

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034081**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.25

(21) Номер заявки
201790280

(22) Дата подачи заявки
2015.07.29

(51) Int. Cl. **A61K 48/00** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(54) ROR1-(NTRK1)-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ РАКА

(31) **PA201470465**

(32) **2014.07.29**

(33) **DK**

(43) **2017.07.31**

(86) **PCT/EP2015/067444**

(87) **WO 2016/016344 2016.02.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СЕЛЛЕКТИС (FR)

(72) Изобретатель:
Шиффер-Манниуй Сесиль (FR)

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

(56) **US-A1-2013287748
WO-A2-2012097313
WO-A1-2014031174
WO-A1-2014039523**

**LAURENT POIROT ET AL.: "521. Multiplex
Genome Editing of TCR alpha/CD52 Genes as
a Platform for "Off the Shelf" Adoptive T-Cell
Immunotherapies.", 17TH ANNUAL MEETING
OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-GENE-AND-
CELL-THERAPY (ASGCT); WASHINGTON, DC,**

**USA, vol. 22 (Suppl. 1), 1 May 2014 (2014-05-01),
pages S201-S202, XP055211261, the whole document
Laurent Poirot ET AL.: "T-Cell
Engineering For "off-The-shelf" Adoptive
Immunotherapy", Blood Journal: 122, 15
November 2013 (2013-11-15), XP055129953,
Retrieved from the Internet: URL: [http://
bloodjournal.hematologylibrary.org/
content/122/21/1661?sso-checked=1](http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/122/21/1661?sso-checked=1) [retrieved on
2014-07-18] the whole document**

**CECILE SCHIFFER MANNIOUI ET AL.:
"Treatment of B cells malignancies with anti-CD19
CAR+, TCR-, CD52- allogeneic T cells", JOURNAL
FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, BIOMED
CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 1, no.
Suppl 1, 7 November 2013 (2013-11-07), page
P34, XP021167243, ISSN: 2051-1426, DOI:
10.1186/2051-1426-1-S1-P34 the whole document
abstract**

**M. HUDECEK ET AL.: "Receptor
Affinity and Extracellular Domain Modifications
Affect Tumor Recognition by ROR1-
Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells",
CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 19,
no. 12, 25 April 2013 (2013-04-25), pages
3153-3164, XP055177780, ISSN: 1078-0432,
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0330 the whole
document**

WO-A2-2012012695

(57) В патенте описаны химерные антигенные рецепторы (CAR), представляющие собой рекомбинантные химерные белки, которые обладают способностью переориентировать специфичность и реактивность иммунных клеток на выбранные присутствующие на мембране антигены, и, более конкретно, в которых внеклеточный лигандсвязывающий домен представляет собой scFv, происходящий из моноклонального антитела к ROR1, придающий специфический иммунитет в отношении ROR1-позитивных клеток. Сконструированные иммунные клетки, наделенные такими CAR, наиболее пригодны для лечения лимфом и лейкозов, а также солидных опухолей, таких как опухоли молочной железы, ободочной кишки, легкого и почки.

B1**034081****034081****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к химерным антигенным рецепторам (CAR), которые представляют собой рекомбинантные химерные белки, обладающие способностью переориентировать специфичность и реактивность иммунных клеток на ROR1, который представляет собой расположенный на клеточной поверхности гликопротеин, присутствующий на большинстве миелоидных клеток, и который применяют для диагностирования у пациентов хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) или солидных опухолей, таких как опухоли молочной железы, ободочной кишки, легкого и почки. CAR, предлагаемые в изобретении, наиболее пригодны для лечения злокачественных клеток, несущих антиген ROR1, когда они экспрессируются в Т-клетках или NK-клетках. Полученные сконструированные иммунные клетки отличаются высоким уровнем специфичности в отношении злокачественных клеток, обеспечивая безопасность и эффективность иммунотерапии.

Предпосылки создания изобретения

Адаптивная иммунотерапия, в которой применяют перенос аутологичных антигенспецифических Т-клеток, созданных *ex vivo*, представляет собой перспективную стратегию для лечения вирусных инфекций и рака. Т-клетки, применяемые для адаптивной иммунотерапии, можно создавать либо путем размножения антигенспецифических Т-клеток, либо посредством переориентации Т-клеток с помощью методов генетической инженерии (Park, Rosenberg и др., 2011). Перенос Т-клеток, специфических в отношении вирусных антигенов, является хорошо зарекомендовавшей себя процедурой, которую применяют для лечения ассоциированных с трансплантацией вирусных инфекций и редких связанных с вирусами злокачественных заболеваний. Продемонстрировано также, что выделение и перенос опухолевых специфических Т-клеток приводит к успеху при лечении меланомы.

В Т-клетках были успешно созданы новые специфичности посредством генетического переноса трансгенных Т-клеточных рецепторов или химерных антигенных рецепторов (CAR) (Jena, Dotti и др., 2010). На фиг. 1 представлены схематические изображения 3 поколений CAR. CAR представляют собой синтетические рецепторы, состоящие из "нацеливающего" фрагмента, ассоциированного с одним или несколькими сигнальными доменами в одной слитой молекуле. В целом, связывающий фрагмент CAR состоит из антигенсвязывающего домена одноцепочечного антитела (scFv), который содержит легкие и переменные фрагменты моноклонального антитела, соединенные гибким линкером. Успешно применяли также связывающие фрагменты на основе доменов рецептора или лиганда. Сигнальные домены для первого поколения CAR получали из цитоплазматической области дзета-цепи CD3 или гамма-цепи Fc-рецептора. Было продемонстрировано, что первое поколение CAR позволяло успешно переориентировать Т-клеточную цитотоксичность. Однако для них не удалось обеспечить пролонгированное размножение и противоопухолевую активность *in vivo*. Для получения CAR второго и третьего поколений добавляли сигнальные домены из костимуляторных молекул, а также трансмембранные и шарнирные домены, которые в некоторых успешных испытаниях на людях продемонстрировали терапевтическое действие, когда Т-клетки удавалось переориентировать на злокачественные клетки, экспрессирующие CD19 (June и др., 2011). Однако конкретная комбинация сигнальных доменов, трансмембранных и костимуляторных доменов, которую применяли в случае scFv, мишенью которого является CD19, оказалась в большей степени антигенспецифической и непригодной для других антигенных маркеров.

Хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) представляет собой один из наиболее часто диагностируемых видов лейкоза, с которым борются практикующие гематологи. В течение многих лет пациентов с CLL рассматривали как почти одинаковых, характеризующихся продолжительной естественной историей болезни, для которой терапии были малоэффективны и редко приводили к полным ответам. В последние годы был получен ряд важных данных касательно биологического значения статуса мутаций V_H и ассоциированной сверхэкспрессии ZAP-70, нарушения функции p53 и хромосомных aberrаций, которые дали возможность идентифицировать пациентов с высоким риском раннего прогрессирования заболевания и низкой выживаемостью. Одновременно с этими исследованиями был разработан ряд терапевтических средств, включая нуклеозидные аналоги, моноклональные антитела ритуксимаб и алектузумаб. В клинических опытах было продемонстрировано, что комбинация указанных терапий приводила к высоким полным и общим ответам, когда ее применяли в качестве начальной терапии для симптоматического CLL. Таким образом, сложность стратификации начального риска CLL и лечения значительно возросла. Кроме того, если указанные начальные терапии "не работали", то подход к лечению страдающего CLL пациента с устойчивым к флударабину заболеванием мог оказаться весьма проблематичным (Byrd J.C. и др., 2014).

Одним из антигенов-кандидатов для иммунотерапии хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) является тирозинпротеинкиназный трансмембранный рецептор ROR1 (который называют также NTRKR1; UniProtKB/TrEMBL) регистрационный номер: Q01973). ROR1 (подобный тирозинкиназному рецептору орфановый рецептор 1) представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 120 кДа, содержащий внеклеточный иммуноглобулин - (Ig)-подобный домен, Kringle-домен (домен типа "двойная петля") и Frizzled-подобный богатый цистеином домен (фиг. 2). Белок, кодируемый этим геном, представляет собой рецепторную тирозинкиназу, которая модулирует рост нейритов в центральной нервной системе. Он представляет собой мембранный белок типа I и относится к подсемейству ROR рецепторов

клеточной поверхности (Reddy и др., 1997). Однако экспрессия белка ROR1 в организме страдающих CLL пациентов со здоровыми лейкоцитами и его роль в патофизиологии CLL заслуживает дополнительного изучения. ROR1 может являться пригодной мишенью для иммунотерапии рака (Daneshmanesh и др., 2008). Действительно, ROR1 экспрессируется на различных В-клеточных злокачественных образованиях, а также на субпопуляциях некоторых солидных опухолей, включая опухоли молочной железы, ободочной кишки, легкого и почки. Считается, что ROR1 функционирует при передаче онкогенных сигналов, стимулирующих выживание опухолевой клетки в эпителиальных опухолях. Важно отметить, что ROR1 не экспрессируется в жизненно важных органах за исключением жировой и панкреатической ткани, что снижает возможные токсичные действия, обусловленные уничтожением здоровых клеток (Hudecek и др., 2013). ROR1 экспрессируется в процессе эмбриогенеза, но отсутствует на здоровых зрелых тканях за исключением субпопуляции незрелых В-клеток-предшественников и адипоцитов, на которых имеет место низкий уровень экспрессии (Hudecek и др., 2010; Matsuda и др., 2001). Сначала с помощью определения профиля транскрипции было установлено, что ROR1 экспрессируется при В-клеточном хроническом лимфоцитарном лейкозе (B-CLL) (Klein и др., 2001; Rosenwald и др., 2001), а затем он был выявлен на поверхности многих типов раковых образований, включая лимфому из клеток мантии (MCL), острый лимфобластный лейкоз (ALL) с хромосомной транслокацией t(1;19), и субпопуляции раков легкого, молочной железы, ободочной кишки, поджелудочной железы, почки и яичника (Baskar и др., 2008; Biscossa и др., 2012; Daneshmanesh и др., 2008; Dave и др., 2012; Fukuda и др., 2008; Yamaguchi и др., 2012; Zhang и др., 2012a, 2012b). Как при аденокарциноме, так и при ALL с t(1;19), ROR1 участвует в передаче онкогенных сигналов, и "выключение" ROR1 с помощью siPHK выявило решающую роль этой молекулы в поддержании выживаемости опухолевых клеток (Biscossa и др., 2012; Choudhury и др., 2010; Gentile и др., 2011; Yamaguchi и др., 2012). Таким образом, опухоли не могут легко переносить утрату ROR1, что делает его перспективным кандидатом для CAR-направляемой Т-клеточной терапии, которая может найти широкое распространение. Таким образом, авторы настоящего изобретения рассматривают ROR1 в качестве ценного антигена-мишени для лечения CLL, а также солидных опухолей, таких как опухоли молочной железы, ободочной кишки, легкого, яичника и почки, с применением экспрессирующих CAR Т-клеток.

Ранее в лабораториях д-ра Stanley Riddell и д-ра Laurence Cooper были созданы и валидированы анти-ROR1 scCAR, содержащие scFv 4A5 и 2A2 соответственно (Cooper и др., 2010; Hudecek и др., 2013). В частности, Hudecek с соавторами описали анти-ROR1 scCAR, которые содержат шарнир IgG4 различной длины и трансмембранный домен CD28.

В настоящее время все еще существует необходимость в улучшении функциональности CAR путем создания архитектуры CAR и использования пригодных компонентов, поскольку эти параметры играют важную роль и необходима их тонкая настройка.

Таким образом, в качестве альтернативы известным из существующего уровня техники стратегиям в настоящем изобретении предложены обладающие значительным клиническим преимуществом ROR1-специфические CAR, которые могут экспрессироваться в иммунных клетках для нацеливания на ROR1 злокачественных клеток. При создании изобретения было установлено, что путем объединения архитектуры CAR с выбором пригодных компонентов можно получать ROR1-специфические одноцепочечные CAR, обладающие высокой цитотоксичностью в отношении раковых клеток-мишеней.

Краткое изложение сущности изобретения

При создании изобретения были разработаны ROR1-специфические CAR, имеющие различную структуру и содержащие различные scFv, полученные из различных специфических в отношении ROR1 антител.

ROR1- (NTRKR1)-специфический химерный антигенный рецептор (CAR), предлагаемый в настоящем изобретении, может иметь одну из полипептидных структур, выбранную из структур V1-V6, которые проиллюстрированы на фиг. 4, указанная структура содержит внеклеточный лигандсвязывающий домен, содержащий VH и VL из моноклонального антитела к ROR1, шарнир, трансмембранный домен и цитоплазматический домен, включая сигнальный домен CD3 дзета и костимуляторный домен из 4-1BB.

