с известными HLA-гаплотипами. A51 обозначает клетки пациента с MDS (миелодиспластический синдром), гомозиготные по гаплотипу HLA-Cw6. A49 обозначает клетки пациента, полученные после аллогенной трансплантации костного мозга, гетерозиготные по гаплотипу HLA-Cw6. Клетки пациента инкубировали со здоровыми PBMC в течение 30 ч в присутствии полипептидов, специфических в отношении CD45 (CD3(V_L)-CD45(V_H - V_L)) и HLA-Cw6 (CD3(V_H)-HLA-CW6(V_H - V_L)), как указано. Привлечение Т-клетки оценивали по производству реактивного IFN γ . Образцы обрабатывали и анализировали в двух повторностях.

На фиг. 29 - результаты, демонстрирующие, что полипептиды, мишенью которых являются EGFR и EpCAM, переориентирует Т-клетки на разрушение первичных клеток пациента. Опухолевые клетки линии A44 собирали из злокачественных асцитов пациента мужского пола возрастом 48 лет, страдающего метастатическим раком поджелудочной железы. Опухолевые клетки пациента инкубировали с его собственными PBMC (собранными путем флеботомии) в течение 30 ч в присутствии полипептидов, специфических в отношении EpCAM (CD3(V_L)-EpCAM(V_H - V_L)) и EGFR (CD3(V_H)-EGFR(V_H - V_L)), как указано. Привлечение Т-клетки оценивали по производству реактивного IFN γ . Образцы обрабатывали и анализировали в двух повторностях.

На фиг. 30 - результаты, демонстрирующие, что полипептиды, мишенью которых являются CD45 и HLA-A2, переориентирует CMV-ограниченные CD8 -Т-клетки на разрушение опухолевых клеток. Человеческие опухолевые клетки линий ТНР-1 и U266 инкубировали с CMV-ограниченными Т-клетками, полученными от HLA-A2-негативного здорового донора, в течение 30 ч в присутствии полипептидов, специфических в отношении HLA-A2 (CD3(V_L)-HLA-A2(V_H - V_L)) и CD45 (CD3(V_H)-CD45(V_H - V_L)), как указано. Биспецифическое тандемное scFv (CD3(V_H - V_L) \times HLA-A2(V_H - V_L))-антитело применяли в качестве положительного контроля. Привлечение Т-клетки оценивали по производству реактивного IFN γ . Образцы обрабатывали и анализировали в двух повторностях.

На фиг. 31 - иллюстрация принципа, лежащего в основе идеи элиминации В-клеточных клонов, которые вызывают аутоиммунное или связанное с гиперчувствительностью нарушение, с помощью набора полипептидных компонентов, состоящего из полипептида, специфического в отношении аллергена, и полипептида, специфического в отношении клеточного типа. Первый полипептид P1 имеет на своем нацеливаемом участке аллерген (например, Betv-1A, Der-f2, Conglutin-7, Can-f1, Feld-d1). Второй полипептид P2 имеет на своем нацеливаемом участке специфический одноцепочечный варибельный фрагмент

антитела (scFv, V_H - V_L), мишенью которого является белок клеточной поверхности (например, CD19, CD138, CD38). Оба нацеливающих участка сливаются либо с переменным доменом легкой цепи (V_L), либо с переменным доменом тяжелой цепи (V_H) CD3-специфического антитела (фрагмент F1 и F2).

Ниже представлено описание некоторых (человеческих) генов или белков, которые упоминаются также в спецификации, прилагаемых примерах, а также (частично) в формуле изобретения. Ниже представлены соответствующие регистрационные номера генов. Дополнительные регистрационные номера представлены также в других местах в спецификации, а также в прилагаемых примерах.

CD45: Gene ID: 5788, база данных модернизирована 13 января 2013 г., 3. Белок = P08575-1 = изоформа 1, последняя модификация 19 июля 2003 г. Версия 2.

CD34: Белок: P28906-1/2, последняя модификация 15 июля 1998 г. Версия 2.

CD33: Gene ID: 945, модернизирована 30 декабря 2012 г. Белок: P20138 [UniParc]. Последняя модификация 17 октября 2006 г. Версия 2. Программа Checksum: 1C73E588240FBAD8.

CD138: Gene ID: 6382, модернизирована 6 января 2013 г., 4. Белок = P18827 [UniParc]. Последняя модификация 5 мая 2009 г. Версия 3.

CD15: Gene ID: 2526, модернизирована 5 января 2013 г.

CD1a: Gene ID: 909, модернизирована 30 декабря 2012 г., P06126 [UniParc]. Последняя модификация 9 февраля 2010 г. Версия 4. Checksum: C575C3C538F0AA29.

CD2: Gene ID: 914, модернизирована 5 января 2013 г. P06729 [UniParc]. Последняя модификация 23 октября 2007 г. Версия 2. Checksum: A03D853C3B618917.

CD3e: Gene ID: 916, модернизирована 5 января 2013 г., P07766 [UniParc]. Последняя модификация 1 февраля 1996 г. Версия 2. Checksum: A1603D01CE9957D7.

CD4: Gene ID: 920, модернизирована 13 января 2013 г.; P01730 [UniParc]. Последняя модификация 1 ноября 1988 г. Версия 1. Checksum: 20ED893F9E56D236.

CD5: Gene ID: 921, модернизирована 30 декабря 2012 г.; P06127 [UniParc]. Последняя модификация 30 ноября 2010 г. Версия 2. Checksum: 9131AEC9683EE1D3.

CD8a: Gene ID: 925, модернизирована 30 декабря 2012 г.; изоформа 1/2 (мембрана) P01732-1/2 (mCD8alpha) [UniParc]. Последняя модификация 21 июля 1986 г. Версия 1. Checksum: FCCA29BAA73726BB.

CD20: Gene ID: 931, модернизирована 6 января 2013 г.; P11836 [UniParc]. Последняя модификация 1 октября 1989 г. Версия 1. Checksum: AC5420F8B626BDD1.

CD23: Gene ID: 2208, модернизирована 4 января 2013 г.; P06734 [UniParc]. Последняя модификация 1 января 1988 г. Версия 1. Checksum: F86708C0E6515B87.

CD31: Gene ID: 5175, модернизирована 13 января 2013 г.; Изоформа: Long (длинная)[UniParc]. Последняя модификация 1 апреля 1990 г. Версия 1. Checksum: C57BBFA200A407A6, P16284-1/2/3/4/5/6 = Изоформы 1-6.

CD43: Gene ID: 6693, модернизирована 30 декабря 2012 г.; P16150 [UniParc]. Последняя модификация 1 апреля 1990 г. Версия 1. Checksum: C9C9AB8435D5E1FE.

CD56: Gene ID: 4684, модернизирована 30 декабря 2012 г.; изоформа 1 [UniParc]. Последняя модификация 22 июля 2008 г. Версия 3. Checksum: FD3B9DE80D802554, P13591-2/1/3/4/4/6, изоформы 1-6.

CD57: Gene ID: 27087, модернизирована 5 января 2013 г.

CD68: Gene ID: 968, модернизирована 6 января 2013 г.; изоформа Long (CD68.1) [UniParc]. Последняя модификация 15 мая 2007 г. Версия 2. Checksum: 69E68D69EDE8EFB0, P34810-1/2, изоформа 1/2.

CD79a: Gene ID: 973, модернизирована 5 января 2013 г.; изоформа 1 (длинная) [UniParc]. Последняя модификация 1 июня 1994 г. Версия 2, Checksum: 6E5B837409969292, P11912-1/2, изоформа 1/2.

CD146: Gene ID: 4162, модернизирована 30 декабря 2012 г.; изоформа 1 [UniParc]. Последняя модификация 10 января, 2006 г. Версия 2. Checksum: E46CB8AC7BA0738E, P43121-1/2, изоформа 1/2.

Белки сурфактанта (А и В):

Gene ID: 6440, модернизирована 30 декабря 2012 г. и Gene ID: 6439, модернизирована 30 декабря 2012 г., P07988 [UniParc]. Последняя модификация 1 мая 1992 г. Версия 3. Checksum: 9FD7F66678A35153, и Изоформа 1 [UniParc]. Последняя модификация 1 апреля 1990 г. Версия 2. Checksum: C26A21E33C60AA78, P11686-1/2, изоформа 1/2.

Синаптофизин:

Gene ID: 6855, модернизирована 30 декабря 2012 г. P08247 [UniParc]. Последняя модификация 1, августа 1991 г. Версия 3. Checksum: 592289C43B12EFA7.

Никотинацетилхолиновые рецепторы:

Gene ID: 1138, модернизирована 30 декабря 2012 г. Gene ID: 1136, модернизирована 6 января 2013 г. Gene ID: 1139, модернизирована 13 января 2013, Gene ID: 1137, модернизирована 30-декабря 2012 г. Gene ID: 1141, модернизирована 5 января 2013 г.

Специфическая для мышц киназа MUSK:

Gene ID: 4593, модернизирована 8- января 2013 г., изоформа 1 [UniParc]. Последняя модификация 1 января 1998 г. Версия 1. Checksum: 3DDC20E179FA010C, 015146-1/2, изоформа 1/2.

Потенциалзависимый кальциевый канал (P/Q-типа):

Gene ID: 773, модернизирована 5 января 2013 г.; изоформа 1 (1A-1) (BI-1-GGCAG) [UniParc]. Последняя модификация 15 июля 1999 г. Версия 2. Checksum: 2F2F378ACE02FD56, O00555-1/2/3/4/5/6/7, изоформы 1-7, Gene ID: 25398, модернизирована 11 января 2013 г., J3KP41 [UniParc]. Последняя модификация 3 октября 2012 г. Версия 1. Checksum: AEDF4D2A5E49263F.

Потенциалзависимый калиевый канал (VGKC):

Gene ID: 3737, модернизирована 30 декабря 2012 г., Gene ID: 3736, модернизирована 8 января 2013 г., Gene ID: 3742, модернизирована 8 января 2013 г.

N-метил-D-аспарататный рецептор (NMDA):

Gene ID: 2904, модернизирована 5 января 2013 г., Q13224 [UniParc]. Последняя модификация 20 июня 2001 г. Версия 3. Checksum: 40AEB12BE6E50CEF; Gene ID: 2902, модернизирована 30 декабря 2012 г., изоформа 3 (Long) (NR1-3) [UniParc]. Последняя модификация 1 июня 1994 г. Версия 1. Checksum: CDF5402769E530AB, Q05586-1/2/3/4/5, изоформы 1-5.

TSHR: Gene ID: 7253, модернизирована 4 января 2013 г., изоформа Long [UniParc]. Последняя модификация 29 марта 2005 г. Версия 2. Checksum: D2EE9CEBFD64A65F, P16473-1/2/3, изоформы 1-3.

Амфифизин:

Gene ID: 273, модернизирована 8 января 2013 г., изоформа 1 (128 кДа) [UniParc]. Последняя модификация 1 февраля 1996 г. Версия 1., Checksum: 78B4F75AB75BA357, P49418-1/2, изоформа 1-2.

Ганглиозид GO1B: Gene ID: 29906, модернизирована 30 декабря 2012 г.

GD3: Gene ID: 117189, модернизирована 22 июня 2012 г.

Ca-125: Gene ID: 94025, модернизирована 30 декабря 2012 г., Q8WXI7 [UniParc]. Последняя модификация 1 марта 2003 г. Версия 2. Checksum: B3E7BDF19997A440.

Her-2/neu: Gene ID: 2064, модернизирована 13 января 2013 г., 4. Белок = P04626-1/2/3/4 = Изоформа 1-4, Последняя модификация 13 августа 1987 г. Версия 1.

Белок опухолей апокринных потовых желез 15; Gene ID: 5304, модернизирована 30 декабря 2012 г.

CD117: Gene ID: 3815, модернизирована 6 января 2013 г.

CD30: Gene ID: 943, модернизирована 6 января 2013 г.; изоформа (длинная) [UniParc]. Последняя модификация 1 декабря 1992 г. Версия 1. Checksum: 7A407CC78A6E0BC8, P28908-1/2, изоформа 1/2.

Рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) альфа:

Gene ID: 5159, модернизирована 13 января 2013 г., Gene ID: 5156, модернизирован 13 января 2013 г., изоформа 1 [UniParc]. Последняя модификация 1 апреля 1990 г. Версия 1. Checksum: 5E3FB9940ACD1BE8, P16234-1/2/3, изоформы 1-3; P09619 [UniParc]. Последняя модификация 1 июля 1989 г. Версия 1. Checksum: 038C15E531D6E89D.

Меланома-ассоциированный маркер/Mart 1:

Gene ID: 2315, модернизирована 30 декабря 2012 г.; Q16655 [UniParc]. Последняя модификация 1 ноября 1996 г. Версия 1. Checksum: B755BFF39CFCB16E.

CD133: Gene ID: 8842, модернизирована 13 января 2013 г.; изоформа 1 (AC133-1) (S2) [UniParc]. Последняя модификация 1 июня 1998 г. Версия 1. Checksum: D21CBC05ADB2DEDF, 043490-1/2/3/4/5/6/7, изоформы 1-7.

Ниже изобретение описано с помощью примеров, которые даны только с целью иллюстрации и не ограничивают объем настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1.

Клонирование рекомбинантных конструкций антител.

ДНК-последовательности, выведенные из клеток гибридомы и кодирующие вариабельные домены антител к CD3, к CD45 и к HLA A2 соответственно, применяли для создания конструкций антител, которые представлены на фиг. 3, с помощью стандартных методов молекулярной биологии (см., например, Sambrook и др., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001). Создавали конструкции, несущие различные аффинные метки, для облегчения идентификации и очистки после экспрессии рекомбинантных белков (Мус-, Flag, His-метка). Подробности расположения доменов, аффинных меток и линкеров конструкций см. на фиг. 3.

Лидер *relB* кодирует аминокислотную последовательность, которая направляет белок, экспрессируемый в бактериях, в бактериальную периплазму. Лидерная последовательность расщепляется ферментами бактерий и белок можно выделять.

Пример 2.

Экспрессия и очистка рекомбинантных антител.

Периплазматическая экспрессия белков.

Рекомбинантные конструкции антител экспрессировали в периплазме штамма *E. coli* TG1, используя соответствующий прокариотический экспрессионный вектор. Два литра среды 2×TY, содержащей 0,1% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина, инокулировали 20 мл полученной в течение ночи культуры трансформированного TG1 и выращенной до экспоненциальной фазы (ОП₆₀₀ 0,8-0,9) при 37°C. Поскольку фрагменты антитела находились под контролем промотора лактоза, экспрессию белка индуцировали,

добавляя 1 мМ ИПТГ, с последующей инкубацией при КТ (комнатная температура) при встряхивании в течение еще 3 ч. Клетки собирали центрифугированием в течение 10 мин при 2750×g и 4°C и ресуспендировали в 100 мл соответствующего буфера. Лизис клеток осуществляли, добавляя 50 мкг/мл свежерастворенного лизоцима (фирма Roche Diagnostics) и осуществляя инкубацию в течение 25 мин на льду. Затем добавляли 10 мМ MgSO₄ для стабилизации сферобластов и клетки центрифугировали в течение 10 мин при 6200×g и 4°C. И, наконец, полученный супернатант, содержащий периплазматический белок, подвергали диализу в противотоке ЗФР в течение ночи при 4°C и центрифугировали вновь в течение 15 мин в указанном выше режиме. Затем рекомбинантные белки очищали с использованием Ni-NTA-ИМАС (никель-нитрилотриуксусная кислота-металл-аффинная хроматография).

Металл-аффинная хроматография (ИМАС).

Для очистки рекомбинантных белков с использованием His₆-метки осуществляли ИМАС с применением агарозных гранул с иммобилизованным комплексом никель-нитрилотриуксусная кислота (NTA) (фирма Qiagen). Сначала колонку с 1 мл Ni-NTA-агарозы необходимо было уравновесить с помощью примерно 10 мл стерильного ЗФР или забуференного фосфатом натрия раствора с 20 мМ имидазолом. Затем неочищенный белок, либо осажденный после экспрессии в цитоплазмате, либо после диализа фракции, полученной после экспрессии в периплазме, постепенно вносили в колонку. После промывки с использованием примерно 20 мл соответствующего предназначенного для промывки ИМАС-буфера (забуференный фосфатом натрия раствор, содержащий 20-35 мМ имидазол) до тех пор, пока в потоке больше не удавалось обнаруживать белок, связанный белок элюировали из колонки в виде фракций объемом по 500-мкл с помощью забуференного фосфатом натрия раствора, содержащего 250 мМ имидазол.

Все собранные после промывки и элюции фракции тестировали в отношении присутствия белка с помощью качественного анализа Брэдфорда, добавляя по 10 мкл каждого образца в 90 мкл 1× раствора Брэдфорда. Верификацию процесса очистки осуществляли с помощью ДСН-ПААГ-анализа. Для этой цели элюированные фракции разгоняли параллельно с неочищенным белком, потоком и промывочной фракцией в восстанавливающих условиях. И, наконец, положительные фракции, выявленные с помощью колориметрической реакции, объединяли в пиковую и минорные фракции и подвергали диализу в противотоке ЗФР в течение ночи при 4°C. Для применения в анализах по оценке стимуляции очищенные белки необходимо подвергать стерилизации фильтрацией и определять их концентрацию. Кроме того, после количественной оценки белков 2 мкг применяемых для дополнительных исследований фракций анализировали также с помощью ДСН-ПААГ и вестерн-блоттинга в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

В качестве другого варианта метода, изложенного в примере 2, синтезировали ДНК, кодирующую (V_H)CD3-EGFR(V_H-V_L), (V_H)CD3-CEA(V_H-V_L), (V_H)CD3-Her2(V_H-V_L), (V_H)CD3-HLA-A2(V_H-V_L), (V_H)CD3-HLA-CW6(V_H-V_L), (V_H)CD3-CD138(V_H-V_L), (V_H)анти-Dig-EGFR(V_H-V_L), (V_H)анти-His-HLA-A2(V_H-V_L), (V_L)CD3-CEA(V_H-V_L), (V_L)CD3-EpCAM(V_H-V_L), (V_L)анти-Dig-EpCAM(V_H-V_L), (V_L)анти-His-CD45(V_H-V_L), (V_L)CD3-CD45(V_H-V_L), и белки получали и анализировали с помощью GenScript (Пискатавей, шт. Нью-Джерс, США). ДНК представляла собой ДНК с оптимизированными кодонами для оптимизированной экспрессии в E.coli (вектор E3), которую выращивали в 2 л стандартной LB-среды, белок получали из телец включения или периплазмы (лидер relB) с помощью одностадийной хроматографии на Ni-NiTrap-колонке. Бактериальные эндотоксины удаляли путем диализа в противотоке 5 л 1× забуференного фосфатом физиологического раствора (ЗФР). Концентрацию измеряли с помощью анализа белка по Брэдфорду, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА). Чистоту определяли денситометрическим анализом окрашенного с помощью кумасси бриллиантового голубого геля, полученного после ДСН-ПААГ. Аликвоты хранили при -80°C или 4°C. В качестве буфера для хранения использовали буфер, содержащий 1×ЗФР, 5% глицерина, 0,5% натрийлауроилсаркозина, рН 7,4.

Пример 3.

Методики культивирования клеток.

Культивирование клеток.

Клетки млекопитающих культивировали в колбах для культуры тканей T75 в 20 мл соответствующей культуральной среды при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Клетки расщепляли (пересевали) каждые 2-3 дня. Прикрепившиеся клетки сначала было необходимо отделять с помощью 1 х трипсина-ЭДТК. Количество клеток подсчитывали с помощью прижизненного окрашивания эозином или трипановым синим. Для хранения клетки на стадии 60-80% конфлюэнтности собирали центрифугированием в течение 5 мин при 450×g, ресуспендировали в FCS с 10% ДМСО, вносили в виде аликвот в криогенные флаконы, разделили и постепенно замораживали до температуры -80°C. Клетки подвергали быстрому оттаиванию при 37°C в водяной бане и осторожно добавляли в 5 мл среды. Для удаления ДМСО клетки вновь центрифугировали, ресуспендировали в свежей среде и переносили в колбу для культуры тканей.

Получение мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC): PBMC, содержащие лимфоциты и моноциты, предварительно выделяли из лейкоцитарной пленки здорового донора путем центрифугирования с использованием раствора для разделения лимфоцитов на основе фиколла LSM 1077 (фирма RAA Laboratories, Пашинг, Австрия). Однако, тем не менее, в процессе применения эти PBMC рассмат-

ривались как негомогенная клеточная популяция, поэтому процесс отделения от оставшихся эритроцитов, гранулоцитов и тромбоцитов повторяли следующим образом. PBMC после их оттаивания ресуспендировали в 30 мл среды RPMI 1640, содержащей 10% FCS и Pen-Strep, осторожно наслаивали на 10 мл LSM 1077 и центрифугировали в течение 5 мин при 800×g без встряхивания. После отбрасывания верхней фазы PBMC, сконцентрированные в интерфазе, переносили в свежую пробирку, ресуспендировали в 30 л среды и центрифугировали в течение 5 мин при 450×g. Моноциты удаляли путем культивирования PBMC в чашке для культуры ткани диаметром 10 см в течение ночи, давая прикрепиться моноцитам к чашке. И, наконец, собирали оставшиеся в растворе PBMC.

В другом варианте метода, изложенного в примере 3, первичные человеческие раковые клетки пациента, страдающего метастатическим раком поджелудочной железы, экстрагировали из асцитных мешков пациента (фиг. 29). 4 литра свежесобранных злокачественных асцитов хранили в 2-литровых стеклянных сосудах при 4°C в течение ночи. На следующей день клеточный дебрис, собранный со дна стеклянного сосуда, промывали 1×3ФР и ресуспендировали в культуральной среде (DMEM, дополненная 200 мкМ L-глутамином, 10% инактивированной тепловой обработкой FBS, пенициллином (200 ед./мл), стрептомицином (200 мкг/мл) и пируватом натрия (1 мМ) (Gibco®)). Прикрепившиеся клетки культивировали в инкубаторе при 36°C, 5% CO₂, 90%-ной влажности. В тот же день, когда получали асциты из организма пациента, собирали 20 мл периферической крови для экстракции PBMC. Первичные лейкозные клетки получали из образцов, взятых у мужчины возрастом 71 год, страдающего T-клеточным пролимфоцитарным лейкозом (T-PLL) (фиг. 11A), рецидив которого наблюдался в течение 32 дней после совместимой аллогенной трансплантации стволовых клеток. Лейкозные T-PLL-клетки экстрагировали в виде PBMC из периферической крови пациентов. При исследовании формулы крови с помощью общепринятого клинического диагностического анализа в момент отбора образца у пациента было >90% лейкозных blasts. Все пациенты подписали информированное согласие согласно требованиям комитета по этике университетского госпиталя Вюрцбурга.

В другом варианте метода, изложенного в примере 3, получали специфические для цитомегаловируса (CMV) человеческие T-клетки: в целом, метод состоял в следующем: получали дендритные клетки (DC) из прикрепленных к пластику моноцитов из PBMC HLA-A0201-негативного, B0702-позитивного донора. После культивирования в течение 72 ч в содержащей GM-CSF/IL4 DC-среде (фирма Cellgenix), DC давали созреть в среде, содержащей IL4 (100 нг/мл), GM-CSF (800 мед./мл), LPS (10 нг/мл) и IFN γ (100 ед./мл) плюс 2,5 мкг/мл выведенного из CMV pp65 пептида TPRVTGGG. Через 16 ч DC облучали (30 Гр) и совместно инкубировали с CD45RO⁺, CD57⁺наивными (нестимулированными) CD8⁺-T-клетками в соотношении 1:4 в среде, содержащей 5% АВ-сыворотки и IL21 (10 нг/мл). Добавляли свежую среду, IL7 и IL15 в дни 3, 5 и 7 культивирования, после чего осуществляли оценку в день 10-12. Клетки культивировали в среде Cellgenix DC. Человеческую АВ-сыворотку получали от фирмы PAA. Одну индивидуальную партию применяли во всех экспериментах. IL4, IL7, IL15, IL21 покупали либо у фирмы Perrotech, либо у фирмы Cellgenix (в обоих случаях получали идентичные результаты). GM-CSF покупали у фирмы Gentaug. LPS (E.coli 0:15) покупали у фирмы Sigma. CMV-специфический HLA-B0702-ограниченный пептид TPRVTGGG покупали у фирмы Jrt. Для экспериментов in vivo CMV-специфические T-клетки дополнительно очищали с использованием APC (аллофикоцианин)-меченных мультимеров ГКГ (фирма Immudex). Окрашивание мультимеров ГКГ осуществляли при комнатной температуре, после чего выделяли ГКГ-мультимерные⁺ T-клетки с помощью анти-APC-гранулы (Miltenyi).

Пример 4.

Функциональные анализы.

Проточная цитометрия.

Связывание включающих антитела слитых белков с антигенпрезентирующими опухолевыми клетками и/или T-лимфоцитами тестировали с помощью проточной цитометрии. Для этой цели 2,5-5×10⁵ клеток инкубировали с 10 мкг/мл scFv или 0,004-4 мкг/мл титрованных слитых белков в 100 мкл приемлемого буферного раствора (такого как 3ФР +бычий сывороточный альбумин, или другого приемлемого буферного раствора) на лунку 96-луночного планшета V-образной формы при 4°C в течение 2 ч. После трехкратной промывки с использованием 150 мкл приемлемого буферного раствора клетки инкубировали с конъюгированным с ФИТЦ антителом к His₆-метке или антителом к Flag-метке, или антителом к тус-метке при КТ в течение 30 мин и вновь дважды промывали. Для установки дискриминационного окна и тестирования фонового окрашивания приготавливали дополнительно по два образца для каждого типа клеток, один включал неокрашенные клетки, а другой окрашенные конъюгированным с ФИТЦ антителом к His₆-метке без какого-либо белка. И, наконец, клетки ресуспендировали в 500 мкл приемлемого буферного раствора, переносили в FACS-пробирки и анализировала методом проточной цитометрии.

Анализ стимуляции PBMC.

Симулирующие свойства рекомбинантных белков тестировали с использованием клеточного анализа стимуляции. При этом определяли T-клеточную активацию, опосредуемую биспецифическими антителами и "тридоменными конструкциями", измеряя стимуляцию PBMC на основе индуцированного высвобождения IL-2.

Измерение стимулирующей активности конструкций.

CD45-позитивные/HLA A2-клетки миеломы линии U266 высевали в плоскодонный 96-луночный планшет для культуры клеток с плотностью 10 клеток на лунку в 100 мкл культуральной среды. Добавляли титрованные стимулирующие белки в указанном количестве в 100 мкл среды на лунку и предварительно инкубировали в течение 1 ч при 37°C и 5% CO₂ для гарантии достаточного связывания. Затем нестимулированные PBMC, которые подвергали оттаиванию и выделяли за 1 день до этого, добавляли с указанной плотностью и инкубировали в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂. И, наконец, планшеты центрифугировали в течение 5 мин при 450×g для сбора бесклеточных супернатантов для количественной оценки IL-2 с помощью ELISA.

Сэндвич-ELISA для оценки IL-2.

Служащую в качестве индикатора стимулирующей активности T-клеточную активацию, индуцированную биспецифическими антителами, измеряли на основе высвобождения IL-2. После стимуляции PBMC определяли концентрацию секретируемого IL-2 в супернатанте с помощью предназначенного для оценки IL-2 сэндвич-ELISA.

Сначала сенсibilizировали 96-луночный планшет для ELISA, используя 400 нг/100 мкл на лунку мышинового антитела к человеческому IL-2, в течение ночи при 4°C, после чего осуществляли насыщение неспецифических сайтов связывания приемлемым блокирующим буфером в течение 2 ч при КТ. Параллельно приготавливали с дублированием серийные разведения 1:2 стандарта IL-2 в реагенте для разведения, начиная с максимальной концентрации IL-2 1000 пг/мл. Затем содержащие IL-2 супернатанты разводили в соотношении 1:3 средой RPMI 1640, содержащей 10% FCS и Pen-Strep (пенициллин-стрептомицин). И разведенные супернатанты, и стандарты переносили в планшет для ELISA и инкубировали в течение 2 ч при КТ. Затем выявляли IL-2 путем инкубации с 17,5 нг/100 мкл лунку биотинилированного козьего антитела к человеческому IL-2 в течение 2 ч при КТ. И, наконец, добавляли по 100 мкл на лунку конъюгированного с HRP стрептавидина, разведенного в соотношении 1:200 реагентом для разведения, и инкубировали в течение 20 мин при КТ. Каждый планшет анализировали, используя раствор ТМВ в качестве субстрата. Для получения фонового сигнала по меньшей мере две лунки на каждом планшете инкубировали с реагентом для разведения или только средой и идентифицирующим антителом плюс ТМВ. Между каждой стадией инкубации планшет промывали трижды ЗФР, содержащим 0,05% Твин-20, и однократно только ЗФР.

Получали по семи точкам стандартную кривую, строя график зависимости сигналов абсорбции каждого стандартного образца от концентрации IL-2. Таким образом можно определять количество IL-2 в каждом супернатанте путем интерполяции стандартной кривой, подобранной с помощью уравнения нелинейной регрессии для однофазной экспоненциальной ассоциации, с использованием программы GraphPad Prism®.

ELISA для IFN-γ (другой вариант метода, изложенного в примере 4).

Измеряли концентрацию IFN-γ в 100 мкл супернатанта клеточной культуры, используя набор ELISA для оценки человеческого IFN-γ (Invitrogen™) согласно протоколу производителя. В целом, метод состоял в следующем: 50 мкл буфера для инкубации добавляли в каждую лунку предварительно сенсibilizированного 96-луночного планшета. По 50 мкл стандартного буфера для разведения добавляли в лунки, обозначенные как "нулевые" лунки. В каждую лунку по 50 мкл стандартов и образцов добавляли. В каждую лунку добавляли по 50 мкл раствора биотинилированного конъюгата Ни IFN-γ-биотин. Постукивали осторожно по бокам планшета для смешения. Закрывали планшет крышкой для планшета и инкубировали в течение 1 ч 30 мин при комнатной температуре. Тщательно аспирировали раствор из лунок и жидкость отбрасывали. Промывали 4 раза. В каждую лунку добавляли по 100 мкл рабочего раствора, содержащего стрептавидин-HRP. Закрывали планшет крышкой для планшета и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. Тщательно аспирировали раствор из лунок и жидкость отбрасывали. Добавляли в каждую лунку по 100 мкл стабилизированного хромогена. Жидкость в лунках приобретала голубой цвет. Инкубировали в течение 15-30 мин при комнатной температуре в темноте. Добавляли в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора. Постукивали осторожно по бокам планшета для смешения. Цвет раствора в лунках изменялся с голубого на желтый. Считывали абсорбцию в каждой лунке с помощью планшет-ридера BioRad при 450 нм.