Более конкретно, ROR1- (NTRKR1)-специфический химерный антигенный рецептор (CAR), предлагаемый в настоящем изобретении, может иметь одну из полипептидных структур, выбранную из структур V3, V5 и V1, которые проиллюстрированы на фиг. 4, указанная структура содержит внеклеточный лигандсвязывающий домен, содержащий VH и VL из моноклонального антитела к ROR1, шарнир, трансмембранный домен CD8 α , цитоплазматический домен, включая сигнальный домен CD3 дзета и костимуляторный домен из 4-1BB. Было установлено, что такие ROR1-(NTRKR1)-специфические антигенные рецепторы должны обладать неожиданными более высокими с точки зрения цитотоксичности действиями.

В одном из вариантов осуществления изобретения ROR1-специфический CAR имеет структуру V1, содержащую шарнир Fc γ RIII α и трансмембранный домен CD8 α .

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, ROR1-специфический CAR имеет структуру V3 и содержит шарнир CD8 α и трансмембранный домен CD8 α .

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, а ROR1-специфический CAR имеет структуру V5, содержащую шарнир IgG1 и трансмембранный домен CD8 α .

В частности, указанные антигенсвязывающие домены (scFv), происходящие из антител к ROR1 H10 и D10, обладают выраженными противораковыми свойствами.

Кроме того, на основе мышиных антител к ROR1 H10 и D10 были созданы гуманизированные scFv.

Предпочтительные полипептиды CAR, предлагаемые в изобретении, содержат аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 79-138. После неспецифической активации *in vitro* (например, с использованием сенсibilизированных антителом к CD3/CD28 гранул и рекомбинантного IL2) Т-клетки из доноров трансформировали посредством вирусной трансдукции полинуклеотидами, экспрессирующими указанные CAR. В некоторых случаях Т-клетки подвергали дополнительным манипуляциям для создания неаллореактивных Т-клеток, более конкретно, посредством разрушения компонента TCR ($\alpha\beta$ - Т-клеточные рецепторы) для предупреждения реакции "трансплантат против хозяина". Установлено, что CAR, предлагаемые в настоящем изобретении, оказались особенно эффективными в контексте аллогенных Т-клеток.

Сконструированные таким образом Т-клетки обладали различными уровнями реактивности *in vitro* в отношении ROR1 -позитивных клеток, это свидетельствует о том, что CAR, предлагаемые в настоящем изобретении, участвовали в антигензависимой активации, а также пролиферации Т-клеток, что делает их пригодными для применения иммунотерапии.

Полипептидные и полинуклеотидные последовательности, кодирующие CAR, предлагаемые в настоящем изобретении, подробно охарактеризованы в настоящем описании.

Сконструированные иммунные клетки, предлагаемые в настоящем изобретении, наиболее пригодны для терапевтических применений, таких как лечение хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL), лимфомы из клеток мантии (MCL), острого лимфобластного лейкоза (ALL) с хромосомной транслокацией t(1;19). Их можно применять также для лечения солидных опухолей, таких как опухоли молочной железы, ободочной кишки, легкого и почки.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг. 1 - схематическое изображение одноцепочечных химерных антигенных рецепторов (scCAR), которые наиболее часто создают путем соединения вариабельных областей тяжелой и легкой цепей моноклонального антитела (фиг. 1А), которые связываются с конкретным антигеном, с внутриклеточной частью Т-клеточной сигнальной молекулы, такой как компоненты комплекса: ассоциированный с TCR CD3 ((ζ -цепь) (фиг. 1Б). Первое поколение scCAR содержало только Т-клеточный сигнальный домен, который передает сигнал активации (фиг. 1В, слева). Второе поколение scCAR включало дополнительно один эндодомен костимуляторной молекулы, такой как эндодомен CD28 или 41BB (фиг. 1В, в середине), который повышал Т-клеточную персистентность и противоопухолевую функцию *in vivo*. Третье поколение scCAR включало по меньшей мере два эндодомена костимуляторной молекулы, такие как эндодомены CD28 и 4-1BB (фиг. 1В, справа);

на фиг. 2 - структура белка ROR1, который состоит из внеклеточной части, трансмембранной части и внутриклеточных доменов; внеклеточные и внутриклеточные домены, состоящие из нескольких элементов, описаны ранее;

на фиг. 3А, 3Б, 3В и 3Г - (I) сравнительный анализ первичной структуры последовательностей из мышиных последовательностей VH и VL антител D10 и H10 и последовательностей человеческой зародышевой линии, кодируемых генами V и J, которые кодируют вариабельную область иммуноглобулинов, указанные последовательности обладают высокой гомологией с мышиными последовательностями. "Имеющие решающее значение" для целей стабильности (прежде всего CDR) положения АК указаны стрелками на верхней линии, они соответствуют АК, которые должны происходить из мышиной последовательности, а "имеющие менее важное значение" положения, указанные на нижней линии, соответствуют АК, которые могут происходить как из человеческой, так и мышиной последовательности. (II) Программа MGT/DomainGapAlign (Lefranc и др., Dev. Comp. Immunol., 29, 2005, сс. 185-203) позволяет выравнивать и вводить бреши в соответствии с системой IMGT-нумерации ("IMGT-gap") в аминокислотную последовательность доменов мышиных последовательностей VH и VL D10 и H10. Представлена вводимая последовательность, выровненная с наиболее близкой V-областью (V-REGION) зародышевой линии или наиболее близким С-доменом (C-DOMAIN) из директории домена IMGT и с брешиками, введенными согласно уникальной IMGT-нумерации для V-области (V-REGION), С-домена (C-DOMAIN) и С-подобного домена (C-LIKE-DOMAIN);

на фиг. 4 - схематическое изображение различных архитектур CAR (V1-V6);

на фиг. 5 - данные о количестве молекул ROR1 на поверхности различных клеточных линий;

на фиг. 6 - схема процедуры скрининга scCAR;

на фиг. 7 - данные об общей экспрессии scCAR в человеческих Т-клетках: (А) эксперимент 1. (Б) эксперимент 2;

на фиг. 8 - данные об экспрессии scCAR на клеточной поверхности человеческих Т-клеток. (А) экс-

перимент 1. (Б) эксперимент 2;

на фиг. 9 - данные о дегрануляции модифицированных scCAR Т-клеток после совместного культивирования с клетками-мишенями. (А) эксперимент 1. (Б) эксперимент 2 (слева направо - клеточные линии и/или варианты обработки: MDA-MB-2301, PC-3, MCF-7, без активации, РМА + иономицин);

на фиг. 10 - данные об экспрессии scCAR на поверхности человеческих Т-клеток. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD по четырем независимым экспериментам;

на фиг. 11 - данные о дегрануляции модифицированных scCAR Т-клеток после совместного культивирования с клетками-мишенями. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD по четырем независимым экспериментам;

на фиг. 12 - данные о производстве IFN γ модифицированных scCAR Т-клеток после совместного культивирования с клетками-мишенями. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD по четырем независимым экспериментам (слева направо - клеточные линии и/или виды обработки: Jeko-1, K562, MDA-MB-2301, PC-3, MCF-7, без активации);

на фиг. 13 - данные о цитотоксической активности модифицированных scCAR Т-клеток после совместного культивирования с прикрепленными клетками-мишенями. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD по четырем независимым экспериментам;

на фиг. 14 - данные о цитотоксической активности модифицированных scCAR Т-клеток после совместного культивирования с находящимися в суспензии клетками-мишенями. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ SD по четырем независимым экспериментам;

на фиг. 15 - схематическое изображение сконструированной иммунной клетки, предлагаемой в изобретении. Сконструированная иммунная клетка, представленная на этом чертеже, представляет собой Т-клетку, трансдуцированную полипептидом CAR, который кодируется в ретровирусе. Указанную клетку подвергали дополнительным манипуляциям для более надежного и безопасного приживания в организме пациента, что является необязательным в контексте настоящего изобретения. Ген X может представлять собой, например, ген, экспрессирующий компонент TCR (TCR-альфа или TCR-бета), Y может представлять собой ген, с которым связана чувствительность Т-клетки к иммуносупрессорным лекарственным средствам, такой как CD52 (в случае алектумаба) или HPRT (в случае 6-тиогуанина);

Таблица 1. Последовательности различных компонентов CAR, отличных от scFv

Функциональные домены	SEQ ID №:	Исходная аминокислотная последовательность
сигнальный пептид CD8 α	SEQ ID NO:1	MALPVTALLLPLALLLHAARP
альтернативный сигнальный пептид	SEQ ID NO:2	METDTLLLWVLLLWVPGSTG
Fc ϵ c	SEQ ID NO:3	GLAVSTISSFFPPGYQ
CD8 α	SEQ ID NO:4	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACD
Функциональные домены	SEQ ID №:	Исходная аминокислотная последовательность
шарнир IgG1	SEQ ID NO:5	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPP KPKDTLMIAARTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLK TVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
CD8 α	SEQ ID NO:6	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
трансмембранный домен 41BB	SEQ ID NO:7	IISFFLALTSTALLFLFLFLTLRFSVV
внутриклеточный домен 41BB	SEQ ID NO:8	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPSEEEGGCEL
внутриклеточный домен CD3 ζ	SEQ ID NO:9	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNP QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR
линкер	SEQ ID NO:10	GGGGSGGGSGGGGS

Таблица 2. Последовательности scFv из мышинового антитела, CDR их scFv и гуманизированные scFv из антител D10 и H10

Последовательности scFv	SEQ ID №	Исходная аминокислотная последовательность
Происхождение из мышинового антитела		
Варибельная область тяжелой цепи 2A2	SEQ ID NO:11	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFSYEMHWVIQTPVHGLEWIGAIIDPETGGTAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYME
	SEQ ID NO:12	CDR1 GYTFSDYE
	SEQ ID NO:13	CDR2 IDPETGGT
	SEQ ID NO:14	CDR3 TGYDYDSFTY
Варибельная область легкой цепи 2A2	SEQ ID NO:15	DIVMTQSQKIMSTTVGDRVSITCKASQNVDAAVAWYQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFLTISNMQSEDLADYFCQQYDIYPYTFGGGKLEIK
	SEQ ID NO:16	CDR1 QNVDA
	SEQ ID NO:17	CDR2 SAS
	SEQ ID NO:18	CDR3 QQYDIYPYT
Варибельная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:19	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSYAMSWVRQIP EKRLEWVASISRGGTTYYPDSVKGRFTISRDNVRNILYLQMS SLRSEDTAMYYCGRYDYDGYAMDYWGQGTSTVTVSS
Последовательности scFv	SEQ ID №	Исходная аминокислотная последовательность
4A5	SEQ ID NO:20	CDR1 GFTFSSYA
	SEQ ID NO:21	CDR2 ISRGGTT
	SEQ ID NO:22	CDR3 GRYDYDGYAMDY
Варибельная область легкой цепи 4A5	SEQ ID NO:23	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASPDINSYLSWFQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSPRFGSGGSGQDYSLTINSLEYEDMG IYYCLQYDEFPYTFGGGKLEMK
	SEQ ID NO:24	CDR1 PDINSY
	SEQ ID NO:25	CDR2 RAN
	SEQ ID NO:26	CDR3 LQYDEFPYT
Варибельная область тяжелой цепи D10	SEQ ID NO:27	QVQLKESGPGLVAPSQTLITCTVSGFSLTSYGVHWRQPPGKGLEWLGVIWAGGFTNYSALKSRSLISKDNSKQVLLKMT SLQTDDETAMYYCARRGSSYSMDYWGQGTSTVTVSS
	SEQ ID NO:28	CDR-H1 GFSLSY
	SEQ ID NO:29	CDR-H2 IWAGGFT
	SEQ ID NO:30	CDR-H3 ARRGSSYSMDY
Варибельная область легкой цепи D10	SEQ ID NO:32	EIVLSQSPAITAASLGQKVTITCSASSNVSYIHWHYQQRSGTSP RPWYIEISKLASGVVPVRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAIIYY CQWNYPLITFGSGTKLEIQ
	SEQ ID NO:33	CDR-L1 SNVSY
	SEQ ID NO:34	CDR-L2 EIS
	SEQ ID NO:35	CDR-L3 QWNYPLIT
Варибельная область тяжелой цепи G6	SEQ ID NO:37	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGFAFTGYNMNVKQTN GKSLEWIGSIDPYGGSTYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQ LKSLTSDDSAVYYCARSPGGDYAMDYWGQGTSTVTVSS
	SEQ ID NO:38	CDR1 GFAFTGYN
	SEQ ID NO:39	CDR2 IDPYYGGS

034081

Последовательности scFv	SEQ ID №	Исходная аминокислотная последовательность
	SEQ ID NO:40	CDR3 ARSPGGDYAMDY
Варибельная область легкой цепи G6	SEQ ID NO:41	DIKMTQSPSSMYASVGERVTITCKASQGINSYSGWFOQKPG KSPKTLIYRGNRLVDGVPSRFGSGSGQDYSLTISSEYEDM GIYYCLQYDEFPYTFGGGKLEIK
	SEQ ID NO:42	CDR1 QGINSY
	SEQ ID NO:43	CDR2 RGN
	SEQ ID NO:44	CDR3 LQYDEFPYT
	SEQ ID NO:45	QVQLQPGGAELVKPGTSLKLSCKASGYNFTNYWINWVKLR PGQGLEWIGEIYPGSGSTNYNEKFKSKATLTADTSSSTAYMQ LSSLASEDSALYYCARDGNYYAMDYWGQGTSTVTVSS
Варибельная область тяжелой цепи G3	SEQ ID NO:46	CDR1 GYNFTNYW
	SEQ ID NO:47	CDR2 IYPGSGST
	SEQ ID NO:48	CDR3 ARDGNYYAMDY
	SEQ ID NO:49	DIQMTQTSSLSASLGDRVTITCRASQDINNVLNWYQOKPDG TVKLLIYYTSALHSGVPSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGNTLPPYTFGGGKLEIK
	SEQ ID NO:50	CDR1 QDINNY
Варибельная область легкой цепи G3	SEQ ID NO:51	CDR2 YTS
	SEQ ID NO:52	CDR3 QQGNTLPPYT
	SEQ ID NO:53	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTSSYAMSWVRQTP EKRLEWVASISTGASAYFPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMS SLRSEDAMYYCARITTTSTWYFDVWGAGTTVTVSS
	SEQ ID NO:54	CDR1-H1 GFTFSSYA
	SEQ ID NO:55	CDR-H2 ISTGASA
Варибельная область тяжелой цепи H10	SEQ ID NO:56	CDR-H3 ARITTTSTWYFDV
	SEQ ID NO:58	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQOKPGK SPKTLIYRANRLVDGVPSRFGSGSGQDYSLTISSEYEDMGI YYCLQYDEFPYTFGGGKLEIK
Варибельная область легкой цепи	SEQ ID №	Исходная аминокислотная последовательность
H10	SEQ ID NO:59	CDR-L1 QDINSY
	SEQ ID NO:60	CDR-L2 RAN
	SEQ ID NO:61	CDR-L3 LQYDEFPYT
	SEQ ID NO:63	EVKLQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWVKQSH GKSLIEWIGGINPNNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYME LRSLTSEDSAVYYCALQGFAYWGQGTPLTVSS
	SEQ ID NO:64	CDR1 GYTFTEYT
Варибельная область тяжелой цепи 2A4	SEQ ID NO:65	CDR2 INPNNGGT
	SEQ ID NO:66	CDR3 ALQGFAY
	SEQ ID NO:67	MEIETQTPALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQOKPR SSPKPWLYLTSLNLSGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEAA TYYCQWSSNPYTFGGGTRLEK
	SEQ ID NO:68	CDR1 SSVSY
	SEQ ID NO:69	CDR2 LTS
Варибельная область легкой цепи 2A4	SEQ ID NO:70	CDR3 QQWSSNPYT
	SEQ ID NO:71	EVKLQESGAELARPGASVKMSCKASGYTFTSYTMHWVKQR PGQGLEWIGYINPSSGYTEYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYM QLSSLTSGDSAVYYCARRVLWLRGGDYWGQGTILTVA
	SEQ ID NO:72	CDR1 GYTFTSYT
	SEQ ID NO:73	CDR2 INPSSGYT
	SEQ ID NO:74	CDR3 ARRVLWLRGGDY
Варибельная область тяжелой цепи 1C11	SEQ ID NO:75	MEVLITQTPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNLWQQEPD GTIKRLIYATSSLDGVPSRFGSGSGSDYSLTISSLESEDFVD YYCLQYASSPYTFGGGKLEIK
	SEQ ID NO:76	CDR1 QDIGSS
	SEQ ID NO:77	CDR2 ATS
	SEQ ID NO:77	
	SEQ ID NO:77	

Последовательности scFv	SEQ ID №	Исходная аминокислотная последовательность
	SEQ ID NO:78	CDR3 LQYASSP
Гуманизированные		
для VH-цепи антитела D10 Hu D10-VH	SEQ ID NO:31	QVQL(Q/K)ESGPGLV(K/A)PSETLSLTCTVSGFSLTSYGVHW VRQPPGKGLEWLGVIWAGGFTNYP(S)SLKSRLTISKDNSK NOVSLKLSSTVA(A/D)DTA(V/M)YYCARRGSSYSMDYWGQ GTLVTVSS
для VL-цепи антитела D10 Hu D10-VL	SEQ ID NO:36	EIVL(T/S)QSPATLSLSPGERATLSC(R/S)ASSNVSYIHWWYQK (P/S)GQAPRPWIYEISKLA(T/S)GIPARFSGSGSGTDYTLTISSL E(P/A)EDFA(V/I)YYCQQWNYPLITFGQGKLEIK
для VH-цепи антитела H10 Hu H10-VH	SEQ ID NO:57	EV(Q/K)LVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVASISTGASAYF(A/P)DSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNLSRAEDTA(V/M)YYCARITTSWYFDVWVGQTTV TVSS
для VL-цепи антитела H10 Hu H10-VL	SEQ ID NO:62	DI(Q/K)MTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDINSYLSWFQKPK GKAPKTLIYRANRL(Q/V)SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQ (P/Y)EDFATYYCLQYDEFPYTFGQGKLEIK

Таблица 3. Структура V-1 CAR

Обозначение CAR	Структура CAR						
	Сигнальный пептид (необязательный)	VH	VL	Шарнир FcγRIIIα	TM CD8α	IC 41BB	CD CD3ζ
V-1							
2A2-v1 (SEQ ID NO:79)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.15	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
4A5-v1 (SEQ ID NO:85)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.19	SEQ ID NO.23	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
D10-v1-мышинный и гуманизированный (SEQ ID NO:91 и 97)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.27 или 31	SEQ ID NO.32 или 36	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
G6-v1 (SEQ ID NO:103)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.37	SEQ ID NO.41	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
G3-v1 (SEQ ID NO:109)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.45	SEQ ID NO.49	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
H10-v1 мышинный и гуманизированный (SEQ ID NO:115 и 121)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.53 или 57	SEQ ID NO.58 или 62	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
2A4-v1 (SEQ ID NO:127)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.63	SEQ ID NO.67	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
1C11-v1 (SEQ ID NO:133)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.71	SEQ ID NO.75	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9

Таблица 4. Структура V-2 CAR

Обозначение CAR	Структура CAR						
	Сигнальный пептид (необязательный)	VH	VL	Шарнир FcγRIIIα	TM 41BB	IC 41BB	CD CD3ζ
V-2							
2A2-v2 (SEQ ID NO:80)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.15	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
4A5-v2 (SEQ ID NO:86)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.19	SEQ ID NO.23	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
D10-v2 мышинный и гуманизированный (SEQ ID NO:92 и 98)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.27 или 31	SEQ ID NO.32 или 36	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
G6-v2 (SEQ ID NO:104)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.37	SEQ ID NO.41	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
G3-v2 (SEQ ID NO:110)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.45	SEQ ID NO.49	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
H10-v2 мышинный и гуманизированный (SEQ ID NO:116 и 122)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.53 или 57	SEQ ID NO.58 или 62	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
2A4-v2 (SEQ ID NO:128)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.63	SEQ ID NO.67	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
1C11-v2 (SEQ ID NO:134)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.71	SEQ ID NO.75	SEQ ID NO.3	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9

Таблица 5. Структура V-3 CAR

Обозначение CAR	Структура CAR						
V-3	Сигнальный пептид (необязательный)	VH	VL	Шарнир CD8 α	TM CD8 α	IC 41BB	CD3 ζ
2A2-v3 (SEQ ID NO:81)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.15	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
4A5-v3 (SEQ ID NO:87)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.19	SEQ ID NO.23	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
D10-v3 мышинный и гуманизированный (SEQ ID NO:93 и 99))	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.27 или 31	SEQ ID NO.32 или 36	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
G6-v3 (SEQ ID NO:105)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.37	SEQ ID NO.41	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
G3-v3 (SEQ ID NO:111)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.45	SEQ ID NO.49	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
H10-v3 мышинный и гуманизированный (SEQ ID NO:117 и 123)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.53 или 57	SEQ ID NO.58 или 62	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
Обозначение CAR	Структура CAR						
V-3	Сигнальный пептид (необязательный)	VH	VL	Шарнир CD8 α	TM CD8 α	IC 41BB	CD3 ζ
2A4-v3 (SEQ ID NO:129)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.63	SEQ ID NO.67	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
1C11-v3 (SEQ ID NO:135)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.71	SEQ ID NO.75	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9

Таблица 6. Структура V-4 CAR

Обозначение CAR	Структура CAR						
V-4	Сигнальный пептид (необязательный)	VH	VL	Шарнир CD8 α	TM 41BB	IC 41BB	CD3 ζ
2A2-v4 (SEQ ID NO:82)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.15	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
4A5-v4 (SEQ ID NO:88)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.19	SEQ ID NO.23	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
D10-v4 мышинный и гуманизированный (SEQ ID NO:94 и 100)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.27 или 31	SEQ ID NO.32 или 36	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
G6-v4 (SEQ ID NO:106)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.37	SEQ ID NO.41	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
G3-v4 (SEQ ID NO:112)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.45	SEQ ID NO.49	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
H10-v4 мышинный и гуманизированный (SEQ ID NO: 118 и 124)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.53 или 57	SEQ ID NO.58 или 62	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
2A4-v4 (SEQ ID NO:130)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.63	SEQ ID NO.67	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
1C11-v4 (SEQ ID NO:136)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.71	SEQ ID NO.75	SEQ ID NO.4	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9

Таблица 7. Структура V-5 CAR

Обозначение CAR	Структура CAR						
V-5	Сигнальный пептид (необязательный)	VH	VL	IgG1 hinge	CD8 α - TM	41BB -IC	CD3 ζ CD
2A2-v5 (SEQ ID NO:83)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.15	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
4A5-v5 (SEQ ID NO:89)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.19	SEQ ID NO.23	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
D10-v5 мышинный и гуманизированный (SEQ ID NO:95 и 101)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.27 или 31	SEQ ID NO.32 или 36	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9

Обозначение CAR	Структура CAR						
V-5	Сигнальный пептид (необязательный)	VH	VL	IgG1 hinge	CD8α- TM	41BB -IC	CD3ζCD
G6-v5 (SEQ ID NO:107)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.37	SEQ ID NO.41	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
G3-v5 (SEQ ID NO:113)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.45	SEQ ID NO.49	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
H10-v5 мышинный и гуманизированный (SEQ ID NO:119 и 125)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.53 или 57	SEQ ID NO.58 или 62	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
2A4-v5 (SEQ ID NO:131)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.63	SEQ ID NO.67	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
1C11-v5 (SEQ ID NO:137)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.71	SEQ ID NO.75	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.6	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9

Таблица 8. Структура V-6 CAR

Обозначение CAR	Структура CAR						
V-6	Сигнальный пептид (необязательный)	VH	VL	Шарнир IgG1	TM 41BB	IC 41BB	CD CD3ζ
2A2-v6 (SEQ ID NO:84)	SEQ ID NO:1	VH	VL	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
4A5-v6 (SEQ ID NO:90)	SEQ ID NO.1	SEQ ID NO.11	SEQ ID NO.15	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
D10-v6 мышинный и гуманизированный (SEQ ID NO:96 и 102)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.19	SEQ ID NO.23	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
G6-v6 (SEQ ID NO:108)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.27 или 31	SEQ ID NO.32 или 36	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
G3-v6 (SEQ ID NO:114)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.37	SEQ ID NO.41	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
H10-v6 мышинный и гуманизированный (SEQ ID NO:120 и 126)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.45	SEQ ID NO.49	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
2A4-v6 (SEQ ID NO:132)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.53 или 57	SEQ ID NO.58 или 62	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9
1C11-v6 (SEQ ID NO:138)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO.63	SEQ ID NO.67	SEQ ID NO.5	SEQ ID NO.7	SEQ ID NO.8	SEQ ID NO.9

Подробное описание изобретения

Если специально не указано иное, то все технические и научные понятия, использованные в настоящем описании, имеют значение, которое является общепринятым для специалистов в области генной терапии, биохимии, генетики и молекулярной биологии.