Анализ цитотоксичности.

HLA-A2/CD45-позитивную клеточную линию миеломы U266 или клеточную линии миеломы U266 метили с помощью 10 мкМ CFSE (фирма Invitrogen, набор Vybrant CFDA SE Cell Tracer) в 350 мкл ЗФР в течение 10 мин при комнатной температуре (КТ) в темноте. Реакцию мечения прекращали, добавляя 5 мл фетальной телячьей сыворотки (FCS), после чего инкубировали в течение 1 мин при КТ. После двух промывок меченные с помощью CFSE клетки-мишени ресуспендировали в среде для анализа и инкубировали совместно с мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC), полученными из HLA-A2-негативного здорового донора, в соотношении 1:10 (5×10⁵ U266 и 5×10⁶ PBMC в 2 мл) и 27 нМ указанными конструкциями антител. Образец, обработанный Тритоном, применяли в качестве положительного контроля (лизис 100%), а образец без конструкции антитела применяли в качестве отрицательного

контроля (лизис 0%). Через 24 ч апоптозные клетки визуализировали путем окрашивания 7AAD (фирма Biotzol, 10 мин при КТ) и рассчитывали % специфического лизиса меченных с помощью CFSE U266-клеток, используя метод проточной цитометрии.

Анализ активности каспазы-3 (другой вариант метода, изложенного в примере 4).

Окрашивание осуществляли после совместной инкубации в течение 4 ч клеток-мишеней и Т-клеток (соотношение опухолевых клеток: Т-клеток 2:1) с добавлением специфических полипептидов или без них. Сначала осуществляли окрашивание поверхности для выявления HLA-A2 и CD4, затем осуществляли фиксацию и повышали проницаемость (Fix+Perm, фирма BD Biosciences). Затем в течение 30 мин добавляли антитело к активированной каспазе-3 (фирма BD Biosciences). Клетки промывали 1×3ФР + 5% человеческой сыворотки (HS, фирма PAA Laboratories) и анализировали с помощью устройства BD-FACS Canto-II. Рассчитывали процент специфического апоптоза по формуле (экспериментальная величина в % - спонтанное высвобождение в %)/(100% - спонтанное высвобождение в %)×100.

Анализ с использованием Alamar blue (другой вариант метода, изложенного в примере 4).

Анализ с использованием alamarBlue® (фирма Abd Serotec) применяли для оценки пролиферации и жизнеспособности клеток после воздействия токсинов. В целом, метод состоял в следующем: клетки выращивали в 100 мкл культуральной среды на лунку (96-луночный планшет). Для анализа добавляли на лунку по 10 мкл alamarBlue и выдерживали в инкубаторе в течение 30-120 мин. Абсорбцию считывали с помощью планшет-ридера BioRad при длинах волн 570 и 600 нм. В качестве "пустого" контроля использовали только среду. Рассчитывали разницу (в процентах) снижения клеточной пролиферации для различных групп полипептидов согласно инструкции производителя, используя в качестве контроля клетки, выращенные в культуре без токсина

Анализ с использованием дигоксигенина (другой вариант метода, изложенного в примере 4).

Сначала пероксидазу из хрена (HRP, фирма Sigma-Aldrich Chemie gmbH) метили NHS-эфиром дигоксигенина (Dig) (фирма Sigma-Aldrich Chemie gmbH) в молярном соотношении 1/3. Dig-HRP очищали с помощью хроматографических колонок микро-Bio-Spin™ (фирма BioRad) и хранили при 4°C в темноте. Клетки линии Colo-206F сначала инкубировали с указанными полипептидами в различных концентрациях в течение 90 мин. Клетки промывали 3ФР и ресуспендировали в среде для культуры клеток с Dig-HRP и инкубировали в течение 30 мин. Затем клетки промывали дважды 3ФР и ресуспендировали в 50 мкл 3ФР. Добавляли 50 мкл стабилизированного хромогена (Invitrogen™) в течение 15-30 мин при комнатной температуре в темноте. Добавляли 50 мкл стоп-раствора и абсорбцию считывали с помощью планшет-ридера BioRad при 450 нм.

Опыты на мышах (другой вариант метода, изложенного в примере 4).

Трансгенных по HLA.A2 мышей с иммунодефицитом (NodScid IL-2rg -/HLA.A2/B2m tg; номер пары 14570, фирма The Jackson Laboratory, Бар-Харбор, шт. Мэн, США), на которых осуществляли эксперимент in vivo (фиг. 12A), содержали в принадлежащем фирме-заявителю сертифицированном помещении, предназначенном для выращивания животных (ZEMM, Центр экспериментальной молекулярной медицины, госпиталь университета Вюрцбурга) согласно европейским руководствам. Самок мышей возрастом 6-10 недель разделяли на 5 групп по шесть мышей на группу (n = 30). Инъекцировали внутрибрюшинно (i.p.) по 5×10^6 ТНР-1-клеток, $1,25 \times 10^5$ CMV-специфических CD8 -Т-клеток (соотношение опухолевых клеток: Т-клеток 40/1) и 0,5 мкг полипептидов, как указано. После инъекции осуществляли ежедневный мониторинг мышей. Вторую инъекцию $1,16 \times 10^5$ CMV-специфических CD8 -Т-клеток/мышь осуществляли в день 13 и инъекции полипептидов повторяли каждые три дня в неделю. Животных умерщвляли, когда повышение веса тела превышало 80%, или, если у них начиналась агония, в соответствии с институтскими правилами.

Структура доменов, аффинных меток и линкеров конструкций или полипептидов, которые применяли в примерах 5-9 или на фиг. 4-11, представлены на фиг. 3. Эти конструкции и все конструкции или полипептиды, указанные на фиг. 4-30, получали согласно методам, описанным в примерах 1 и 2. Культивирование клеток и функциональные анализы, описанные в примерах 5-9, а также культивирование и функциональные анализы in vivo, результаты которых представлены на фиг. 4-30, осуществляли согласно методам, описанным в примерах 3 и 4.

Пример 5.

CD45- и HLA A2-позитивные клетки-мишени миеломы линии U266 совместно инкубировали с HLA A2-негативными Т-клетками (PBMC (моноклеарные клетки периферической крови) с пониженным содержанием моноцитов) из здорового донора и различными количествами указанных конструкций биспецифических антител к HLA A2 и CD3 (номера 85, 82, 75 и 71). ФГА-L (фитогемагглютинин, лектин, который вызывает неспецифическую стимуляцию Т-клеток; конечная концентрация 1 мкг/мл) применяли в качестве положительного контроля, исследовали также одноцепочечные scFv-конструкции, специфические в отношении HLA A2 (номер 4) или CD3 (номер 36). Производство IL2 (интерлейкин-2) Т-клетками оценивали с помощью методов ELISA. Никакого производства IL2 не было обнаружено в экспериментальных ситуациях, в которых конструкции не применяли. Полученные данные представлены на фиг. 4.

Пример 6.

CD45- и HLA A2-позитивные клетки-мишени миеломы линии U266 совместно инкубировали с HLA A2-негативными Т-клетками (PBMC с пониженным содержанием моноцитов) из здорового донора и различными количествами "тридоменных" конструкций, которые добавляли либо индивидуально (номера 42, 45, 55; номера соответствуют конструкциям, указанным на фиг. 3), либо в комбинациях (42 + 45 или 42 + 55). В качестве контролей применяли ФГА-Л и одноцепочечные scFv-конструкции, специфические в отношении CD45 (номера 46 и 17). Производство IL2 Т-клетками оценивали с помощью методов ELISA. Никакого производства IL не обнаружено в экспериментальных ситуациях без применения конструкций. Полученные данные представлены на фиг. 5.

Пример 7.

CD45- и HLA A2-позитивные клетки-мишени миеломы линии U266 совместно инкубировали с HLA A2-негативными Т-клетками (PBMC с пониженным содержанием моноцитов) из здорового донора и с конструкцией биспецифических антител к HLA A2 и CD3, взятой индивидуально (номер 71, 27 нМ) или в комбинации с одноцепочечными scFv-конструкциями, которые блокируют антигенные эпитопы на HLA A2 (номер 4, стократный избыток по сравнению с концентрацией конструкции 71, т.е. 2700 нМ) или на CD3 (номер 36, девятикратный избыток по сравнению с концентрацией конструкции 71, т.е. 243 нМ). Производство IL2 Т-клетками оценивали с помощью методов ELISA и ФГА-Л использовали в качестве контроля. Полученные данные представлены на фиг. 6.

Пример 8.

CD45- и HLA A2-позитивные клетки-мишени миеломы линии U266 совместно инкубировали с HLA A2-негативными Т-клетками (PBMC с пониженным содержанием моноцитов) из здорового донора и с комбинацией конструкций 42 и 45. Функцию стимуляции Т-клеток блокировали с помощью одноцепочечных конструкций, специфических в отношении HLA A2 (номер 4) или CD45 (номер 46). Комплементацию стимулирующей Т-клетки функции тестировали путем оценки конструкций 42 и 45 индивидуально или одноцепочечной конструкции scFv, мишенью которой является CD3 (номер 36). Производство IL2 Т-клетками оценивали с помощью методов ELISA и ФГА-Л использовали в качестве контроля. Концентрация конструкций составляла 27 нМ, если не указано иное ("9×" обозначает концентрацию 243 нМ, "100×" обозначает концентрацию 2700 нМ.) Полученные данные представлены на фиг. 7.

Пример 9.

CD45- и HLA A2-позитивные клетки-мишени миеломы линии U266 совместно инкубировали с HLA A2-негативными Т-клетками (PBMC с пониженным содержанием моноцитов) из здорового донора и с комбинацией конструкций 42 и 55. Функцию стимуляции Т-клеток блокировали с помощью одноцепочечных конструкций, специфических в отношении HLA A2 (номер 4) или CD45 (номер 46). Комплементацию стимулирующей Т-клетки функции тестировали путем оценки конструкций 42 и 55 индивидуально или одноцепочечной конструкции scFv, мишенью которой является CD3 (номер 36).

Производство IL2 Т-клетками оценивали с помощью методов ELISA и ФГА-Л использовали в качестве контроля. Концентрация конструкций составляла 27 нМ, если не указано иное ("9×" обозначает концентрацию 243 нМ, "100×" обозначает концентрацию 2700 нМ.) Полученные данные представлены на фиг. 8.

Результаты, описанные в предыдущих примерах, четко демонстрируют, что две конструкции (42+45) или (42+55) сначала должны связываться с их лигандами на поверхности индивидуальной клетки для того, чтобы затем комплементировать функцию привлечения Т-клеток.

Пример 10.

Определяли лизис CD45- и HLA A2-позитивных клеток-мишеней миеломы линии U266 с помощью HLA A2-негативных Т-клеток (PBMC с пониженным содержанием моноцитов) в присутствии V_L CD3-scFvHLA A2 (27 нМ) или V_H -scFvCD45 (27 нМ) или комбинации обеих конструкций (по 27 нМ каждая), с использованием методов на основе проточной цитометрии. Процент лизиса рассчитывали путем деления количества апоптотных клеток линии U266 на общее количество клеток линии U266 и вычитания фонового уровня апоптоза. Полученные данные представлены на фиг. 9.

Пример 11.

Создавали два полипептида в качестве частей конечной двухкомпонентной конструкции, каждый из которых содержал антигенсвязывающий одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv) и либо варибельный домен легкой цепи (V_L), либо варибельный домен тяжелой цепи (V_H) активирующего Т-клетки антитела к CD3 (фиг. 10). Когда эти два полипептида связывались с соответствующими антигенами на поверхности одной клетки, то V_L - и V_H -домены взаимодействовали друг с другом с реконструированием подлинного сайта связывания антитела к CD3. Сформированный таким образом на мишени триспецифический гетеродимер привлекал Т-клетки и стимулировал Т-клетки осуществлять деструкцию опухолевой клетки.

Этот сценарий нашел полное подтверждение *in vitro*, когда Т-лимфоциты "противостояли" клеткам-мишеням, которые инкубировали с двумя различными полипептидами. В качестве доказательства этого принципа антиген главного комплекса гистосовместимости HLA-A2 и маркер гематопоэтической кле-

точной линии дифференцировки CD45 были выбраны в качестве первого и второго антигена-мишени, которые оба экспрессировались на клетках миеломы линии U266, первичных клетках пациента, страдающего пролимфоцитарным лейкозом Т-клеточной линии дифференцировки (Т-PLL), и острым миелоластным лейкозом ТНР-1 (фиг. 11). Благодаря описанному взаимодействию V_L/V_H , новый триспецифический гетеродимер эффективно стимулировал Т-клетки секретировать интерлейкин-2 (IL-2) (фиг. 11а) и лизировать меченые опухолевые клетки при его использовании в наномолярной концентрации (фиг. 11б), при этом цитотоксическая активность являлась практически такой же, что и активность биспецифического активирующего Т-клетки антитела, которое применяли в качестве положительного контроля (фиг. 11А, левая панель) (Mack, Proc Natl Acad Sci 92, 1995, с. 7021-7025). Когда полипептиды добавляли отдельно друг от друга, то они не могли индуцировать лизис Т-лимфоцитами клеток-мишеней. Эти результаты согласуются с данными о структурах, которые свидетельствуют о том, что требуется, чтобы и V_H -, и V_L -домен обладал достаточной аффинностью к антигену-мишени (фиг. 11А, Б) (Colman, Nature, 326, 1987, с. 358-363; Amit, Science, 233, 1986, с. 747-753). Кроме того, результаты подтвердили, что возможная гомодимеризация либо V_H -, либо V_L -плеча приводила к незначительному изменению оцениваемого биологического действия.

Для демонстрации того, что две молекулы должны сначала связываться с их антигенами на поверхности клетки-мишени для того, чтобы имела место гетеродимеризация V_H/V_L , одноцепочечные вариабельные фрагменты, специфические в отношении HLA-A2 и CD45, применяли для блокады соответствующих эпитопов на мишени. Как видно из фиг. 11 в, когда они присутствовали в значительных избыточных количествах, то эти ингибиторы препятствовали запуску Т-клеток с помощью двух полипептидов в зависимости от дозы. Кроме того, Т-клетки не стимулировались, когда клетки-мишени отсутствовали (данные не представлены), или, когда применяли клетки-мишени, которые экспрессировали только CD45 (RAI-клетки, фиг. 11г), или не экспрессировали никакой молекулы-мишени (KMS-12-ВМ, фиг. 11г).

Пример 12.