Для осуществления на практике или тестирования настоящего изобретения можно применять все методы и материалы, сходные или эквивалентные тем, которые указаны в настоящем описании, при этом в настоящей заявке описаны приемлемые методы и материалы. Все публикации, заявки на патент, патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем описании, полностью включены в настоящее описание в качестве ссылки. В случае разночтения следует руководствоваться настоящим описанием, включая определения. Кроме того, материалы, методы и примеры представлены только для иллюстрации и не направлены на ограничение объема изобретения, если не указано иное.

При осуществлении на практике настоящего изобретения следует применять, если не указано иное, общепринятые методы клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, транскрипционной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК и иммунологии, известные специалисту в данной области. Такие методы подробно описаны в литературе, см., например, Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, изд-во Wiley and son Inc, Library of Congress, USA, 2000); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3-е изд. (Sambrook и др., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001); Oligonucleotide Synthesis, под ред. M. J. Gait, 1984; Mullis и др., US № 4683195; Nucleic Acid Hybridization (под ред. B. D. Harries и S. J. Higgins, 1984); Transcription And Translation (под ред. B. D. Hames и S. J. Higgins, 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, изд-во Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (изд-во IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning, 1984; серия: Methods In ENZYMOLOGY (под ред. J. Abelson и M. Simon, изд-во Academic Press, Inc., New York), прежде всего том 154 и том 155 (под ред. Wu и др.) и том 185, "Gene Expres-

sion Technology" (под ред. D. Goeddel); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (под ред. J. H. Miller и M. P. Calos, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, 1987); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (под ред. Mayer и Walker, изд-во Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, тома I-IV (под ред. D. M. Weir и C. C. Blackwell, 1986); и Manipulating the Mouse Embryo, (изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

ROR1-специфические химерные антигенные рецепторы

Настоящее изобретения относится к новым конструкциям анти-ROR1 химерного антигенного рецептора (CAR), содержащего внеклеточный лигандсвязывающий домен, трансмембранный домен и домен трансдукции сигнала.

Понятие "внеклеточный лигандсвязывающий домен" в контексте настоящего описания обозначает олиго- или полипептид, обладающий способностью связываться с лигандом. Предпочтительно домен должен обладать способностью, взаимодействовать с молекулой клеточной поверхности. Например, можно выбирать внеклеточный лигандсвязывающий домен, позволяющий распознавать лиганд, который функционирует в качестве маркера клеточной поверхности на клетках-мишенях, ассоциированных с конкретным болезненным состоянием. В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный внеклеточный лигандсвязывающий домен содержит одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), содержащий вариабельный фрагмент легкой (V_L) и тяжелой (V_H) цепи специфического в отношении антигена-мишени моноклонального антитела к CD123, соединенные гибким линкером. Указанные V_L и V_H предпочтительно выбирают из антител, обозначенных как 2A2, 4A5 и D10, которые представлены в таблице 2.

Кроме того, в таблице 2, в которой охарактеризованы также V_L и V_H G6, G3, H10, 2A4 и 1C11, которым соответствуют последовательности SEQ ID NO: 37, 41, 45, 49, 53, 58, 63, 67, 71 и 75, а также гуманизированные V_L и V_H D10 и H10, которым соответствуют последовательности SEQ ID NO: 31, 36, 57 и 62.

На фиг. 4 представлена архитектура 6 версий CAR, предлагаемых в настоящем изобретении. В таблице 1 представлены в качестве примеров компоненты, используемые в дальнейших экспериментах.

ROR1-(NTRKR1)-специфический химерный антигенный рецептор (CAR), предлагаемый в настоящем изобретении, может иметь одну из полипептидных структур, выбранную из V1-V6, проиллюстрированных на фиг. 4, указанная структура содержит внеклеточный лигандсвязывающий домен, содержащий V_H и V_L из моноклонального антитела к ROR1, шарнир, трансмембранный домен и цитоплазматический домен, включающий сигнальный домен CD3дзета и костимуляторный домен из 4-1BB.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к ROR1- (NTRKR1)-специфическим химерным антигенным рецепторам (CAR), имеющим одну из полипептидных структур, выбранную из V3, V5 и V1, проиллюстрированных на фиг. 4, где указанная структура содержит внеклеточный лигандсвязывающий домен, содержащий V_H и V_L из моноклонального антитела к ROR1, шарнир, трансмембранный домен CD8 α и цитоплазматический домен, включающий сигнальный домен CD3 дзета и костимуляторный домен из 4-1BB.

Антигенсвязывающий домен

Антигенсвязывающий домен ROR1-специфических CAR, предлагаемых в изобретении, может представлять собой любой домен, который связывается с находящимся вне ткани антигеном, включая (но, не ограничиваясь только ими) моноклональное антитело, рекомбинантное антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело и его функциональный фрагмент.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный внеклеточный лигандсвязывающий домен содержит одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), содержащий вариабельный фрагмент легкой (V_L) и тяжелой (V_H) цепи специфического в отношении антигена-мишени моноклонального антитела к ROR1, соединенные гибким линкером. Указанные V_L и V_H предпочтительно выбирают из соответствующих фрагментов антител, обозначенных как H10, D10, 4A5, G6, G3, 2A2, 2A4 и 1C11, которые указаны в таблице 2. Они предпочтительно сцеплены друг с другом с помощью гибкого линкера, содержащего, например, последовательность SEQ ID NO:10. Другими словами, указанные CAR предпочтительно содержат внеклеточный лигандсвязывающий домен, который содержит полипептидную последовательность, идентичную по меньшей мере на 90, 95, 97 или 99% последовательностям, представляющим собой комбинации V_H - и V_L -цепей с расположенным между ними линкером, которые представлены в таблицах с 3 по 8 для версий V1-V6.

В наиболее предпочтительных вариантах осуществления изобретения указанные V_L и V_H происходят из антитела H10.

В других конкретных вариантах осуществления изобретения указанные V_L и V_H происходят из антитела D10.

В контексте настоящего описания понятие "рекомбинантное антитело" означает антитело или фрагмент антитела, созданное/созданный с помощью технологии рекомбинантной ДНК, такое/такой, например, как антитело или фрагмент антитела, экспрессируемое/экспрессируемый бактериофагом, системой экспрессии дрожжей или системой экспрессии клеток млекопитающих, и более конкретно Т-клеткой, трансдуцированной вирусным вектором, содержащим нуклеотидную последовательность, ко-

дирующую CDR-участки антитела. Подразумевается также, что понятие относится к антителу или фрагменту антитела, созданному с помощью синтеза молекулы ДНК, которая кодирует антитело или фрагмент антитела, и эта молекула ДНК экспрессирует белок антитела или фрагмента антитела или аминокислотную последовательность, специфическую для антитела или фрагмента антитела, при этом ДНК или аминокислотную последовательность была получена с использованием технологии получения рекомбинантной или синтетической ДНК, которая доступна и хорошо известна в данной области.

В контексте настоящего описания понятие "гуманизированное антитело" означает, что полипептиды включают гуманизованную вариабельную область тяжелой цепи и гуманизованную вариабельную область легкой цепи. Например, полипептиды могут включать каркасные (FR) участки вариабельных областей тяжелой и легкой цепи человеческого антитела, практически сохраняя при этом антигенсвязывающую специфичность родительского моноклонального антитела. Гуманизованная вариабельная область тяжелой цепи и/или гуманизованная вариабельная область легкой цепи являются гуманизованными по меньшей мере примерно на 87%, гуманизованными по меньшей мере примерно на 90%, гуманизованными по меньшей мере примерно на 95%, гуманизованными по меньшей мере примерно на 98% или гуманизованными по меньшей мере примерно на 100% за исключением гипервариабельных участков (CDR). Молекулы антигенсвязывающих полипептидов могут происходить из донорских моноклональных антител (например, мышинных донорских моноклональных антител) и могут включать CDR из моноклональных антител (например, CDR из мышинных моноклональных антител).

В контексте настоящего описания понятие "моноклональное антитело" означает, что антитело получено с использованием выращенного в лаборатории клона клетки, либо гибридомы, либо трансформированного вирусом лимфоцита, такие антитела являются более многочисленными и однородными, чем встречающиеся в естественных условиях антитела, и обладают способностью специфически связываться с одним сайтом на антигене ROR1. Они представляют собой моносpezifические антитела, создающиеся идентичными иммунными клетками, которые все представляют собой клоны одной родительской клетки, в отличие от поликлональных антител, которые получают из нескольких различных иммунных клеток. Моноклональные антитела обладают одновалентной аффинностью, это означает, что они связываются с одним и тем же эпитопом.

В настоящем изобретении предложен ROR1-специфический химерный антигенный рецептор (ROR1 CAR), указанный выше, в котором указанный внеклеточный лигандсвязывающий домен содержит гуманизованные VH- и VL-цепи.

В табл. 2 представлены последовательности гуманизованного scFv (VH- и VL-цепи), соответствующие антителам к ROR1 D10 и H10.

На фиг. 3A-3Г представлено выравнивание мышинных scFv D10 и H10 с их гуманизованной формой согласно методологии, описанной у Lefranc M.P. с соавторами (Lefranc M.P., Ehrenmann F., Ginestoux C, Giudicelli V., Duroux P. "Use of IMGT(®) databases and tools for antibody engineering and humanization", *Methods Mol Biol.*; 907, 2012, сс. 3-37).

На этих четырех выровненных последовательностях указаны:

CDR,

"имеющие наиболее решающее значение" аминокислоты (АК), помеченные сверху стрелкой, это означает, что указанные АК представляют собой сохраненные АК из мышинного антитела;

"менее важные" аминокислоты, помеченные сверху стрелкой, это означает, что указанные АК могут происходить или из мышинного антитела, или из человеческого антитела; следует иметь в виду, что гуманизованные последовательности, предлагаемые в изобретении, фактически представляют собой набор всех различных последовательностей, которые могут быть созданы путем всех комбинаций таких "менее важных" АК из человеческого или мышинного антитела; указанные последовательности, содержащие CDR и "имеющие наиболее решающее значение" АК уже были представлены ранее.

Гуманизованное антитело можно получать с помощью различных методов, известных в данной области, включая (но, не ограничиваясь только ими) трансплантацию CDR (см., например, европейский патент EP 239400; международную публикацию WO 91/09967; и US №№ 5225539, 5530101 и 5585089, каждый из указанных документов полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки), "облицовку" или "нанесение покрытия" (см., например, европейский патент EP 592106 и EP 519596; Padlan, *Molecular Immunology*, 28(4/5), 1991, сс. 489-498; Studnicka и др., *Protein Engineering*, 7(6), 1994, сс. 805-814; и Roguska и др., *PNAS*, 91, 1994, сс. 969-973, каждый из указанных документов полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки), перестановку цепи (см., например, US № 5565332, который полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки) и методы, описанные, например, в публикации заявки на патент США US 2005/0042664, публикации заявки на патент США US 2005/0048617, патентах US 6407213, US 5766886, публикации международной заявки на патент WO 9317105, Tan и др., *J. Immunol.*, 169, 2002, сс. 1119-1125, Caldas и др., *Protein Eng.*, 13(5), 2000, сс. 353-360, Morea и др., *Methods*, 20(3), 2000, сс. 267-279, Vaca и др., *J. Biol. Chem.*, 272(16), 1997, сс. 10678-10684, Roguska и др., *Protein Eng.*, 9(10), 1996, сс. 895-904, Couto и др., *Cancer Res.*, 55 (приложение 23), 1995, сс. 5973-5977, Couto и др., *Cancer Res.*, 55(8), 1995, сс. 1717-1722, Sandhu J. S., *Gene*, 150(2), 1994, сс. 409-410 и Pedersen и др., *J. Mol. Biol.*, 235(3), 1994, сс. 959-973, каждый из указанных документов полностью включен в на-

стоящее описание в качестве ссылки. Часто каркасные остатки в каркасных областях требуется заменять на соответствующие остатки из CDR донорского антитела для изменения, например, для улучшения связывания с антигеном. Такие замены в каркасном участке идентифицируют с помощью методов, хорошо известных в данной области, например, путем моделирования взаимодействий остатков CDR и каркасного участка с целью идентификации остатков каркасного участка, важных для связывания с антигеном, и сравнения последовательностей для идентификации необычных остатков каркасного участка в определенных положениях (см., например, Queen и др., US 5585089; и Riechmann и др., Nature, 332, 1988, с. 323, указанные документы включены в настоящее описание в качестве ссылки).

Один из объектов настоящего изобретения относится, прежде всего, к ROR1-(NTRKR1)-специфическому химерному антигенному рецептору (CAR), который имеет одну из полипептидных структур, выбранных из V3, V5 и V1, которые проиллюстрированы на фиг. 4, где указанная структура содержит внеклеточный лигандсвязывающий домен, который содержит VH и VL из моноклонального антитела к ROR1, шарнир, трансмембранный домен CD8 α (TM CD8 α), цитоплазматический домен, включающий сигнальный домен CD3зета и костимуляторный домен из 4-1BB.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения указанный трансмембранный домен описывается полипептидом, последовательность которого идентична по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, и еще более предпочтительно по меньшей мере на 99% SEQ ID NO: 6 (TM CD8 α).

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения указанный шарнир описывается полипептидом, последовательность которого идентична по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, и еще более предпочтительно по меньшей мере на 99% SEQ ID NO: 4 (CD8 α), SEQ ID NO: 5 (IgG1) и SEQ ID NO: 3 (Fc γ RIII α) для структур V3, V5 и V1 соответственно.

Согласно более предпочтительному варианту осуществления изобретения ROR1-специфический CAR, предлагаемый в изобретении, имеет полипептидную структуру V3, содержащую шарнир CD8 α , который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и трансмембранный домен CD8 α , который имеет имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

Согласно другому более предпочтительному варианту осуществления изобретения ROR1-специфический CAR, предлагаемый в изобретении, имеет полипептидную структуру V5, содержащую шарнир IgG1, который имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и трансмембранный домен CD8 α , который имеет имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения указанный ROR1- (NTRKR1)-специфический химерный антигенный рецептор (CAR) имеет одну из полипептидных структур, выбранных из V3, V5 и V1, которые проиллюстрированы на фиг. 4, где внеклеточный лигандсвязывающий домен содержит:

вариабельную область тяжелой цепи VH, содержащую CDR из мышинового моноклонального антитела H10, которые имеют SEQ ID NO: 54 (CDR-H1), SEQ ID NO: 55 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 56 (CDR-H3), и

вариабельную область легкой цепи VL, содержащую CDR из мышинового моноклонального антитела H10, которые имеют SEQ ID NO: 59 (CDR-L1), SEQ ID NO: 60 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 61 (CDR-L3); или

вариабельную область тяжелой цепи VH, содержащую CDR из мышинового моноклонального антитела D10, которые имеют SEQ ID NO: 28 (CDR-H1), SEQ ID NO: 29 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 30 (CDR-H3), и

вариабельную область легкой цепи VL, содержащую CDR из мышинового моноклонального антитела D10, которые имеют SEQ ID NO: 33 (CDR-L1), SEQ ID NO: 34 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 35 (CDR-L3).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный ROR1- (NTRKR1)-специфический химерный антигенный рецептор (CAR) имеет одну из полипептидных структур, выбранных из V3, V5 и V1, которые проиллюстрированы на фиг. 4, где указанный внеклеточный лигандсвязывающий домен содержит VH- и VL-цепи, последовательности которых идентичны по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, и еще более предпочтительно по меньшей мере на 99%

SEQ ID NO: 53 (H10-VH) и SEQ ID NO: 58 (H10-VL) соответственно или

SEQ ID NO: 27 (D10-VH) и SEQ ID NO: 32 (D10-VL) соответственно.

В другом варианте осуществления изобретения указанный ROR1-(NTRKR1)-специфический химерный антигенный рецептор (CAR) имеет одну из полипептидных структур, выбранных из V3, V5 и V1, которые проиллюстрированы на фиг. 4, где указанный внеклеточный лигандсвязывающий домен содержит VH- и VL-цепи из антитела H10 или антитела D10, которые были гуманизированы.

В частности, указанный внеклеточный лигандсвязывающий домен содержит гуманизированные VH- и VL-цепи, где

вариабельная тяжелая цепь VH Hu H10 имеет полипептид, описываемый SEQ ID NO: 57, и вариабельная легкая цепь VL Hu H10 имеет полипептид, описываемый SEQ ID NO: 62; или вариабельная тяжелая цепь VH Hu D10 имеет полипептид, описываемый SEQ ID NO: 31, и вариабельная легкая цепь VL Hu D10 имеет полипептид, описываемый SEQ ID NO: 36.

Согласно другому варианту осуществления изобретения указанный ROR1-(NTRKR1)-специфический химерный антигенный рецептор (CAR) имеет одну из полипептидных структур, выбранных из V3, V5 и V1, которые проиллюстрированы на фиг. 4, где последовательность указанного полипептида CAR идентична по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, и еще более предпочтительно по меньшей мере на 99% SEQ ID NO: 117 (последовательность H10v3-CAR) или SEQ ID NO: 93 (последовательность D10v3-CAR), или SEQ ID NO: 95 (последовательность D10v5-CAR).

Архитектуры CAR

Домен трансдукции сигнала или внутриклеточный сигнальный домен CAR, предлагаемого в настоящем изобретении, ответствен за внутриклеточную передачу сигнала после связывания внеклеточного лигандсвязывающего домена с мишенью, приводя к активации иммунной клетки и иммунному ответу. Другими словами, домен трансдукции сигнала ответствен за активацию по меньшей мере одной из обычных эффекторных функций иммунной клетки, в которой экспрессируется CAR. Например, эффекторная функция Т-клетки может представлять собой цитолитическую активность или хелперную активность, включая секрецию цитокинов. Таким образом, понятие "домен трансдукции сигнала" относится к участку белка, который трансдуцирует эффекторный сигнал и побуждает клетку осуществлять специализированную функцию.

Предпочтительными примерами домена трансдукции сигнала, которые можно применять в CAR, могут являться цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора и корецепторов, совместное действие которых состоит в инициации трансдукции сигнала после контакта с рецептором антигена, а также любое производное или любой вариант указанных последовательностей и любой синтетической последовательности, которая имеет такую же функциональную способность. Домен трансдукции сигнала содержит два различных класса цитоплазматических сигнальных последовательностей, те, которые иницируют антигензависимую первичную активацию, и те, которые действуют независимым от антигена образом, обеспечивая вторичный или костимуляторный сигнал. Первичная цитоплазматическая сигнальная последовательность может содержать сигнальные мотивы, известные как мотивы активации иммунных рецепторов на основе тирозина, ITAM. ITAM представляют собой хорошо известные сигнальные мотивы, присутствующие во внутрицитоплазматическом "хвосте" различных рецепторов, которые служат в качестве сайтов связывания для класса syk/zap70 тирозинкиназ. Примерами ITAM, применяемых согласно изобретению, могут служить (но, не ограничиваясь только ими) ITAM, происходящие из TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, FcR-эпсилон, CD3гамма, CD3дельта, CD3эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В предпочтительном варианте осуществления изобретения домен трансдукции сигнала CAR может содержать происходящий из CD3дзета сигнальный домен, который имеет аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90, 95, 97-99% или 100% аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 9).

В конкретном варианте осуществления изобретения домен трансдукции сигнала CAR, предлагаемого в настоящем изобретении, содержит костимуляторную сигнальную молекулу или ее часть. Костимуляторная молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, отличную от антигенного рецептора или его лигандов, которая требуется для эффективного иммунного ответа. Понятие "костимуляторный лиганд" относится к молекуле на антигенпрезентирующей клетке, которая специфически связывается с когнатной костимуляторной молекулой на Т-клетке, создавая тем самым сигнал, который, в дополнение к первичному сигналу, создаваемому, например, при связывании комплекса TCR/CD3 с молекулой ГКГС, загруженной пептидом, опосредует Т-клеточный ответ, включая (но, не ограничиваясь только ими) активацию пролиферации, дифференцировку и т.п. Костимуляторный лиганд может включать (но, не ограничиваясь только ими) CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, индуцибельный костимуляторный лиганд (ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, рецептор лимфотоксина бета, 3/TR6, ILT3, ILT4, агонист или антитело, который/которое связывается с лигандом Толл-рецептора, и лиганд, который специфически связывается с B7-H3. Под понятие "костимуляторный лиганд" подпадает, среди прочего, антитело, которое специфически связывается с костимуляторной молекулой, присутствующей на Т-клетке, такой как (но, не ограничиваясь только ими) CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, лиганд, специфически связывающийся с CD83.

Понятие "костимуляторная молекула" относится к когнатному связывающему партнеру, присутствующему на Т-клетке, который специфически связывается с костимуляторным лигандом, опосредуя тем самым костимуляторный ответ клетки, такой как (но, не ограничиваясь только им) пролиферация. Костимуляторные молекулы включают (но, не ограничиваясь только ими) молекулу ГКГС класса I, BTLA и

лиганд Толл-рецептора. Примерами костимуляторных молекул являются CD27, CD28, CD8, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, специфически связывающийся с CD83, и т.п.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения домен трансдукции сигнала CAR, предлагаемого в настоящем изобретении, содержит костимуляторную сигнальную молекулу, выбранную из группы, состоящей из фрагмента 4-1BB (GenBank: AAA53133.) и CD28 (NP_006130.1), или ее часть. В частности, домен трансдукции сигнала CAR, предлагаемого в настоящем изобретении, содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90, 95, 97 или 99% аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 8. CAR, предлагаемый в настоящем изобретении, экспрессируется на поверхности клеточной мембраны. Таким образом, CAR содержит также трансмембранный домен. Отличительными особенностями соответствующих трансмембранных доменов являются способность экспрессироваться на поверхности клетки, согласно настоящему изобретению предпочтительно на поверхности иммунной клетки, прежде всего лимфоцитов или естественных клеток-киллеров (NK), и взаимодействовать друг с другом, направляя клеточный ответ иммунной клетки на заранее определенную клетку-мишень. Трансмембранный домен можно получать как из встречающегося в естественных условиях, так и синтетического источника. Трансмембранный домен можно получать из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. Примерами трансмембранного полипептида могут служить (но, не ограничиваясь только ими) субъединица Т-клеточного рецептора, такая как α -, β -, γ - или δ -субъединица, полипептид, включающий комплекс CD3, субъединицы IL-2-рецептора p55 (а-цепь), p75 (β-цепь) или γ -цепь, цепь субъединицы Fc-рецепторов, в частности, Fc γ -рецептора типа III, или CD-белки. Альтернативно этому, трансмембранный домен может быть синтетическим, и он может содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный трансмембранный домен получают из альфа-цепи человеческого CD8 (например, NP_001139345.1). Трансмембранный домен может содержать также шарнирную область между указанным внеклеточным лигандсвязывающим доменом и указанным трансмембранным доменом. В контексте настоящего описания понятие "шарнирная область", как правило, обозначает любой олиго- или полипептид, функция которого заключается в сцеплении трансмембранного домена с внеклеточным лигандсвязывающим доменом. В частности, шарнирную область используют для обеспечения большей гибкости и доступности внеклеточного лигандсвязывающего домена. Шарнирная область может содержать вплоть до 300 аминокислот, предпочтительно от 10 до 100 аминокислот, и наиболее предпочтительно от 25 до 50 аминокислот. Шарнирную область можно получать из полных встречающихся в естественных условиях молекул, или их частей, таких как полная внеклеточная область CD8, CD4 или CD28, или ее часть, или полная константная область антитела или ее часть. Альтернативно этому, шарнирная область может представлять собой синтетическую последовательность, которая соответствует встречающейся в естественных условиях шарнирной последовательности, или может представлять собой полностью синтетическую шарнирную последовательность. В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный шарнирный домен представляет собой часть альфа-цепи человеческого CD8, Fc γ RIII α -рецептора или IgG1 соответственно, которые обозначены в настоящем описании как SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, или шарнирные полипептиды, последовательности которых идентичны предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90, 95, 97 или 99% последовательностям указанных полипептидов.

CAR, предлагаемый в изобретении, как правило, дополнительно содержит трансмембранный домен (TM), более конкретно выбранный из CD8 α и 4-1BB, который идентичен полипептидам, имеющим SEQ ID NO: 6 или 7. Предпочтительным является TM CD8 α , имеющий SEQ ID NO: 6.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления изобретения ROR1-специфический CAR имеет полипептидную структуру, выбранную из V3, V5 и V1, проиллюстрированных на фиг. 4, где указанная структура содержит внеклеточный лигандсвязывающий домен, содержащий VH и VL из моноклонального антитела к ROR1, шарнир CD8 α , трансмембранный домен CD8 α и цитоплазматический домен, включающий сигнальный домен CD3 дзета и костимуляторный домен из 4-1BB.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения ROR1-специфический CAR имеет полипептидную структуру, выбранную из V3, V5 и V1, проиллюстрированных на фиг. 4, где указанная структура содержит внеклеточный лигандсвязывающий домен, содержащий VH и VL из моноклонального антитела к ROR1, шарнир IgG1, трансмембранный домен CD8 α и цитоплазматический домен, включающий сигнальный домен CD3 дзета и костимуляторный домен из 4-1BB.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения ROR1-специфический CAR имеет структуру, выбранную из V3, V5 и V1, проиллюстрированных на фиг. 4, где указанная структура содержит внеклеточный лигандсвязывающий домен, содержащий VH и VL из моноклонального антитела к ROR1, шарнир Fc γ RIII α , трансмембранный домен CD8 α и цитоплазматический домен, включающий сигнальный домен CD3 дзета и костимуляторный домен из 4-1BB.