Для доказательства *in vivo* концепции создавали модель аллогенной трансплантации несовместимых стволовых клеток, при которой оставшиеся в организме пациента лейкозные и гематопоэтические клетки, все HLA-A2- и CD45-позитивные, должны быть элиминированы, давая шанс аллогенным донорским стволовым клеткам (HLA-A2-негативные, CD45-позитивные) прижиться и восстановить гематопоз (см. фиг. 2). С учетом специфичности двухкомпонентной конструкции, подлежащей тестированию, использовали мышей с иммунодефицитом, которые экспрессировали человеческий трансген HLA-A2 практически на всех нуклеарных клетках, при этом вопрос состоял в том, будут ли HLA-A2-позитивные, но CD45-негативные ткани мышей подвергаться коллатеральному повреждению. ТНР-1-клетки инъецировали внутривентриально без или вместе с CD8-Т-лимфоцитами из HLA-A2-негативного донора, который был выбран по признаку специфичности в отношении цитомегаловируса (CMV), для того, чтобы избежать человеческой антимишиной иммунной реакции. Внутривентриальные опухоли быстро развивались у мышей, которым не вводили полипептиды, и у мышей, которых обрабатывали либо только молекулами одного типа или комбинацией обоих полипептидов, но без Т-клеток. Во всех случаях фатальное диссеминированное заболевание развивалось в течение 3-4 недель (фиг. 12А). В полной противоположности этому, все несущие опухоли мыши, которых обрабатывали Т-клетками и повторяющимися инъекциями обоих полипептидов, оставались живыми в конце эксперимента в день 31, хотя у них при пальпации обнаруживали опухоли в области инъекции. Эти результаты ясно демонстрируют, что двухкомпонентная конструкция действительно переориентирует Т-клетки вне зависимости от их специфичности к опухолевым клеткам, которые одновременно экспрессируют обе молекулы-мишени (HLA-A2 и CD45) *in vivo*. В отличие от этого, рекрутмент Т-клеток биспецифическими антителами к HLA-A2 может оказывать губительное действие в результате переориентации Т-клеток против всех HLA-A2-позитивных тканей мышей. Аналогично этому, CD45-связывающее биспецифическое антитело может опосредовать лизис всех гематопоэтических клеток, включая клетки бластного лейкоза ТНР-1 и Т-клетки донора. Однако при осуществлении предложенного в настоящем изобретении способа инъекция HLA-A2-специфического полипептида в трансгенных по HLA-A2 животных, не вызывала заметного токсического действия.

Для дополнительной оценки возможной нецелевой токсичности при создании изобретения применяли высокочувствительный анализ апоптоза, который осуществляли с использованием ТНР-1-клеток и HLA-A2-негативных, но CD45-позитивных моноцитов, последние представляли собой здоровый "компармент-свидетель". Как продемонстрировано на фиг. 12Б, обнаружена активация каспазы-3 в ТНР-1-клетках, но не в моноцитах, обработанных аналогичным образом комбинацией полипептидов или биспецифическим положительным контролем и донорскими Т-клетками. ТНР-1-клетки, которые культивировали в Т-клетками и индивидуальными полипептидами, не повреждались. Эти данные также ясно демонстрируют, что инициация апоптоза происходила только в популяции-мишени, позитивной по двум антигенам, в то время как HLA-A2-негативные "клетки-свидетели" сохранялись. Эта экспериментальная модель достаточно точно имитирует ситуацию у страдающих лейкозом пациентов с трансплантатом стволовых клеток с несовместимым HLA. Комбинаторный подход, основанный на применении различных HLA-молекул и CD45, способствует повышению требуемых воздействий трансплантата на лейкоз путем

перенацеливания (переориентации) донорских Т-клеток на лейкозные бласты как миелоидного, так и лимфоидного происхождения.

Пример 13.

Для тестирования стратегии на солидных опухолях при создании изобретения комбинаторный подход применяли к антигенам, представляющим собой эпителиальную молекулу клеточной адгезии (ЕрСАМ) и рецептор эпидермального фактора роста (EGFR). Для обоих антигенов характерна сверхэкспрессия при различных карциномах, и они подробно изучены на фазе II и III клинических испытаний. Экспрессия EGFR тесно ассоциирована с клеточной пролиферацией, а ЕрСАМ присутствует на базолатеральной поверхности практически всех образцов эпителия, и в последнее время обнаружено, что действие этой молекулы напоминает действие сигнального белка в Wnt-пути (Maetzel, Nat Cell Biol, 11, 2009, с. 162-171). Как проиллюстрировано на фиг. 13а, два полипептида запускают высвобождение интерферона- γ (IFN γ) из совместно инкубированных донорских лимфоцитов и опосредуют апоптоз дважды-позитивной раковой клеточной линии COLO-206F при их применении в наномолярных концентрациях (фиг. 13а, б), но только, когда их применяют в комбинации, а не один из компонентов индивидуально. Являясь потомком нейроэпителиальной ткани, клетки меланомы линии FM-55 лишены ЕрСАМ, и поэтому они являются полностью устойчивыми к полипептидам (фиг. 13а, б). Хотя экспрессия EGFR и ЕрСАМ часто перекрывается на пролиферирующих клетках карцином, непролиферирующие эпителиальные клетки, например, печени и поджелудочной железы, которые экспрессируют индивидуально антигены EGFR или ЕрСАМ соответственно, должны обладать меньшей чувствительностью или должны быть защищены от "двунаправленной" атаки. Следует отметить, что токсичность в отношении печени и поджелудочной железы является ограничивающим дозу фактором для обладающих высокой аффинностью моноклональных антител к ЕрСАМ по данным, полученным в клинических испытаниях (см., обзор Munz, Cancer Cell Int, 10, 2010, с. 44).

Пример 14.

Дополнительную валидацию стратегии, основанной на двухкомпонентной функциональной комплементации, осуществляли с помощью обширных экспериментов *in vitro*, используя комбинацию различных полипептидов, мишенью которых являются различные антигены клеточной поверхности различных человеческих клеточных линий.

HLA A2-позитивные человеческие опухолевые клеточные линии FM-55 (миелома), Colo-206F (колоректальный рак) и OVCAR (рак яичников) инкубировали совместно с HLA-A2-негативными PBMC из здорового донора, полипептидом, направленным против HLA-A2 (CD3(V_L) - HLA-A2(V_H-V_L)) и вторым полипептидом, мишенью которого является либо CEA (CD3(V_H) - CEA(V_H-V_L)), либо EGFR (CD3(V_H) - EGFR(V_H-V_L)), либо Her2 (CD3(V_H) - Her2(V_H-V_L)). Производство лимфоцитами IL2 или IFN- γ оценивали с помощью методик ELISA. Эти данные продемонстрировали, что (I) специфическая комбинация антигенов, антигенных сигнатур может экспрессироваться на карциномах различного происхождения (кожная, нейроэпителиальная ткань, ткань кишечника и яичника), (II) антигенная сигнатура пригодна для осуществления представленной в настоящем изобретении стратегии двухкомпонентной функциональной комплементации с использованием набора полипептидов, специфических в отношении антигенной сигнатуры. Полученные данные представлены на фиг. 14, 15 и 16.

Пример 15.

Для демонстрации взаимозаменяемости функционального домена заменяли друг на друга фрагменты F1 и F2 набора полипептидов, сохраняя их специфическую способность к комплементации на мишени с реконструкцией способности исходных доменов антител привлекать Т-клетки. Для этой цели использовали набор полипептидов, антигенами-мишенями которых являлись CD45 и HLA-A2. Полипептид к CD45 включал CD3(V_L) в качестве фрагмента F1 и полипептид к HLA-A2 включал CD3(V_H) в качестве фрагмента F2. CD45- и HLA-A2-позитивные клетки миеломы линии U266 совместно инкубировали с HLA-A2-негативными Т-клетками из здорового донора и полипептидами к CD45 (CD3(V_L) - CD45(V_H-V_L)) и HLA-A2 (CD3(V_H) - HLA-A2(V_H-V_L)) в различных количествах. Привлечение Т-клеток оценивали по производству реактивного IFN γ , которое определяли с помощью методов ELISA. Никакого производства IFN γ не обнаружено в экспериментальных ситуациях, в которых отсутствовали какие-либо полипептиды. Полученные данные представлены на фиг. 17.

Пример 16.

Стратегию двухкомпонентной функциональной комплементации дополнительно тестировали путем направленного воздействия на набор антигенов, уже применяемых в качестве мишеней для терапии рака с помощью антител (EGFR, ЕрСАМ и Her2) (Her2 является мишенью для трастузумаба при лечении рака молочной железы, EGFR является мишенью для цетуксимаба при колоректальном раке и ЕрСАМ является мишенью для катумазумаба при лечении неопластических асцитов). EGFR-, ЕрСАМ- и Her2-позитивные клетки (Colo-206F, CX-1 и OVCAR) совместно инкубировали с PBMC из здорового донора и комбинацией полипептидов к EGFR (CD3(V_H) - EGFR(V_H+V_L)), ЕрСАМ (CD3(V_L) - ЕрСАМ(V_H+V_L)) и Her2 (CD3(V_H) - Her2(V_H+V_L)). Комплементацию стимулирующей функции лимфоцитов оценивали по производству реактивного IFN γ , определяемому с помощью методик ELISA. Никакого производства

IFN γ не обнаружено в экспериментальных ситуациях, в которых отсутствовали какие-либо полипептиды. Полученные данные представлены на фиг. 18 и 19.

Пример 17.

Для тестирования комбинации антигенов с близкой клинической корреляцией комбинацию CD45 и CD138 применяли для направленного воздействия на клетки человеческой множественной миеломы (ММ). Большинство клеток человеческой ММ являются позитивными по CD45 и CD138. Вызывающие рекрутмент Т-клеток биспецифические антитела к CD45 могут уничтожать все гематопоетические клетки пациента, а антитела к CD138 могут вызывать серьезные побочные действия из-за их экспрессии в различных здоровых тканях (эпителиальные клетки, эндотелий, трофобластные клетки и железистые клетки ЖК-тракта (Атлас человеческих белков, версия: 10.0, атлас переработан 9 декабря 2012 г.). В отличие от этого, комбинация CD45 и CD138 встречается исключительно на плазматических клетках и ММ-клетках и поэтому является ценной антигенной сигнатурой для направленного терапевтического подхода. CD45- и CD138-позитивные клетки человеческой множественной миеломы линии АМО-1 совместно инкубировали с РВМС из здорового донора и комбинацией полипептидов к CD45 (CD3(V_L) - CD45(V_H+V_L)) и CD138 (CD3(V_H) - CD138(V_H+V_L)). Комплементацию стимулирующей функции лимфоцитов оценивали по производству реактивного IFN γ , определяемому с помощью методик ELISA. Никакого производства IFN γ не обнаружено в экспериментальных ситуациях, в которых использовали индивидуальные полипептиды или отсутствовали какие-либо полипептиды. Полученные данные представлены на фиг. 20.

Пример 18.

Другим применением стратегии двухкомпонентной функциональной комплементации является нацеливание на единичные индивидуальные антигены-мишени на клеточной поверхности и уничтожение опухолевых клеток, позитивных по одному антигену. Одним из основных недостатков Т-клеточного рекрутмента биспецифическими антителами с функциональными анти-CD3 связывающими сайтами являются серьезные побочные действия, вызываемые неспецифической Т-клеточной активацией и цитокиновым выбросом (Linke R. и др., Catumaxomab: clinical development and future directions. MAbs 2, 2010, с. 129-136). Преимуществом предлагаемой в изобретении стратегии двухкомпонентной функциональной комплементации является тот факт, что активирующий Т-клетки функциональный домен антитела к CD3 реконструируется исключительно на клетке-мишени. В отсутствие клетки-мишени никакой активирующий Т-клетки домен не присутствует. CD45- и CD138-позитивные клетки человеческой множественной миеломы линии АМО-1 и U266 инкубировали совместно с РВМС из здорового донора и комбинацией полипептидов, направленных к одному антигену-мишени, либо CD138 (CD3(V_H) - CD138(V_H+V_L) + CD3(V_L) - CD138(V_H+V_L)), либо CD45 (CD3(V_H) - CD45(V_H+V_L) + CD3(V_L) - CD45(V_H+V_L)). Комплементацию стимулирующей лимфоцита функции оценивали по производству реактивного IFN γ , определяемому с помощью методик ELISA. Никакого производства IFN γ не обнаружено в экспериментальных ситуациях, в которых использовали индивидуальные полипептиды или отсутствовали какие-либо полипептиды. Полученные данные представлены на фиг. 21 и 22. На фиг. 23 проиллюстрирован подход, основанный на применении одного антигена, включающий использование набора полипептидов, мишенью которых являются два различных эпитопа (верхняя часть) или один и тот же эпитоп (нижняя часть) на антигене-мишени А1.

Пример 19.

В данном примере продемонстрировано, что стратегию функциональной комплементации можно дополнительно развивать для направленного введения "полезного груза", и что для уничтожения клетки-мишени можно использовать различные эффекторные пути. Путем комплементации F1- и F2-фрагментов из набора связанных полипептидов на мишени, вновь образовавшийся сайт связывания антитела может связывать любую специфическую для него молекулу. Для направления меченого с помощью HIS "полезного груза" точно к клетке-мишени применяли V_H- и V_L-фрагменты антитела к HIS(гексагистидин). После одновременного связывания полипептида 1 (анти-His(V_L)-CD45(V_H-V_L)) и полипептида 2 (анти-His(V_H)-HLA-A2(V_H-V_L)) со специфическими для них антигенами-мишенями CD45 и HLA-A2, сайт связывания гексагистидина комплементируется на мишени, которая связывает меченный с помощью гистидина "полезный груз" с высокой аффинностью. "Полезный груз" может представлять собой меченный с помощью HIS токсин из представленных в качестве примера в настоящем описании. CD45- и HLA-A2-позитивные ТНР-1-клетки инкубировали совместно с меченым гистидином(His) компонентом Ia йота-токсина Clostridium perfringens (фиг. 24) или с меченой гистидином(His) субъединицей А шига-токсина (фиг. 25, 26) в сочетании с полипептидами к CD45 (анти-His(V_L)-CD45(V_H-V_L)) и к HLA-A2 (анти-His(V_H)-HLA-A2(V_H-V_L)). Комплементацию связывания меченого с помощью his токсина и последующее уничтожение клетки-мишени оценивали по жизнеспособности клеток с помощью alamarBlue®-анализа. При наиболее высокой из применяемых концентрации полипептидов (80 нМ) обнаружено выраженное различие в уничтожении клеток-мишеней, оцененное по жизнеспособности клеток, в экспериментальных ситуациях, в которых использовали комбинацию обоих полипептидов, по сравнению с вариантом, в котором применяли единичные полипептиды.

Пример 20.

Для дополнительной демонстрации многосторонности, гибкости и взаимозаменяемости стратегии двухкомпонентной функциональной комплементации V_H - и V_L -фрагменты антитела к дигоксигенину применяли для идентификации и маркировки позитивных по двум антигенам клеток с использованием меченой дигоксигенином HRP (пероксидаза из хрена). EGFR- и EpCAM-позитивные клетки Colo-206F инкубировали совместно с полипептидами к EGFR (анти-Dig(V_H) - EGFR(V_H+V_L)) и к EpCAM (анти-Dig(V_L) - EpCAM(V_H+V_L)). Комплементацию на мишени функционального домена антитела к дигоксигенину, что определяли по мечению комплексом дигоксигенин-HRP клеток Colo-206F, оценивали, измеряя пероксидазную активность, используя стандартный набор для ELISA (Invitrogen™). Выраженное различие в количестве меченых Dig-HRP клеток-мишеней обнаружено в экспериментальных ситуациях, в которых использовали комбинацию обоих полипептидов, по сравнению с вариантом, в котором применяли единичные полипептиды. Данные представлены на фиг. 27.