В табл. 3-8 представлены структуры CAR для всех 6 версий V1-V6.

В раковых клетках часто имеет место понижающая регуляция или мутация антигенов-мишеней, что приводит к появлению так называемых вариантов "потерянных антигенов" (антигенов, ускользающих от иммунологического надзора). Таким образом, для того, чтобы противостоять ускользанию опухоли от иммунологического надзора и придавать иммунной клетке большую специфичность в отношении мишени, ROR1-специфический CAR, предлагаемый в изобретении, может содержать другие внеклеточные лигандсвязывающие домены, предназначенные для одновременного связывания с другими элементами на мишени и усиления тем самым активации и функции иммунной клетки. В одном из вариантов осуществления изобретения внеклеточные лигандсвязывающие домены можно размещать тандемно на одном и том же трансмембранном полипептиде и их необязательно можно отделять друг от друга с помощью линкера. В другом варианте осуществления изобретения указанные другие внеклеточные лигандсвязывающие домены можно размещать на различных трансмембранных полипептидах, из которых состоит CAR. Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к популяции CAR, каждый из которых содержит различные внеклеточные лигандсвязывающие домены. В частности, настоящее изобретение относится к способу создания иммунных клеток, заключающемуся в том, что получают иммунную клетку и экспрессируют на поверхности указанной клетки популяцию CAR, каждый из которых содержит различные внеклеточные лигандсвязывающие домены. Другой конкретный вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу создания иммунной клетки, заключающемуся в том, что получают иммунную клетку и интродуцируют в указанную клетку полинуклеотиды, кодирующие полипептиды, из которых состоит популяция CAR, каждый из которых содержит различные внеклеточные лигандсвязывающие домены. Под популяцией CAR подразумевают по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть или большее количество CAR, каждый из которых содержит различные внеклеточные лигандсвязывающие домены. Согласно настоящему изобретению различные внеклеточные лигандсвязывающие домены, предлагаемые в настоящем изобретении, предпочтительно могут связываться одновременно с различными элементами на мишени, усиливая тем самым активацию и функцию иммунной клетки. Настоящее изобретение относится также к выделенной иммунной клетке, которая содержит популяцию CAR, каждый из которых содержит различные внеклеточные лигандсвязывающие домены.

Полинуклеотиды, векторы

Настоящее изобретение относится также к полинуклеотидам, векторам, кодирующим описанные выше CAR, предлагаемые в изобретении.

Полинуклеотид может находиться в кассете экспрессии или экспрессионном векторе (например, в плазмиде, предназначенной для интродукции в бактериальную клетку-хозяина, или в вирусном векторе, таком как бакуловирусный вектор, предназначенный для трансфекции клетки насекомого-хозяина, или в плазмидном или вирусном векторе, таком как лентивирус, предназначенный для трансфекции клетки млекопитающего-хозяина).

В один вектор можно включать различные транскены. Указанный вектор может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую рибосомальную skip-последовательность, такую как последовательность, кодирующую пептид 2A. Пептиды 2A, которые были идентифицированы в подгруппе афтовирусов группы пикорнавирусов, приводят к рибосомальному "перескоку" (skip) от одного кодона к следующему без образования пептидной связи между двумя аминокислотами, кодируемыми кодонами (см. Donnelly и Elliott, 2001; Atkins, Wills и др., 2007; Doronina, Wu и др., 2008). Под "кодоном" понимают три нуклеотида на мРНК (или на смысловой цепи молекулы ДНК), которые транслируются рибосомой в один аминокислотный остаток. Таким образом, можно синтезировать два полипептида из одной непрерывной рамки считывания в мРНК, если полипептиды разделены последовательностью олигопептида 2A, присутствующей в рамке считывания. Такие рибосомальные skip-механизмы хорошо известны в данной области, и известно их применение в нескольких векторах для экспрессии нескольких белков, кодируемых одной матричной РНК.

Для направления трансмембранного полипептида в секреторный путь клетки-хозяина в полинуклеотидную последовательность или последовательность вектора встраивают секреторную сигнальную последовательность (известную также как лидерная последовательность, препоследовательность или препоследовательность). Секреторную сигнальную последовательность функционально связывают с трансмембранной нуклеотидной последовательностью, т.е. две последовательности соединяют в правильной рамке считывания и располагают таким образом, чтобы направлять новый синтезированный полипептид в секреторный путь клетки-хозяина. Секреторные сигнальные последовательности, как правило, помещают в 5'-направлении относительно нуклеотидной последовательности, кодирующей представляющий интерес полипептид, хотя определенные секреторные сигнальные последовательности можно помещать и в другие участки представляющей интерес нуклеотидной последовательности (см., например, US 5037743 на имя Welch и др.; US 5143830 на имя Holland и др.). В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения сигнальный пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 2.

Специалистам в данной области должно быть очевидно, что с учетом вырожденности генетического кода можно создавать варианты указанных молекул полинуклеотидов. Предпочтительно нуклеотидные последовательности, предлагаемые в настоящем изобретении, представляют собой последовательно-

сти с кодонами, оптимизированными для экспрессии в клетках млекопитающих, предпочтительно для экспрессии в человеческих клетках. Оптимизация кодонов относится к замене в представляющей интерес последовательности кодонов, которые встречаются относительно редко в характеризующихся высоким уровнем экспрессии генах указанных видов на кодоны, которые обычно часто встречаются в характеризующихся высоким уровнем экспрессии генах указанных видов, такие кодоны кодируют те же аминокислоты, что и подлежащие замене кодоны.

Способы конструирования иммунных клеток, наделенных CAR

В настоящем изобретении предложен способ получения иммунных клеток для иммунотерапии, заключающийся в том, что интродуцируют *ex vivo* в указанные иммунные клетки полинуклеотиды или векторы, кодирующие один из описанных ранее ROR1-специфических CAR.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанные полинуклеотиды включают в лентивирусные векторы, принимая во внимание, что они стабильно экспрессируются в клетках.

В других вариантах осуществления изобретения указанный способ дополнительно включает стадию, на которой генетически модифицируют указанную клетку, делая ее пригодной для аллогенной трансплантации.

Согласно первому объекту изобретения иммунную клетку можно делать менее аллогенной, например, путем инактивации по меньшей мере одного гена, экспрессирующего один или несколько компонентов Т-клеточного рецептора (TCR), согласно методу, описанному в WO 2013/176915, что можно объединять с инактивацией гена, кодирующего или регулирующего экспрессию белка HLA или $\beta 2m$. Таким образом, существенно снижают риск возникновения реакции "трансплантат-против-хозяина" и отторжение трансплантата. Согласно другому объекту изобретения иммунные клетки можно дополнительно подвергать генетической инженерии для повышения их устойчивости к обработкам иммуносупрессорными лекарственными средствами или химиотерапевтическими средствами, которые применяют в качестве стандартной медицинской помощи в случае ROR1-позитивных злокачественных клеток. Например, CD52 и глюкокортикоидные рецепторы (GR), которые являются мишенями лекарственных средств при лечении алемтузумабом и глюкокортикоидами, можно инактивировать, придавая клеткам устойчивость к указанным обработкам и давая конкурентное преимущество по сравнению с собственными Т-клетками пациента, не наделенными ROR1-специфическими CAR. Можно также подавлять или снижать экспрессию гена CD3, придавая устойчивость к темпизумабу, который представляет собой другое иммуносупрессорное средство. Согласно изобретению можно также подавлять или снижать экспрессию HPRT, придавая устойчивость к 6-тиогуанину, цитостатическому агенту, обычно применяемому для химиотерапии, прежде всего для лечения острого лимфобластного лейкоза.

Согласно другому объекту изобретения на иммунные клетки можно дополнительно оказывать воздействие, делая их более активными или ограничивая их истощение, путем инактивации генов, кодирующих белки, которые действуют в качестве "иммунных контрольных точек (чекпойнтов)", такие как регуляторы Т-клеточной активации PDCD1 или CTLA-4. Примеры генов, экспрессию которых можно снижать или подавлять, представлены в таблице 9.

Таблица 9. Перечень генов, кодирующих белки иммунных контрольных точек

Путь		Гены, которые можно инактивировать в этом пути
Коингибирующие рецепторы	CTLA4 (CD152)	CTLA4, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22
	PDCD1 (PD-1, CD279)	PDCD1
	CD223 (lag3)	LAG3
	HAVCR2 (tim3)	HAVCR2
	BTLA(cd272)	BTLA
	CD160(bv55)	CD160
	Семейство IgSF	TIGIT
		CD96
		CRTAM
	LAIR1(cd305)	LAIR1
	SIGLEC	SIGLEC7
		SIGLEC3
		SIGLEC9
Рецепторы смерти	CD244(2b4)	CD244
	TRAIL	TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7
	FAS	FADD, FAS
Цитокиновый сигнал	Сигнал TGF-бета	TGFBRII, TGFBRI, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1
	Сигнал IL10	IL10RA, IL10RB, HMOX2
	Сигнал IL6	IL6R, IL6ST
Предупреждение TCR-сигнала		CSK, PAG1
		SIT1
Индукция Treg	Индукция Treg	FOXP3
Факторы транскрипции, контролирующие истощение	Факторы транскрипции, контролирующие истощение	PRDM1 (=blimp1, обуславливает более высокий контроль хронической вирусной инфекции в гетерозиготных мышах по сравнению с wt- или кондиционными KO мышами)
		BATF
Опосредование толерантности к гипоксии	Индукцируемая iNOS гуанилированная циклаза	GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, GUCY1B3

В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный способ дополнительного конструирования иммунных клеток включает интродукцию в указанные Т-клетки полинуклеотидов, прежде всего мРНК, кодирующих специфическую редко расщепляющую эндонуклеазу, обладающую способностью осуществлять избирательную инактивацию указанных выше генов путем расщепления ДНК. В более предпочтительном варианте осуществления изобретения указанные редко расщепляющие эндонуклеазы представляют собой TALE-нуклеазы или эндонуклеазу Cas9. К настоящему времени доказано, что TAL-нуклеазы обладают более высокой специфичностью и эффективностью расщепления по сравнению с другими типами редко расщепляющих эндонуклеаз, поэтому их выбирают в качестве эндонуклеаз для получения сконструированных иммунных клеток при крупномасштабном производстве с постоянным циклом.

Методы доставки

Различные методы, описанные выше, предполагают интродукцию CAR в клетку. Например (но, не ограничиваясь только этим), указанный CAR можно интродуцировать в виде трансгенов, кодируемых одним плазмидным вектором. Указанный плазмидный вектор может содержать также селективируемый маркер, обеспечивающий идентификацию и/или отбор клеток, в которые встроены указанный вектор.

Полипептиды можно синтезировать *in situ* в клетке в результате интродукции в клетку полинуклеотидов, кодирующих указанные полипептиды. Альтернативно этому, указанные полипептиды можно получать вне клетки и затем интродуцировать в нее. Методы интродукции полинуклеотидных конструкций в клетки известны в данной области и их примерами являются (но, не ограничиваясь только ими) методы стабильной трансформации, в которых полинуклеотидную конструкцию интегрируют в геном клетки, методы кратковременной трансформации, в которых полинуклеотидную конструкцию не интегрируют в геном клетки, и методы, основанные на использовании вирусов. Указанные полинуклеотиды можно интродуцировать в клетку, например, с использованием рекомбинантных вирусных векторов (например, ретровирусов, аденовирусов), липосом и т.п. Например, методы кратковременной трансформации включают микроинъекцию, электропорацию или бомбардировку частицами. Указанные полинуклеотиды можно включать в векторы, более конкретно, в плазмиды или вирусы, с целью экспрессии в клетках.

Сконструированные иммунные клетки

Настоящее изобретение относится также к выделенным клеткам или клеточным линиям, которые можно получать указанным способом создания клеток. В частности, указанная выделенная клетка содержит по меньшей мере один описанный выше CAR. В другом варианте осуществления изобретения указанная выделенная клетка содержит популяцию CAR, каждый из которых содержит различные внеклеточные лигандсвязывающие домены. В частности, указанная выделенная клетка содержит экзогенную полинуклеотидную последовательность, кодирующую CAR. Активация и пролиферация генетически модифицированных иммунных клеток, предлагаемых в настоящем изобретении, происходит независимо от механизмов связывания с антигеном.