Пример 21.

Используя человеческие лейкоцитарные антигены (HLA) в качестве одного плеча для ограниченной (индуцированной) двумя антигенами двухкомпонентной функциональной комплементации, указанную основанную на применении гаплотипа стратегию дополнительно подтверждали путем замены функциональных доменов полипептидов на V_H - и V_L -фрагменты антитела к HLA-Cw6. Позитивные по HLA-Cw6 первичные PBMC пациента инкубировали совместно с HLA-Cw6-негативными PBMC из здорового донора, полипептидом против CD45 (CD3(V_L) - CD45(V_H-V_L)) и против HLA-Cw6 (CD3(V_H) - HLA-Cw6(V_H-V_L)). Производство $IFN\gamma$ лимфоцитами оценивали с помощью методик ELISA. Полученные данные продемонстрировали, что на гематопоэтические клетки пациентов с гаплотипами, отличными от HLA-A2, можно направленно воздействовать просто путем замены одного нацеливающего домена (анти-HLA-A2, фиг. 5, 7-9, 11-12) на другой (анти-HLA-Cw6). Полученные данные представлены на фиг. 28.

Пример 22.

Стратегию индуцированной двумя антигенами двухкомпонентной функциональной комплементации дополнительно подтверждали в анализах *in vitro*, используя полученные из организма пациента, применяя свежeweделенные первичные раковые клетки пациента, и антигены-мишени, применение которых для противораковой терапии уже известно в клинических условиях или клинических испытаниях (EGFR, EpCAM, CEA и Her2). Злокачественные клетки, взятые из организма мужчины возрастом 48 лет, страдающего метастатическим раком поджелудочной железы, инкубировали совместно с собственными лимфоцитами периферической крови пациента и комбинацией полипептидов против EGFR (CD3(V_H) - EGFR(V_H+V_L)), EpCAM (CD3(V_L) - EpCAM(V_H+V_L)), Her2 (CD3(V_H) - Her2(V_H+V_L)), CEA (CD3(V_H) - CEA(V_H-V_L)) и HLA-A2 (CD3(V_L) - HLA-A2(V_H-V_L)). Комплементацию стимулирующей лимфоциты функции оценивали по производству реактивного $IFN\gamma$, определяемому с помощью методик ELISA. Никакого производства $IFN\gamma$ не обнаружено в экспериментальных ситуациях, в которых отсутствовали какие-либо полипептиды. Полученные данные демонстрируют возможность применения указанной стратегии путем использования собственных иммунных клеток пациента для направленного воздействия и уничтожения его собственных злокачественных трансформированных клеток. Полученные данные представлены на фиг. 29.

Пример 23.

Т-клеточную популяцию, специфическую в отношении CMV с высоким содержанием CD3/CD8-позитивных клеток, применяли для демонстрации того, что любая Т-клетка, вне зависимости от ее специфичности, может служить в качестве эффекторной клетки и уничтожать позитивные по двум антигенам опухолевые клетки с помощью указанной стратегии комплементации. CD45- и HLA-A2-позитивные клетки U266 и THP-1 инкубировали совместно со специфическими в отношении цитомегаловируса (CMV) Т-клетками из HLA-A2-негативного здорового донора и полипептидами к CD45 (CD3(V_H) - CD45(V_H-V_L)) и к HLA-A2 (CD3(V_L) - HLA-A2(V_H-V_L)), взятыми в различных количествах. Биспецифическое тандемное антитело scFv (CD3(V_H-V_L) × HLA-A2(V_H-V_L)) применяли в качестве положительного контроля. Привлечение Т-клеток оценивали по производству реактивного $IFN\gamma$, определяемому с помощью методик ELISA. Никакого производства $IFN\gamma$ не обнаружено в экспериментальных ситуациях, в которых использовали индивидуальные полипептиды или отсутствовали какие-либо полипептиды. Полученные данные представлены на фиг. 30. Клетки из той же замороженной партии аликвот, т.е. CMV-специфические Т-клетки и THP-1-клетки, применяли в опытах *in vivo* на мышинной модели (фиг. 12A).

Пример 24.

В данном примере проиллюстрирована возможность направленного воздействия на комплекс алерген/аутоиммунные специфические В-клеточные клоны с использованием стратегии двухкомпонентной функциональной комплементации. Благодаря применению синтетического аллергена в качестве нацеливающего участка сцепленный с аллергеном полипептид должен специфически связываться с его клонотипическим В-клеточным рецептором, который экспрессируется на поверхности аллергенспецифического В-клеточного клона. В качестве второго плеча в двухкомпонентной стратегии следует использовать специфический для В-клеток полипептид (CD19, CD20, CD38, CD138), в результате чего после-

дующая комплементация ограничивается эффекторным доменом, что в последствие приводит к уничтожению клетки-мишени аллергенспецифического В-клеточного клона. Конечной целью этой стратегии является элиминация В-клеточного клона, который вызывает и аллергию и аутоиммунное заболевание (верхняя часть фиг. 31), сохраняя В-клетки с другими специфичностями или клетки, отличные от В-клеток, ответственных за рассматриваемое заболевание (например, тучные клетки или базофилы), которые связываются с антителом через Fc-рецепторы (нижняя часть фиг. 31).

Особенности настоящего изобретения, указанные в описании, формуле изобретения и/или в прилагаемых чертежах, могут как индивидуально, так и в любой их комбинации, являться основой для реализации изобретения в его различных формах.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Набор полипептидов для идентификации и/или элиминации клеток, которые имеют конкретную комбинацию двух специфических антигенов на своей клеточной поверхности, содержащий

первый полипептид P1, который содержит:

(I) нацеливающий участок T1,

где указанный нацеливающий участок T1 специфически связывается с антигеном A1, и

(II) фрагмент F1 функционального домена F,

где ни указанный фрагмент F1, ни указанный полипептид P1 не обладают функцией, соответствующей функции указанного домена F, и

второй полипептид P2, который содержит:

(I) нацеливающий участок T2,

где указанный нацеливающий участок T2 специфически связывается с антигеном A2, и

(II) фрагмент F2 функционального домена F,

где ни указанный фрагмент F2, ни указанный полипептид P2 не обладают функцией, соответствующей функции указанного домена F,

где указанный антиген A1 отличается от указанного антигена A2,

где указанный полипептид P1 и указанный полипептид P2 не ассоциируются друг с другом в отсутствие клетки, которая содержит оба антигена A1 и A2 на своей клеточной поверхности,

где после димеризации указанного фрагмента F1 указанного полипептида P1 с указанным фрагментом F2 указанного полипептида P2, образовавшийся в результате димер приобретает функцию, соответствующую функции указанного домена F, и

где указанный фрагмент F1 содержит V_L-домен антитела или указанный фрагмент F2 содержит V_H-домен этого же антитела; или где указанный фрагмент F1 содержит V_H-домен антитела и указанный фрагмент F2 содержит V_L-домен этого же антитела.

2. Набор полипептидов по п.1, где клетка, несущая оба антигена A1 и A2 на своей клеточной поверхности, индуцирует димеризацию фрагмента F1 указанного полипептида P1 с фрагментом F2 указанного полипептида P2, в то время как клетка, которая не несет оба антигена A1 и A2 на своей клеточной поверхности, не индуцирует димеризацию фрагмента F1 указанного полипептида P1 с фрагментом F2 указанного полипептида P2.

3. Набор полипептидов по п.1 или 2, где указанные полипептиды P1 и P2 в отсутствие указанного субстрата или указанной клетки имеют константу диссоциации друг от друга K_D, составляющую от 10⁻⁸ до 10⁻² М, от 10⁻⁷ до 10⁻³ М или от 10⁻⁶ до 10⁻³ М; и /или указанные полипептиды P1 и P2 в присутствии указанного субстрата или указанной клетки имеют константу диссоциации K_D ниже 10⁻⁶ М, ниже 10⁻⁷ М, ниже 10⁻⁸ М или ниже 10⁻⁹ М.

4. Набор полипептидов по одному из пп.1-3, где указанный антиген A1 и/или указанный антиген A2 представляет собой антиген, экспрессируемый на поверхности клеток опухоли или на поверхности клеток-предшественников/предшественников клеток опухоли.

5. Набор полипептидов по одному из пп.1-4, где комбинация антигена A1 и антигена A2 присутствует только на раковых клетках и отсутствует на клетках, которые не являются раковыми.

6. Набор полипептидов по п.5, где комбинация антигена A1 и антигена A2 является специфической для раковых клеток определенного типа рака.

7. Набор полипептидов по одному из пп.1-6, где указанный антиген A1 представляет собой антиген ГКГ, который является аллельным вариантом, выбранным из группы, состоящей из

HLA-A2, HLA-Cw6, HLA-A1, HLA-A3, HLA-A25, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B35, HLA-B44, HLA-Cw3, HLA-Cw4 и HLA-Cw7; и/или

указанный антиген A2 представляет собой антиген, специфический для определенного клеточного типа или определенной клеточной линии, выбранный из группы, состоящей из

CD45; CD34; CD33; CD138; CD15; CD1a; CD2; CD3; CD4; CD5; CD8; CD20; CD23; CD31; CD43; CD56; CD57; CD68; CD79a; CD146; белки сурфактанта; синаптофизин; CD56; CD57; рецептора никотинацетилхолина, специфической для мышц киназы MUSK; потенциалзависимого кальциевого канала (P/Q-типа); потенциалзависимого калиевого канала (VGKC), N-метил-D-аспаратного рецептора (NMDA);

TSH; амфифизина; HerPar-1; ганглиозида GQ1B, GD3 или GM1; и гликофорина-A.

8. Набор полипептидов по одному из пп.1-7, где любой из указанных антигенов A1 и A2 выбран из группы, состоящей из

HLA-A2; HLA-Cw6; EpCAM; CD20; CD33; CD38; CD45; Her2; EGFR; CD138; CEA; CD19; PSMA; E-кадхерин; Ca-125; Her-2/neu; белка опухоли апокринных потовых желез; BSA-225; CA 19-9; CD117; CD30; эпителиального антигена BER-EP4, эпителиального мембранного антигена и связанного с эпителием антигена MOC-31; рецептора эпидермального фактора роста HER1; рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) альфа; меланомаассоциированного маркера/Mart 1/Melan-A; CD133; TAG 72; аквапорин-2 и клонотипического антитела на поверхности В-клеток.

9. Набор полипептидов по одному из пп.1-8, где:

(I) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой EpCAM, а другой представляет собой EGFR, HER2/neu, CD10, VEGF-R или MDR;

(II) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой MCSP, а другой представляет собой меланоферрин или EpCAM;

(III) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой CA125, а другой представляет собой CD227;

(IV) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой CD56, а другой представляет собой CD140b или ганглиозид GD3;

(V) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой EGFR, а другой представляет собой HER2;

(VI) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой PSMA, а другой представляет собой HER2;

(VII) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой сиалил-Льюис, а другой представляет собой EGFR;

(VIII) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой CD44, а другой представляет собой ESA, CD24, CD133, MDR или CD117;

(IX) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой CD34, а другой представляет собой CD19, CD79a, CD2, CD7, HLA-DR, CD13, CD117, CD33 или CD15;

(X) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой CD33, а другой представляет собой CD19, CD79a, CD2, CD7, HLA-DR, CD13, CD117 или CD15;

(XI) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой MUC1, а другой представляет собой CD10, CEA или CD57;

(XII) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой CD38, а другой представляет собой CD138;

(XIII) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой CD24, а другой представляет собой CD29 или CD49f;

(XIV) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой угольную ангидразу IX, а другой представляет собой аквапорин-2;

(XV) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой HLA-A2, а другой представляет собой EpCAM;

(XVI) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой HLA-A2, а другой представляет собой CD45;

(XVII) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой HLA-A2, а другой представляет собой EGFR;

(XVIII) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой HLA-A2, а другой представляет собой Her2;

(XIX) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой HLA-A2, а другой представляет собой CEA;

(XX) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой EpCAM, а другой представляет собой CEA;

(XXI) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой CD45, а другой представляет собой CD138;

(XXII) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой EGFR, а другой представляет собой CEA;

(XXIII) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой Her2, а другой представляет собой CEA; или

(XXIV) один из указанных антигенов A1 и A2 представляет собой CD19, а другой представляет собой клонотипическое антитело на поверхности В-клетки.

10. Набор полипептидов по одному из пп.1-9, где указанный нацеливающий участок T1 и/или T2 содержит иммуноглобулиновый модуль; или где указанный нацеливающий участок T1 и/или T2 содержит аптамер или встречающийся в естественных условиях лиганд указанного антигена A1 или антигена A2 соответственно.

11. Набор полипептидов по п.10, где указанный нацеливающий участок T1 содержит иммуноглобулиновый модуль I1, который содержит V_L-домен, сцепленный с V_H-доменом, или содержит вариабельный домен V_HH антитела лам, антитела верблюдов или антитела акул; и/или указанный нацеливающий участок T2 содержит иммуноглобулиновый модуль I2, который содержит V_L-домен, сцепленный с V_H-доменом, или содержит вариабельный домен V_HH антитела лам, антитела верблюдов или антитела акул.

12. Набор полипептидов по п.11, где указанный иммуноглобулиновый модуль I1 содержит scFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент), Fab или F(ab')₂ антитела или полное антитело; и/или указанный иммуноглобулиновый модуль I2 содержит scFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент), Fab или F(ab')₂ антитела или полное антитело.

13. Набор полипептидов по одному из пп.1-3 и 6-12, где один из указанных нацеливающих участков T1 и T2 содержит аллерген или субстрат, который связывается с клонотипическим антителом на поверхности В-клетки.

14. Набор полипептидов по одному из пп.1-13, где указанный функциональный домен F представляет собой или содержит иммуноглобулиновый модуль.

15. Набор полипептидов по п.14, где указанный функциональный домен F представляет собой Fv (вариабельный фрагмент) или scFv (одноцепочечный вариабельный фрагмент) антитела.

16. Набор полипептидов по одному из пп.1-15, где указанный фрагмент F1 содержит V_L-домен антитела к CD3, к His или к DIG и указанный фрагмент F2 содержит V_H-домен этого же антитела, или где указанный фрагмент F1 содержит V_H-домен антитела к CD3, к His или к DIG, или указанный фрагмент F2 содержит V_H-домен этого же антитела.

17. Набор полипептидов по одному из пп.14-16, где указанный иммуноглобулиновый модуль содержит V-домен, выбранный из группы, состоящей из:

(I) V-домена антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 2, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 1;

(II) V-домена антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 4, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 3;

(III) V-домена антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 6, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 5;

(IV) V-домена антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 8, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 7;

(V) V-домена антитела к CD3, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 10, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 9; и

(VI) V-домена антитела к His, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 12, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 11;

(VII) V-домена антитела к DIG, который содержит V_L-домен, содержащий SEQ ID NO: 14, и/или V_H-домен, содержащий SEQ ID NO: 30.

18. Набор полипептидов по одному из пп.1-17, где любой из полипептидов P1 и P2 представляет собой или содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 114-129 и 197.

19. Применение набора полипептидов по одному из пп.1-18 для лечения пациента с опухолью.

20. Применение по п.19, где опухоль представляет собой рак.

21. Применение набора полипептидов по одному из пп.1-18 для диагностики опухоли у пациента.

22. Применение по п.21, где опухоль представляет собой рак.

23. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует один из полипептидов из набора полипептидов по одному из пп.1-18.

24. Молекула нуклеиновой кислоты по п.23, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную в любой одной из SEQ ID NO: 135-150 и 196.

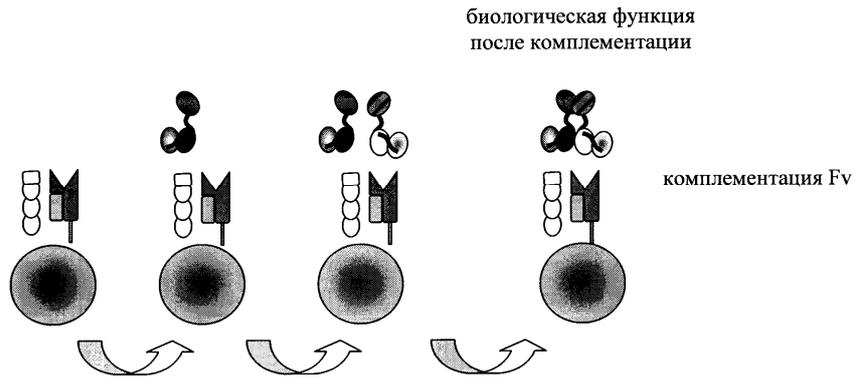
25. Набор молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют набор полипептидов по одному из пп.1-18.

26. Набор молекул нуклеиновых кислот по п.25, содержащий нуклеотидную последовательность, представленную в любой одной из SEQ ID NO: 135-150 и 196.

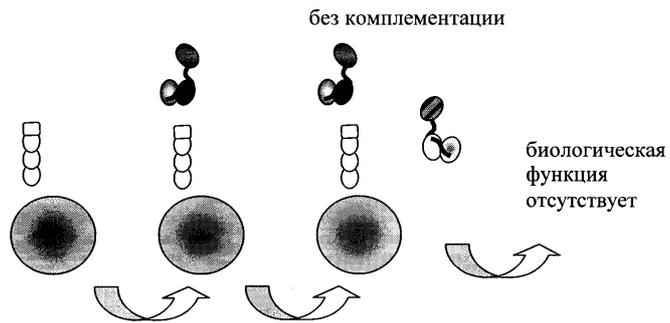
27. Фармацевтическая композиция для идентификации и/или элиминации клеток, которые имеют конкретную комбинацию двух специфических антигенов на своей клеточной поверхности, содержащая либо набор полипептидов по одному из пп.1-18, либо молекулу нуклеиновой кислоты по пп.23, 24 или набор молекул нуклеиновых кислот по пп.25, 26, где указанная фармацевтическая композиция содержит также фармацевтически приемлемый носитель.