Под объем настоящего изобретения подпадает также выделенная иммунная клетка, предпочтительно Т-клетка, полученная с помощью одного из описанных ранее методов. Указанная иммунная клетка представляет собой клетку, происходящую из гематопозитической клетки, функционально участвующую в инициации и/или реализации врожденного или адаптивного иммунного ответа. Указанную иммунную клетку, предлагаемую в настоящем изобретении, можно получать из стволовой клетки. Стволовые клетки могут представлять собой зрелые стволовые клетки, нечеловеческие эмбриональные стволовые клетки, более предпочтительно нечеловеческие стволовые клетки, стволовые клетки из пуповинной крови, клетки-предшественники, стволовые клетки костного мозга, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, тотипотентные стволовые клетки или гематопозитические стволовые клетки. Репрезентативными человеческими клетками являются CD34 -клетки. Указанная выделенная клетка может представлять собой также дендритную клетку, дендритную киллерную клетку, тучную клетку, NK-клетку, В-клетку или Т-клетку, выбранную из группы, состоящей из воспалительных Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов, регуляторных Т-лимфоцитов или хелперных Т-лимфоцитов. В другом варианте осуществления изобретения указанная клетка может иметь происхождение из группы, состоящей из CD4 -Т-лимфоцитов и CD8 -Т-лимфоцитов. Перед осуществлением размножения и генетической модификации клеток, предлагаемых в изобретении, из организма индивидуума можно получать источник клеток с помощью различных методов, не ограничивающих объем изобретения. Клетки можно получать из многочисленных источников, включая (но, не ограничиваясь только ими) мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из инфицированной области, асциты, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения можно применять любое количество Т-клеточных линий, доступных и известных специалистам в данной области. В другом варианте осуществления изобретения указанную клетку можно получать из организма здорового донора, пациента, у которого диагностирован рак, или пациента, у которого диагностирована инфекция. В другом варианте осуществления изобретения указанная клетка представляет собой часть смешанной популяции клеток, обладающих различными фенотипическими характеристиками. Под объем настоящего изобретения подпадает также клеточная линия, полученная из Т-клетки, трансформированной согласно ранее описанному методу. Под объем

настоящего изобретения подпадают модифицированные клетки, которые являются устойчивыми к иммуносупрессорной обработке и которые можно получать с помощью ранее описанного метода.

Предпочтительными вариантами осуществления настоящего изобретения являются Т-клетки или популяция Т-клеток, наделенных ROR1 CAR, описанные выше, которые не экспрессируют функциональный TCR и которые обладают реактивностью в отношении ROR1-позитивных клеток, предназначенные для их аллогенной трансплантации пациентам.

Активация и размножение Т-клеток

Как до, так и после осуществления генетической модификации Т-клеток, даже в том случае, если активация и пролиферация генетически модифицированных иммунных клеток, предлагаемых в настоящем изобретении, не зависит от механизмов связывания с антигеном, иммунные клетки, прежде всего Т-клетки, предлагаемые в настоящем изобретении, можно подвергать дополнительной активации и размножать с помощью методов, описанных, например, в US №№ 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041 и публикации заявки на патент США № 2006/0121005. Т-клетки можно размножать *in vitro* или *in vivo*.

Как правило, Т-клетки, предлагаемые в изобретении, размножают путем приведения в контакт с агентом, который стимулирует комплекс CD3 TCR, и костимуляторной молекулой на поверхности Т-клеток с целью создания сигнала активации для Т-клетки. Например, для создания сигнала активации для Т-клетки можно применять химические соединения, такие как ионофор кальция А23187, форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА), или митогенные лектины, такие как фитогемагглютинин (ФГА).

Например (но, не ограничиваясь только этим), популяции Т-клеток можно стимулировать *in vitro* путем приведения в контакт с антителом к CD3 или его антигенсвязывающим фрагментом, или антителом к CD2, иммобилизованным на поверхности, или путем приведения в контакт с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с ионофором кальция. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток используют лиганд, который связывается с вспомогательной молекулой. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с антителом к CD3 и антителом к CD28 в условиях, обеспечивающих стимуляцию пролиферации Т-клеток. Условия, пригодные для культивирования Т-клеток, включают соответствующие среды (например, минимальную поддерживающую среду или среду RPMI 1640, или X-vivo 5, (фирма Lonza)), которые могут содержать факторы, необходимые для обеспечения пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, фетальную бычью сыворотку или человеческую сыворотку), интерлейкин-2 (IL-2), инсулин, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, -10, -2, IL-15, TGF β и TNF, или любые другие добавки для роста клеток, известные специалистам в данной области. Другие добавки для роста клеток включают (но, не ограничиваясь только ими) сурфактант, плазманат и восстановители, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол. Среда может представлять собой RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 1 и X-Vivo 20, Optimizer, содержащие в качестве добавок аминокислоты, пируват натрия и витамины, они могут быть бессывороточными или могут содержать в качестве добавок в определенном количестве сыворотку (или плазму) или определенный набор гормонов, и/или цитокин(ы) в количестве, достаточном для роста и размножения Т-клеток. Антибиотики, например, пенициллин и стрептомицин, включают только в экспериментальные культуры, но не в культуры клеток, которые предназначены для введения путем инфузии индивидууму. Клетки-мишени поддерживают в условиях, необходимых для поддержания роста, например, при соответствующей температуре (например, при 37°C) и атмосфере (например, в воздухе плюс 5% CO₂). Клетки, которые подвергали стимуляции в течение различных промежутков времени, могут обладать различными характеристиками.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения указанные клетки можно размножать путем совместного культивирования с тканью или клетками. Указанные клетки можно размножать также *in vivo*, например, в крови индивидуума после введения указанной клетки индивидууму.

Терапевтические применения

В другом варианте осуществления изобретения выделенные клетки, полученные различными методами, или клеточную линию, полученную из указанной выделенной клетки, согласно описанному ранее методу, можно применять в качестве лекарственного средства. В другом варианте осуществления изобретения указанное лекарственное средство можно применять для лечения рака, прежде всего для лечения В-клеточных лимфом и лейкозов у пациента, нуждающегося в этом. В другом варианте осуществления изобретения указанную выделенную клетку, предлагаемую в изобретении, или клеточную линию, полученную из указанной выделенной клетки, можно применять для изготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения рака у пациента, нуждающегося в этом.

Другой объект настоящего изобретения относится к способам лечения пациентов, нуждающихся в этом, где указанный способ заключается в том, что осуществляют по меньшей мере одну из следующих стадий, на которых:

(а) получают иммунную клетку, которую можно создавать с помощью одного из ранее описанных способов;

(б) вводят указанные трансформированные иммунные клетки указанному пациенту.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанные Т-клетки, предлагаемые в изобретении, можно подвергать интенсивному Т-клеточному размножению *in vivo* и их можно сохранять в течение продолжительного периода времени.

Указанное лечение может быть облегчающим, терапевтическим или профилактическим. Оно может представлять собой либо составную часть аутологичного иммунотерапевтического лечения, либо составную часть аллогенного иммунотерапевтического лечения. Понятие "аутологичный" означает, что клетки, клеточная линия или популяция клеток, применяемые для лечения пациентов, получают из организма указанного пациента или из организма совместимого по человеческому лейкоцитарному антигену (HLA) донора. Понятие "аллогенный" означает, что клетки или популяция клеток, применяемые для лечения пациентов, не получают из организма указанного пациента, но получают из организма донора.

В предыдущих разделах описаны клетки, которые можно применять в сочетании с описанными способами. Указанную терапию можно применять для лечения пациентов, у которых диагностировано предзлокачественное или злокачественное связанное с раком состояние, отличающееся наличием экспрессирующих ROR1 Т-клеток, прежде всего избыточным количеством экспрессирующих ROR1 Т-клеток. Указанные состояния имеют место при гематологических видах рака, таких как лейкоз или злокачественные лимфопролиферативные нарушения.

Лейкоз может представлять собой острый миелогенный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, мелодиспластический синдром, острый лимфоидный лейкоз, хронический лимфоидный лейкоз и миелодиспластический синдром.

Лимфопролиферативное нарушение может представлять собой лимфому, в частности, хронический лимфоцитарный лейкоз, неходжкинскую лимфому, лимфому Беркитта и фолликулярную лимфому (мелкоклеточную и крупноклеточную).

Согласно одному из предпочтительных вариантов осуществления изобретения указанные сконструированные Т-клетки предназначены для лечения хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) или мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы (SLL).

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения указанное лечение CLL или SLL осуществляют у пациентов, которым было проведено лимфоидное истощение (лимфоистощение) перед осуществлением инфузии ROR1-CAR-Т-клеток. Указанное лимфоистощение, как правило, осуществляют с помощью химиотерапии и предпочтительно с применением таких лекарственных средств, как флударабин (F), циклофосфамид (C), бендамустин (B) или ритуксимаб (R), или их комбинации. Как правило, для лимфоистощения перед введением CAR-Т-клеток можно применять комбинацию sR или FBR.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения указанные сконструированные Т-клетки предназначены для лечения лимфомы из клеток мантии (MCL), острого лимфобластного лейкоза (ALL) с хромосомной транслокацией t(1;19).

Типы рака, которые можно лечить, включают несolidные опухоли (такие как гематологические опухоли, включая (но, не ограничиваясь только ими) пре-В ALL (при педиатрических показаниях), ALL взрослых, лимфому из клеток мантии, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому и т.п. Типы рака, которые можно лечить с помощью CAR, предлагаемых в изобретении, включают (но, не ограничиваясь только ими) лейкозы или лимфоидные злокачественные заболевания. Они включают также опухоли/типы рака взрослых и детские опухоли/типы рака.

С помощью CAR, предлагаемых в изобретении, можно лечить также и solidные опухоли, такие как опухоли молочной железы, ободочной кишки, легкого и почки. Сконструированные Т-клетки, предлагаемые в изобретении, можно применять также для лечения рака поджелудочной железы, почки или яичника.

Лечение с помощью сконструированных иммунных клеток, предлагаемых в изобретении, можно осуществлять в сочетании с применением одного или нескольких типов противораковой терапии, выбранных из группы, включающей терапию на основе антител, химиотерапию, цитокиновую терапию, терапию с использованием дендритных клеток, генную терапию, гормональную терапию, светолазерную терапию и лучевую терапию.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения указанное лечение можно применять для пациентов, подвергающихся иммуносупрессорной терапии. Фактически, настоящее изобретение основано предпочтительно на применении клеток или популяции клеток, которые приобрели устойчивость по меньшей мере к одному иммунодепрессанту в результате инактивации гена, кодирующего рецептор для такого иммунодепрессанта. С этой точки зрения, иммуносупрессорная терапия должна способствовать отбору и размножению Т-клеток, предлагаемых в изобретении, в организме пациента.

Введение клеток или популяции клеток, предлагаемых в настоящем изобретении, можно осуществлять любым пригодным методом, включая ингаляцию аэрозоля, инъекцию, прием внутрь, трансфузию, имплантацию или трансплантацию. Композиции, представленные в настоящем описании, можно вводить пациенту подкожно, внутрикожно, внутрь опухоли, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной или внутрилимфатической инъекции, или внутривентрикулярно. В одном из вариантов осуществления изобретения клеточные композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, предпочтительно

тительно вводят путем внутривенной инъекции.

Введение клеток или популяции клеток может заключаться во введении 10-10 клеток/кг веса тела, предпочтительно от 10 до 10 клеток/кг веса тела, включая все целочисленные количества клеток в указанных диапазонах. Клетки или популяцию клеток можно вводить в виде одной или нескольких доз. В другом варианте осуществления изобретения указанное эффективное количество клеток вводят в виде однократной дозы. В другом варианте осуществления изобретения указанное эффективное количество клеток вводят в виде более чем одной дозы в течение некоторого периода времени. График введения находится в компетенции лечащего врача и зависит от клинического состояния пациента. Клетки или популяцию клеток можно получать из любого источника, такого как банк крови или донор. Поскольку индивидуальные потребности варьируются, определение оптимальных диапазонов эффективных количеств рассматриваемого типа клеток для конкретного заболевания или состояний, находится в компетенции специалиста в данной области. Эффективное количество представляет собой количество, которое обеспечивает терапевтическое или профилактическое полезное действие. Вводимая доза должна зависеть от возраста, состояния здоровья и веса реципиента, вида одновременно применяемого лечения, если это имеет место, частоты обработки и природы требуемого действия.