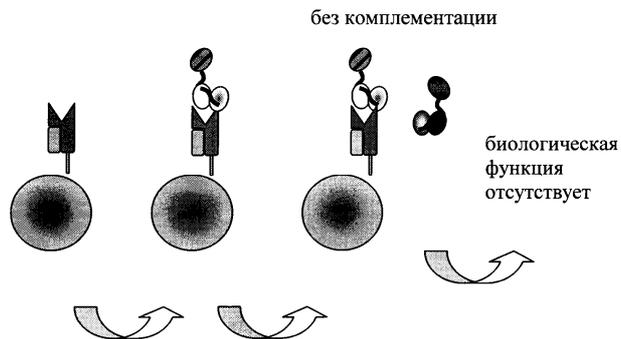
Фиг. 1А



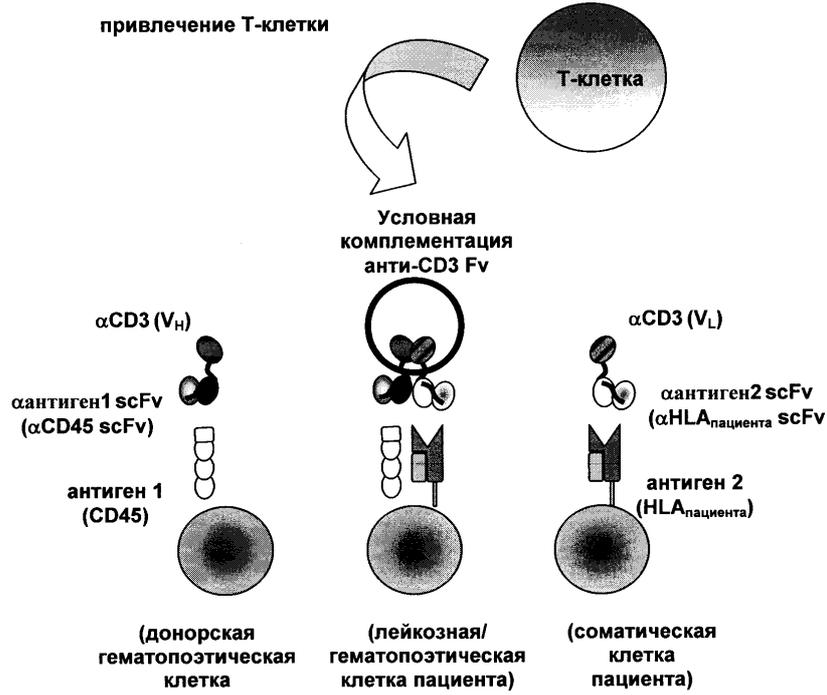
Фиг. 1Б



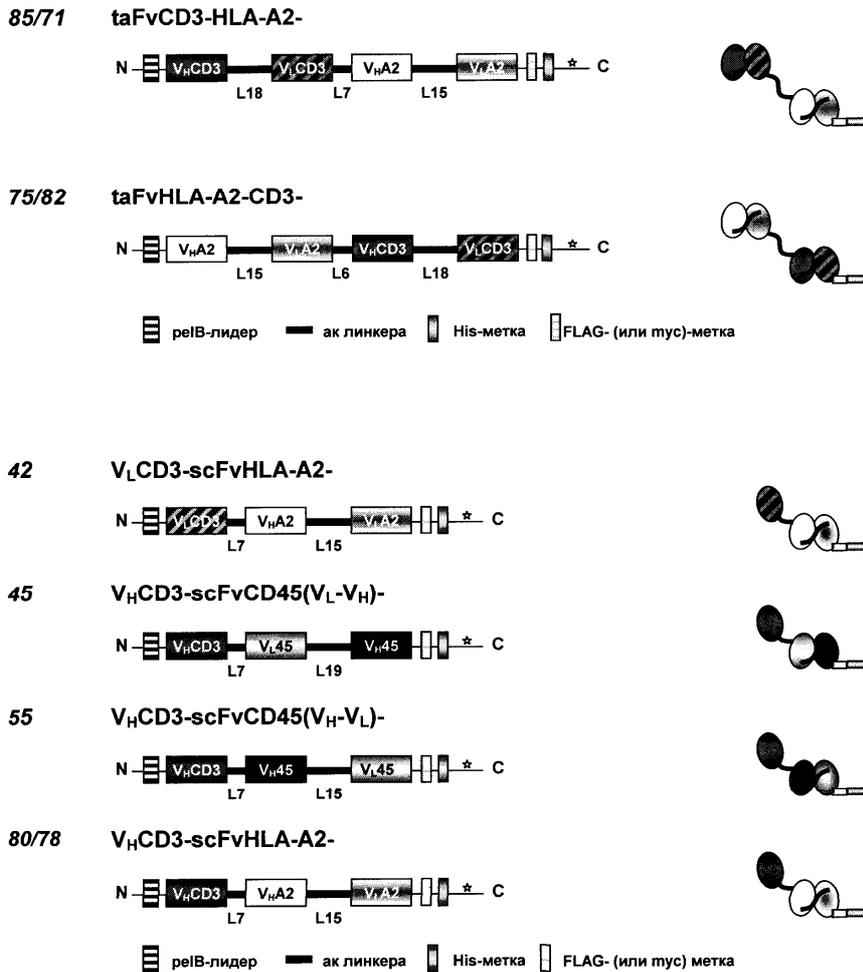
Фиг. 1В



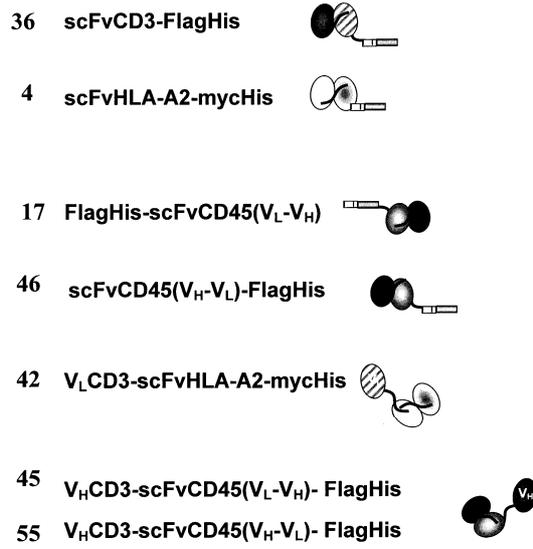
Фиг. 1Г



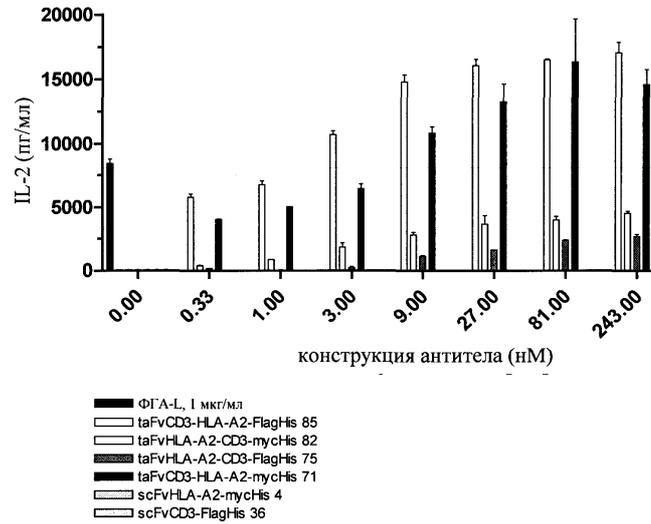
Фиг. 2



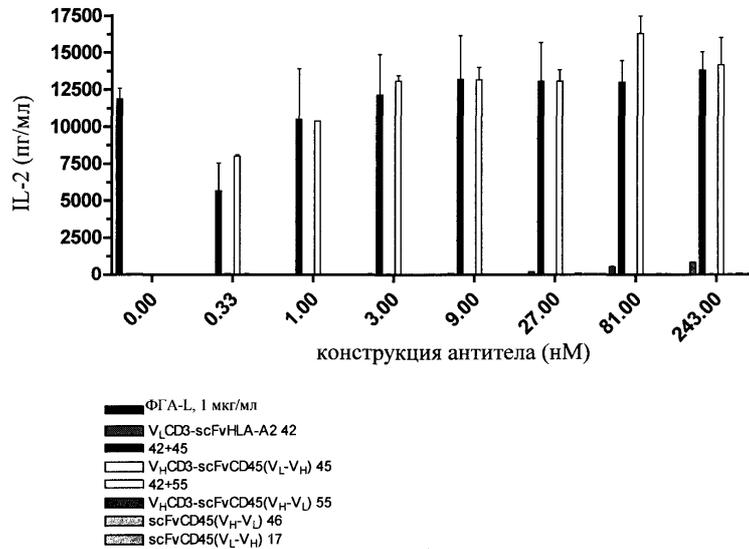
Фиг. 3А



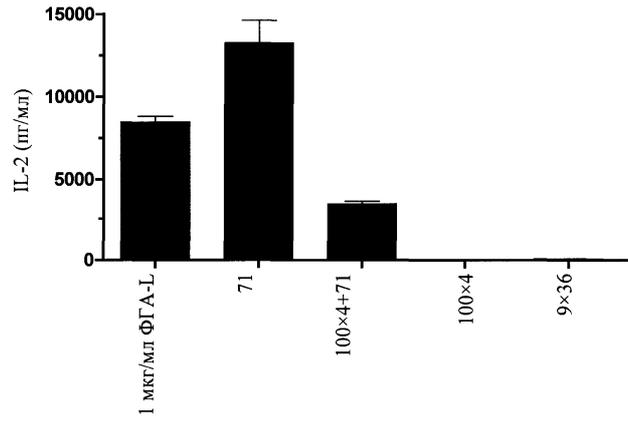
Фиг. 3Б



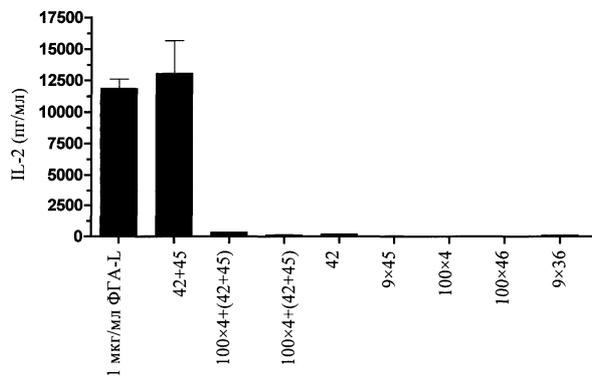
Фиг. 4



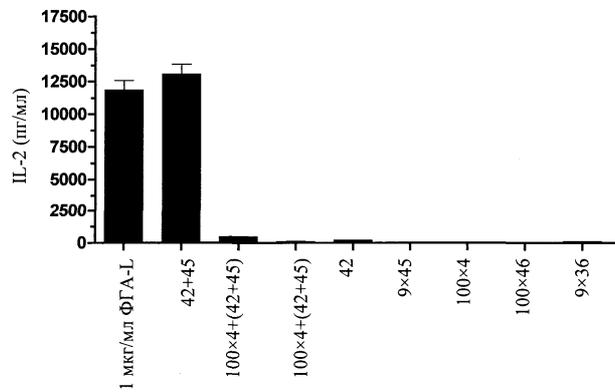
Фиг. 5



Фиг. 6

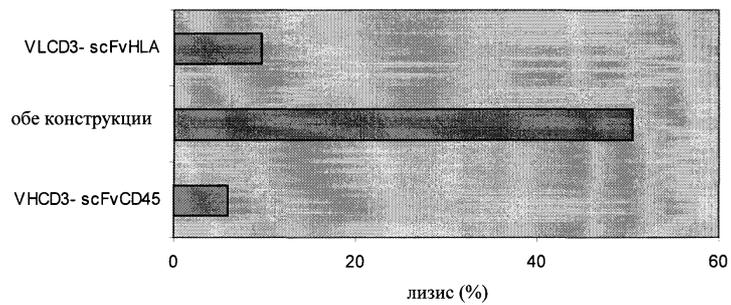


Фиг. 7

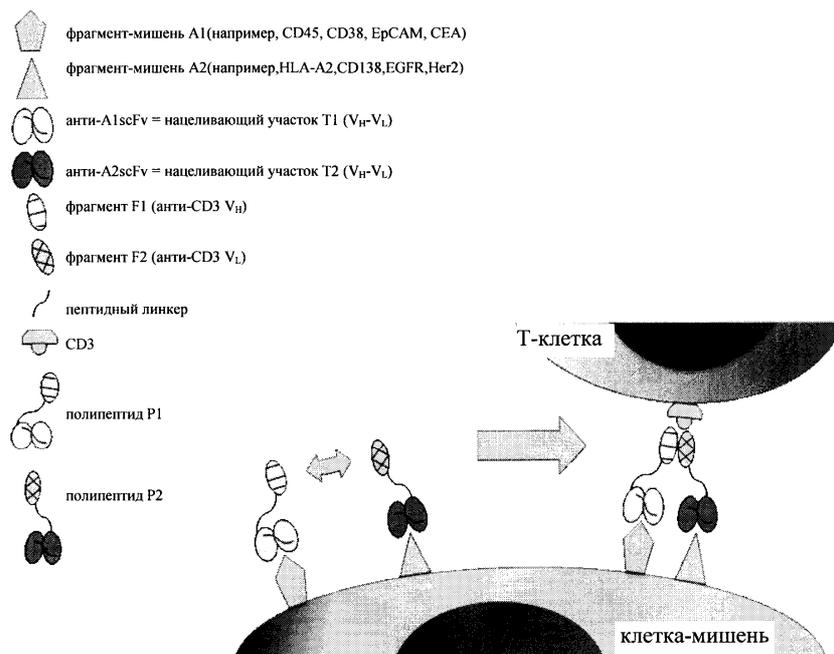


Фиг. 8

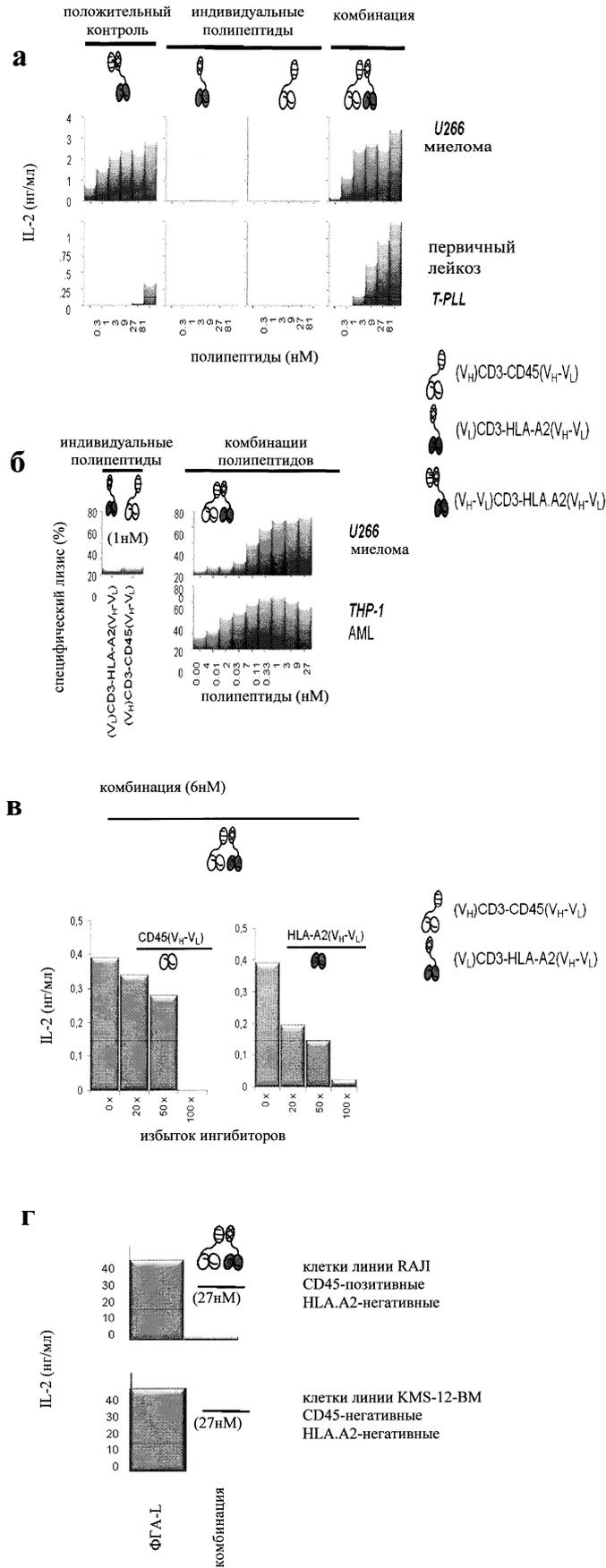
Лизис опухолевых клеток Т-лимфоцитами



Фиг. 9



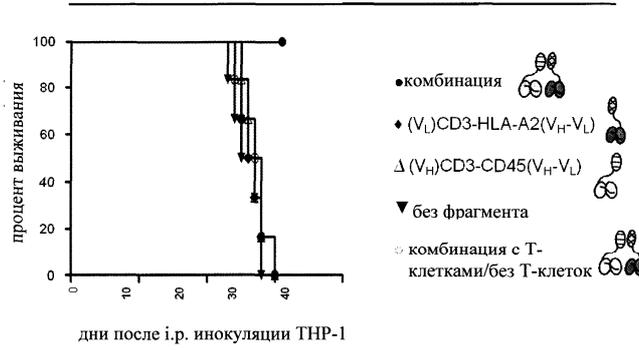
Фиг. 10



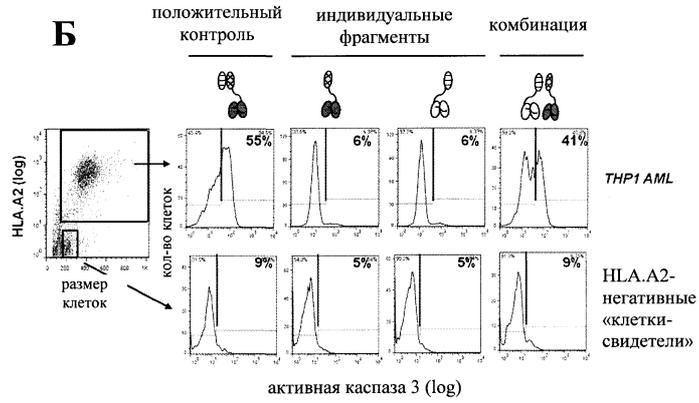
Фиг. 11

A

несущие HLA-A2 трансгенные NodScid-IL2Rko-мыши

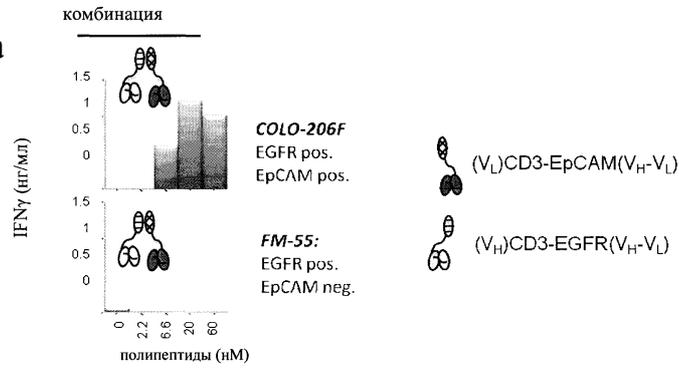


Б

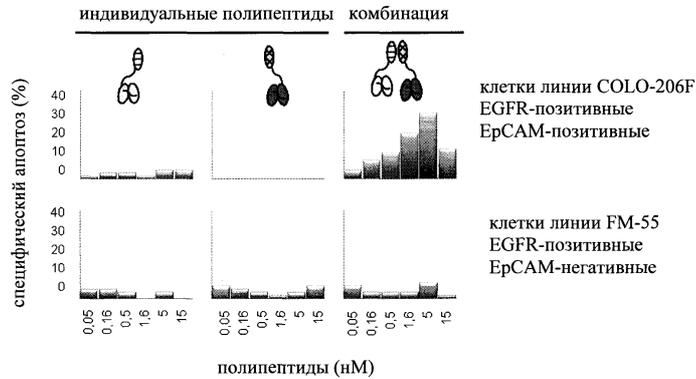


Фиг. 12

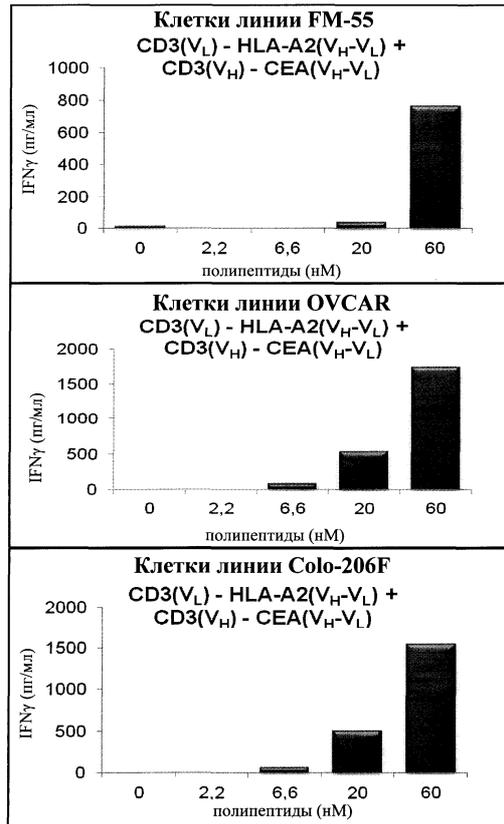
а



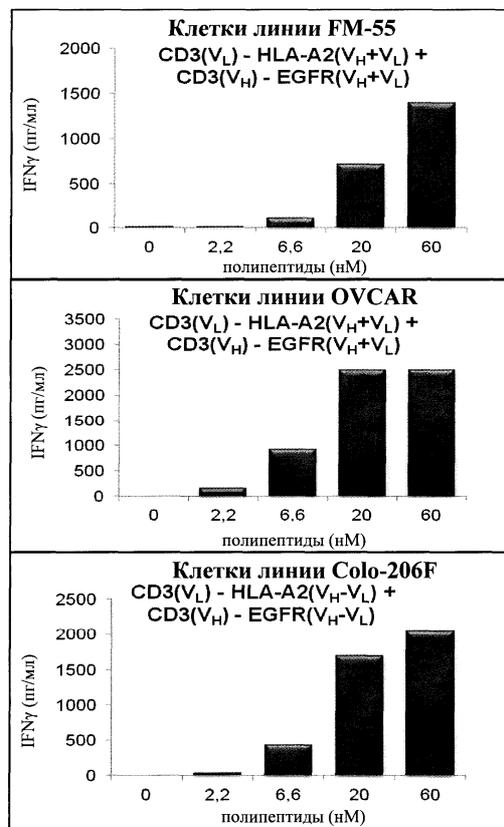
б



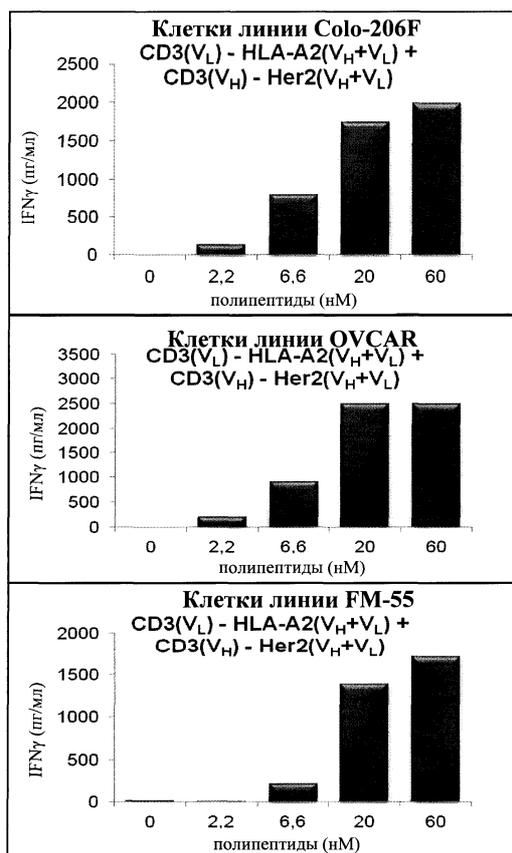
Фиг. 13



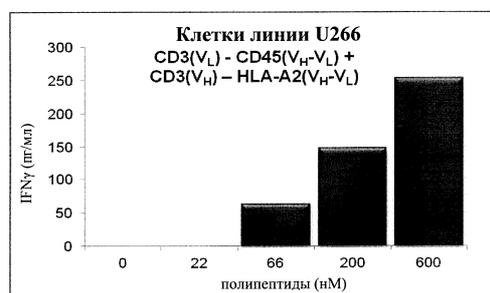
Фиг. 14



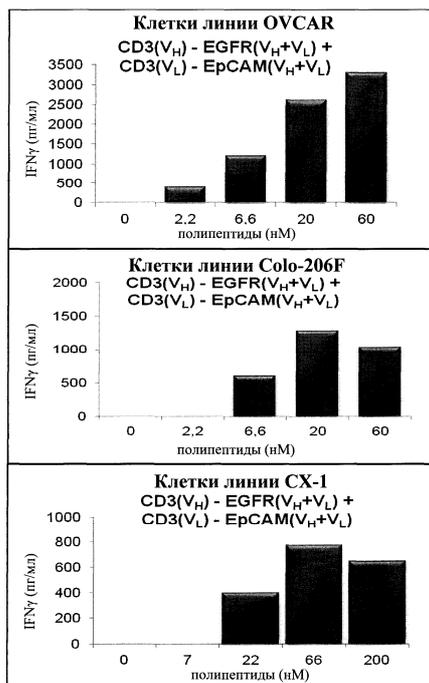
Фиг. 15



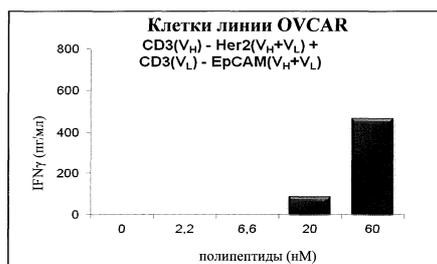
Фиг. 16



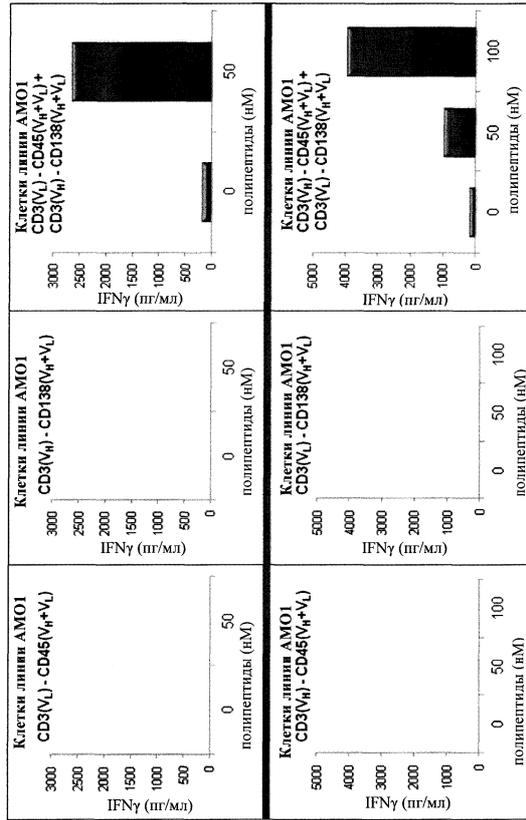
Фиг. 17



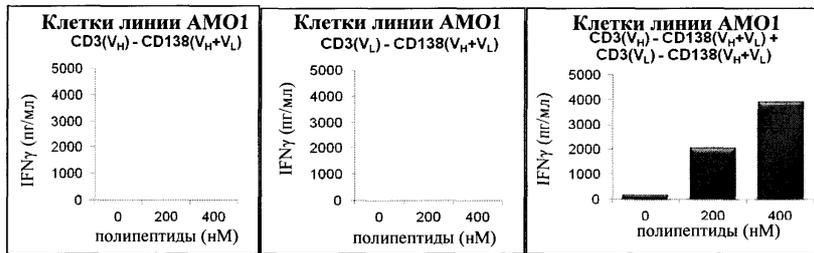
Фиг. 18



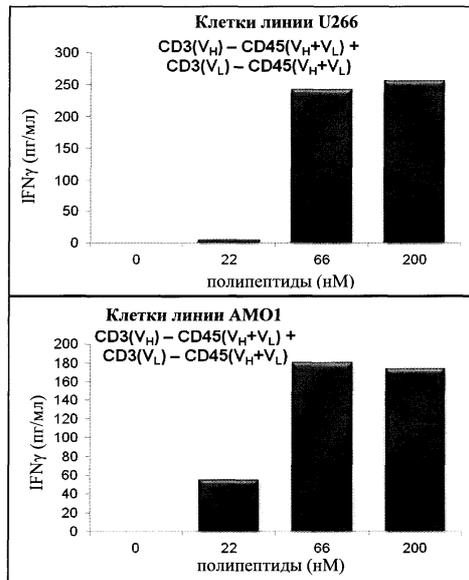
Фиг. 19



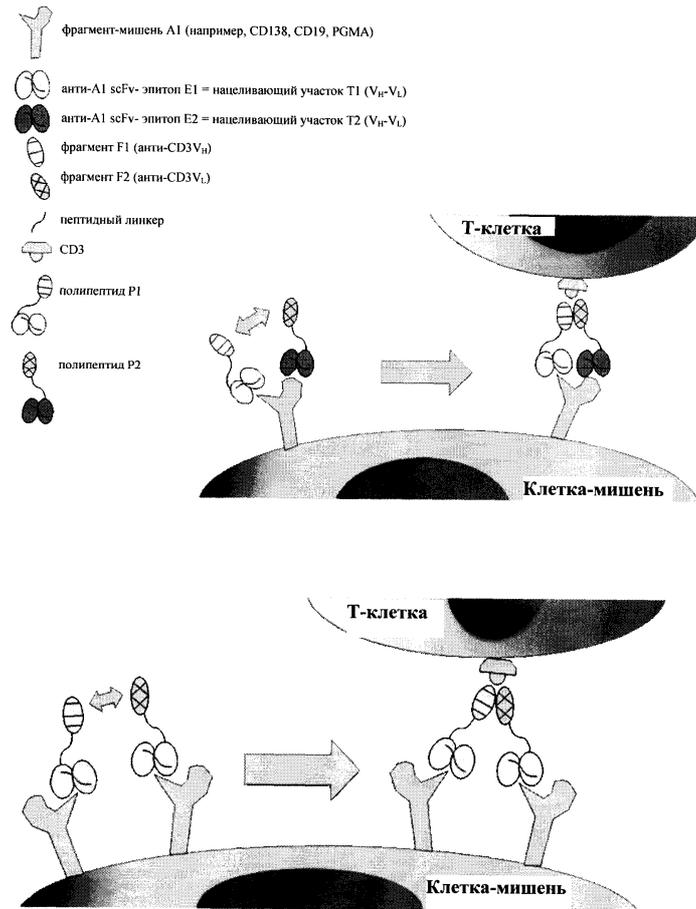
Фиг. 20



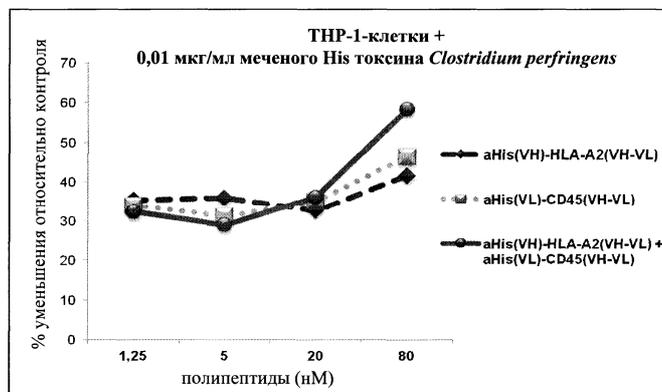
Фиг. 21



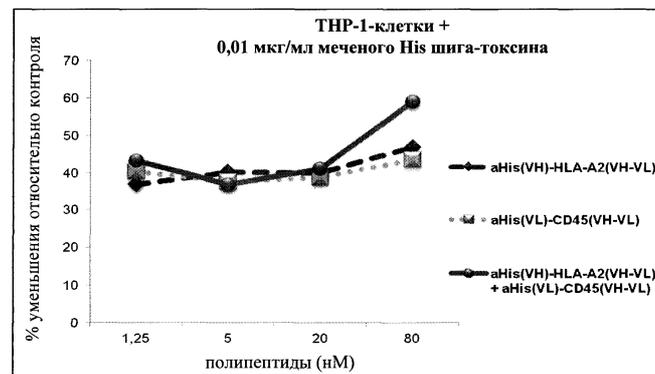
Фиг. 22



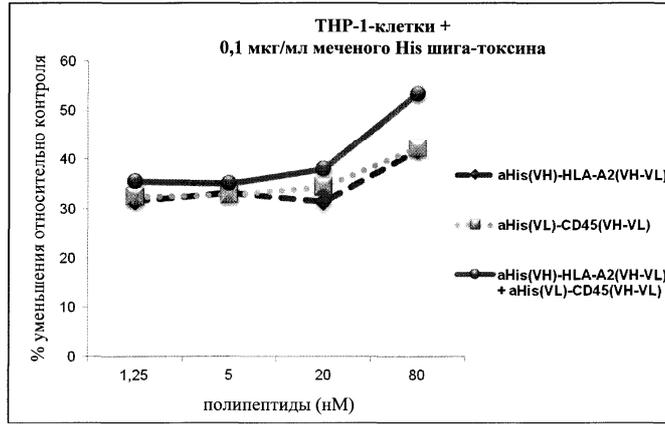
Фиг. 23



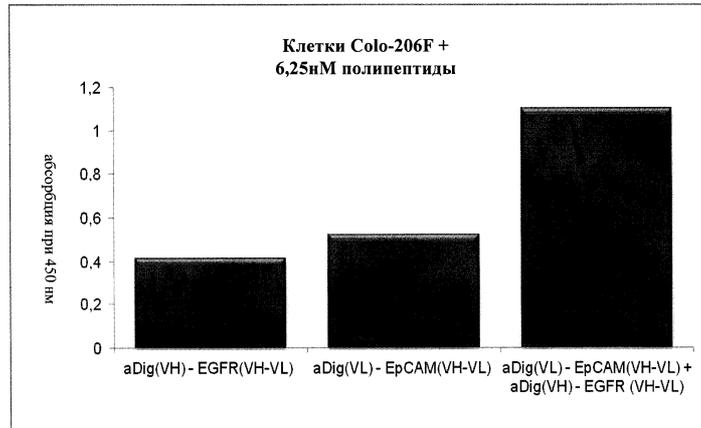
Фиг. 24



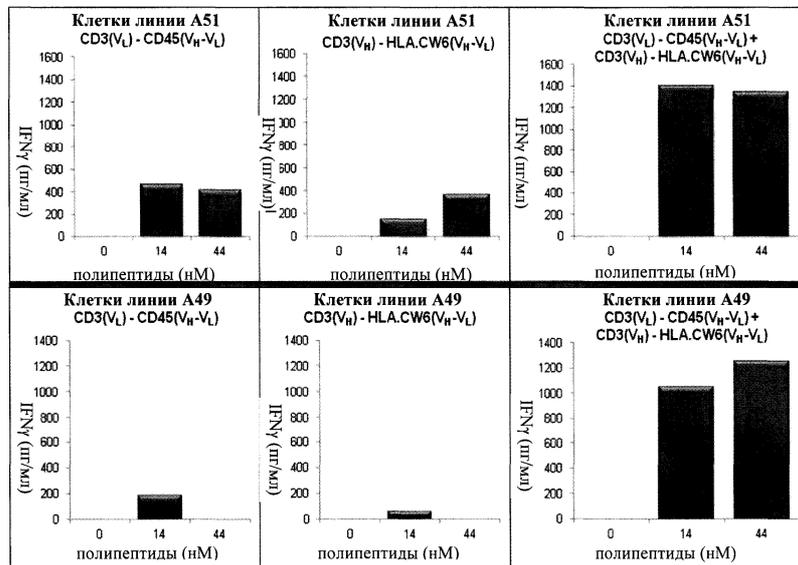
Фиг. 25



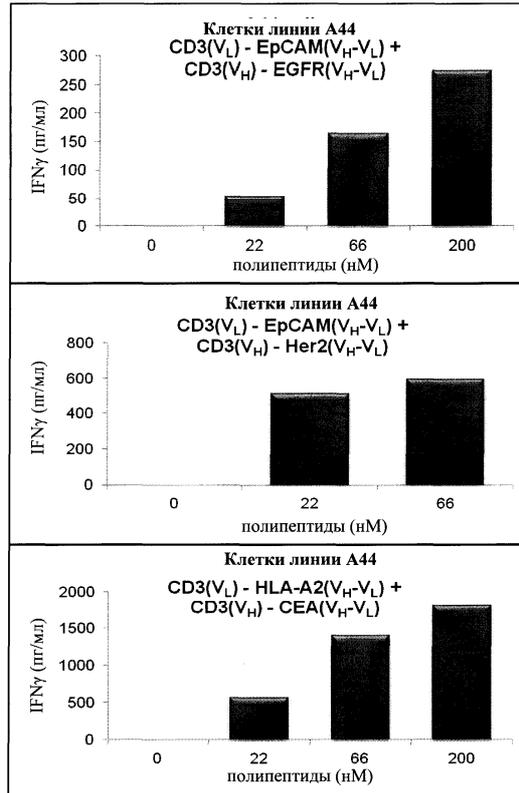
Фиг. 26



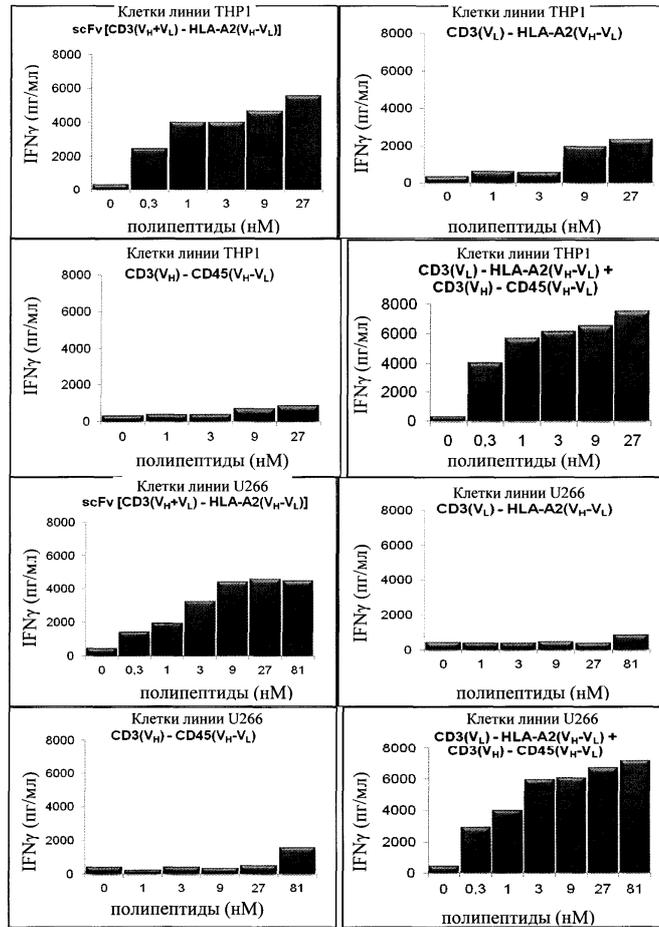
Фиг. 27



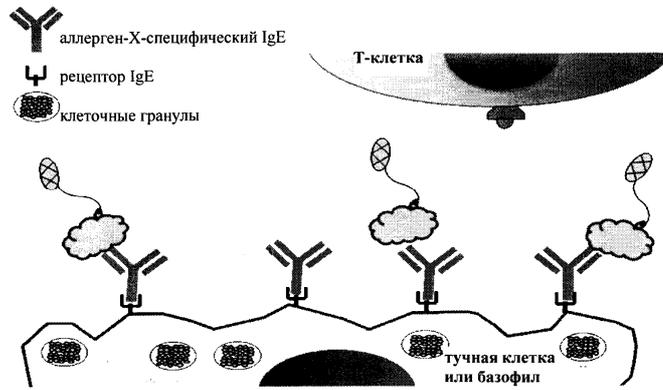
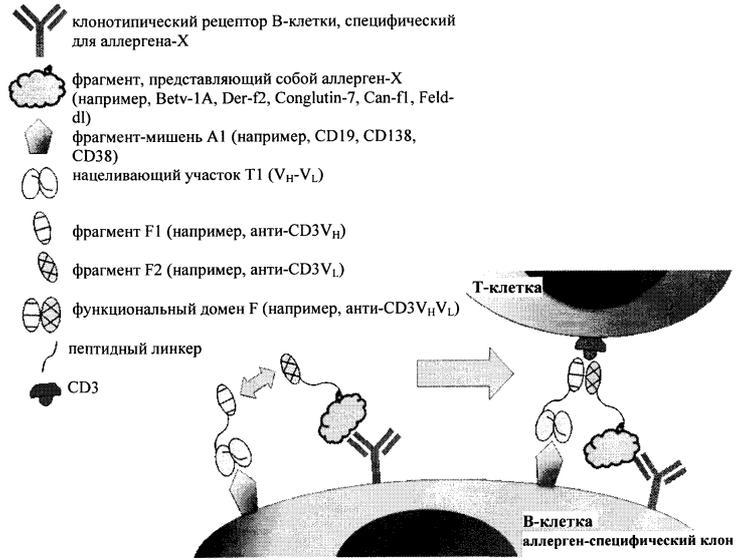
Фиг. 28



Фиг. 29



Фиг. 30



Фиг. 31