В другом варианте осуществления изобретения клетки или композицию, содержащую эти клетки, вводят в указанном эффективном количестве парентерально. Указанное введение может представлять собой внутривенное введение. Указанное введение можно осуществлять непосредственно путем инъекции в опухоль.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетки вводят пациенту в сочетании с осуществлением (например, до, одновременно или после) любого количества соответствующих форм лечения, включая (но, не ограничиваясь только ими) лечение с помощью средств противовирусной терапии, таких как цидофовир и интерлейкин-2, цитарабин (известный также под названием ARA-C), или лечение натализумабом пациентов с MS, или лечение эфализумабом пациентов с псориазом, или другие виды лечения пациентов с PML (прогрессирующая многоочаговая лейкоэнцефалопатия). В других вариантах осуществления изобретения Т-клетки, предлагаемые в изобретении, можно применять в сочетании с химиотерапией, лучевой терапией, иммунодепрессантами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антителами или другими иммунодеструктивными агентами, такими как CAMPATH, антитела к CD3, или с другими видами терапии на основе антител, цитоксином, флударибином, циклоспорином, FK506, рапамицином, микофеноловой кислотой, стероидами, FR901228, цитокинами и облучением. Эти лекарственные средства ингибируют или кальций-зависимую фосфатазу, кальцинеурин (циклоспорин и FK506), или ингибируют киназу p70S6, которая важна для индуцируемой фактором роста передачи сигнала (рапамицин) (Henderson, Naya и др., 1991; Liu, Albers и др., 1992; Bieger, Hollander и др., 1993). В другом варианте осуществления изобретения клеточные композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, вводят пациенту в сочетании с (например, до, одновременно или после) трансплантацией костного мозга, Т-клеточной абляционной терапией с использованием либо химиотерапевтических средств, таких как флударабин, либо внешней лучевой терапии (XRT), циклофосфамида, либо антител, таких как OKT3 или CAMPATH. В другом варианте осуществления изобретения клеточные композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, вводят после осуществления В-клеточной абляционной терапии с использованием агентов, которые взаимодействуют с CD20, таких, например, как ритуксан. Например, в одном из вариантов осуществления изобретения индивидуумов можно подвергать стандартной обработке химиотерапевтическими средствами в высокой дозе с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В некоторых вариантах осуществления изобретения после трансплантации индивидуумам вводят путем инфузии размноженные иммунные клетки, предлагаемые в настоящем изобретении. В еще одном варианте осуществления изобретения размноженные клетки вводят до или после хирургического вмешательства.

Другие определения

Если специально не указано иное, то множественное число и единственное число и понятие "по меньшей мере один" используются взаимозаменяемо и означают "один" или "более чем один".

Аминокислотные остатки в полипептидной последовательности обозначают в настоящем описании с помощью однобуквенного кода, согласно которому, например, Q обозначает Gln или остаток глутамина, R обозначает Arg или остаток аргинина и D обозначает Asp или остаток аспарагиновой кислоты.

Аминокислотная замена обозначает замену одного аминокислотного остатка на другой, например, замена остатка аргинина на остаток глутамина в пептидной последовательности представляет собой аминокислотную замену.

Нуклеотиды обозначают следующим образом: однобуквенный код используют для обозначения основания нуклеозида: а обозначает аденин, t обозначает тимин, с обозначает цитозин и g обозначает гуанин. Для вырожденных нуклеотидов r обозначает g или a (пуриновые нуклеотиды), k обозначает g или t, s обозначает g или c, w обозначает a или t, m обозначает a или c, y обозначает t или c (пиримидиновые нуклеотиды), d обозначает g, a или t, v обозначает g, a или c, b обозначает g, t или c, h обозначает a, t или c и n обозначает g, a, t или c.

В контексте настоящего описания понятия "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотиды" относятся

к нуклеотидам и/или полинуклеотидам, таким как дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) или рибонуклеиновая кислота (РНК), олигонуклеотидам, фрагментам, созданным с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), и фрагментам, созданным путем лигирования, расщепления, обработки эндонуклеазами и обработки экзонуклеазами. Молекулы нуклеиновой кислоты могут состоять из мономеров, которые являются встречающимися в естественных условиях нуклеотидами (такими как ДНК или РНК) или аналогами встречающихся в естественных условиях нуклеотидов (например, энантиомерными формами встречающихся в естественных условиях нуклеотидов), или представляют собой их комбинацию. Модифицированные нуклеотиды могут иметь изменения в сахарных фрагментах и/или во фрагментах, содержащих пиримидиновые или пуриновые основания. Модификации сахаров включают, например, замену одной или нескольких гидроксильных групп на галогены, алкильные группы, амины и азидогруппы, или сахара могут быть функционализированы до простых или сложных эфиров. Кроме того, весь сахарный фрагмент может быть заменен стерически и электронно сходными структурами, такими как аза-сахара и карбоциклические аналоги сахаров. Примерами модификаций во фрагменте, представляющем собой основание, могут служить алкилированные пурины и пиримидины, ацилированные пурины или пиримидины или другие хорошо известные гетероциклические заместители. Мономеры нуклеиновой кислоты могут быть сшиты фосфодиэфирными связями или аналогами таких связей. Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными.

Под химерным антигенным рецептором (CAR) подразумевают молекулы, в которых объединен связывающий домен, направленный против компонента, присутствующего на клетке-мишени, например, присущую антителу специфичность в отношении требуемого антигена (например, опухолевого антигена), с активирующим Т-клеточный рецептор внутриклеточным доменом, в результате чего образуется химерный белок, обладающий специфической клеточной иммунной активностью в отношении мишени. Как правило, CAR состоит из внеклеточного одноцепочечного антитела (scFvFc), слитого с внутриклеточным сигнальным доменом дзета-цепи комплекса Т-клеточный антиген-рецептор (scFvFc:ζ), и при экспрессии в Т-клетках он обладает способностью переориентировать распознавание антигена на основе специфичности моноклонального антитела. Одним из примеров CAR, применяемого в настоящем изобретении, является CAR, направленный против антигена ROR1, и он может, например, содержать (но, не ограничиваясь только ими) аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 79-138.

Понятие "эндонуклеаза" относится к ферменту дикого типа или его варианту, обладающему способностью катализировать гидролиз (расщепление) связей между нуклеиновыми кислотами в молекуле ДНК или РНК, предпочтительно в молекуле ДНК. Эндонуклеазы не расщепляют молекулу ДНК или РНК независимо от ее последовательности, но они распознают и расщепляют молекулу ДНК или РНК в специфических полинуклеотидных последовательностях, в дальнейшем обозначенных как "последовательности-мишени" или "сайты-мишени". Эндонуклеазы можно классифицировать как редко расщепляющие эндонуклеазы, для которых, как правило, полинуклеотидный сайт распознавания имеет длину более 12 пар оснований (bp), более предпочтительно 14-55 пар оснований. Редко расщепляющие эндонуклеазы значительно повышают гомологичную рекомбинацию (HR), индуцируя двухцепочечные разрывы ДНК (DSB) в определенном локусе (Perrin, Buckle и др., 1993; Rouet, Smih и др., 1994; Choulila, Perrin и др., 1995; Pingoud и Silva, 2007). Редко расщепляющие эндонуклеазы могут представлять собой, например, хоминг-эндонуклеазу (Paques и Duchateau, 2007), химерную нуклеазу с "цинковыми пальцами" (ZFN), образованную слиянием сконструированных доменов "цинковых пальцев" с каталитическим доменом рестриктазы, такой как FokI (Porteus и Carroll, 2005), эндонуклеазу Cas9 из системы CRISPR (Gasiunas, Barrangou и др., 2012; Jinek, Chylinski и др., 2012; Cong, Ran и др., 2013; Mali, Yang и др., 2013) или химическую эндонуклеазу (Eisenschmidt, Lanio и др., 2005; Arimondo, Thomas и др., 2006). В химических эндонуклеазах химический или пептидный расщепляющий компонент конъюгируют либо с полимером нуклеиновой кислоты, либо с другой ДНК, распознающей специфическую последовательность-мишень, тем самым обеспечивая направление расщепляющей активности на специфическую последовательность. Химические эндонуклеазы включают также синтетические нуклеазы типа конъюгатов ортофенантролина, ДНК-расщепляющей молекулы и триплекс-образующих олигонуклеотидов (TFO), которые, как известно, связываются со специфическими последовательностями ДНК (Kalish и Glazer, 2005). Такие химические эндонуклеазы подпадают под понятие "эндонуклеазы" в контексте настоящего изобретения.

Под "TALE-нуклеазой" (TALEN) понимают слитый белок, который состоит из связывающего нуклеиновую кислоту домена, как правило, происходящего из подобного активатору транскрипции фактора (TALE), и одного нуклеазного каталитического домена для расщепления последовательности нуклеиновой кислоты-мишени. Каталитический домен предпочтительно представляет собой нуклеазный домен и более предпочтительно домен, обладающий эндонуклеазной активностью, например, типа I-TevI, ColE7, NucA и Fok-I. В конкретном варианте осуществления изобретения домен TALE может быть слит с мегануклеазой, например, типа I-CreI и I-OnuI, или ее функциональным вариантом. В более предпочтительном варианте осуществления изобретения указанная нуклеаза представляет собой мономерную TALE-нуклеазу. Мономерная TALE-нуклеаза представляет собой TALE-нуклеазу, которая не требует димеризации для специфического распознавания и расщепления, например, в виде слияний сконструированных повторов TAL с каталитическим доменом I-TevI, описанным в WO 2012/138927. Подобные

активатору транскрипции эффекторы (TALE) представляют собой белки из видов бактерий рода *Xanthomonas*, содержащие несколько повторяющихся последовательностей, где каждый повтор содержит ди-остатки (двойные остатки) в положениях 12 и 13 (RVD), обладающие специфичностью в отношении каждого нуклеотидного основания последовательности нуклеиновой кислоты-мишени. Связывающие домены, обладающие сходными модульными свойствами связывания нуклеиновых кислот по типу основание-с основанием ("base-per-base") (MBBBD) могут быть получены также из новых модульных белков, недавно обнаруженных заявителями в различных видах бактерий. Преимущество новых модульных белков заключается в том, что они характеризуются большей вариабельностью последовательности, чем TALE-повторы. Предпочтительно RVD, ассоциированные с распознаванием различных нуклеотидов, представляют собой HD для распознавания C, NG для распознавания T, NI для распознавания A, NN для распознавания G или A, NS для распознавания A, C, G или T, HG для распознавания T, IG для распознавания T, NK для распознавания G, HA для распознавания C, ND для распознавания C, HI для распознавания C, HN для распознавания G, NA для распознавания G, SN для распознавания G или A и YG для распознавания T, TL для распознавания A, VT для распознавания A или G и SW для распознавания A. В другом варианте осуществления изобретения имеющее решающее значение аминокислоты 12 и 13 можно изменять путем мутации на другие аминокислотные остатки для модуляции их специфичности в отношении нуклеотидов A, T, C и G и, прежде всего, для повышения их специфичности. Ранее уже была описана TALE-нуклеаза, и ее применяют для стимуляции генного нацеливания и генных модификаций (Boch, Scholze и др., 2009; Moscou и Bogdanove, 2009; Christian, Cermak и др., 2010; Li, Huang и др., 2011). Сконструированные TALE-нуклеазы поступают в продажу под товарным знаком TALEN (фирма Cellectis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013, Париж, Франция).

Редко расщепляющая эндонуклеаза, предлагаемая в настоящем изобретении, может представлять собой также эндонуклеазу Cas9. В последние годы был разработан новый инструмент для генетической инженерии на основе РНК-направляемой нуклеазы Cas9 (Gasiunas, Barrangou и др., 2012; Jinek, Chylinski и др., 2012; Cong, Ran и др., 2013; Mali, Yang и др., 2013) из адаптивной иммунной системы CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (Clustered Regularly Interspaced Short palindromic Repeats)) типа II прокариот (см. обзор Sorek, Lawrence и др., 2013). CRISPR-ассоциированная (Cas) система впервые была обнаружена в бактериях, и ее функция состоит в защите от чужой вирусной или плазмидной ДНК. При осуществлении опосредуемой CRISPR генетической инженерии сначала проводят отбор последовательности-мишени, часто фланкированной короткой последовательностью мотива, который обозначают как примыкающий к протоспейсеру мотив (PAM). После отбора последовательности-мишени конструируют специфическую sgРНК (CRISPR-РНК), комплементарную указанной последовательности-мишени. Для систем CRISPR типа II требуется транскрибирующая tracrРНК (tracrРНК), спаренная с crRNA и связанная с внесенным белком Cas9. Cas9 функционирует в качестве молекулярного якоря, облегчающего спаривание оснований tracrРНК с crРНК (Deltcheva, Chylinski и др., 2011). В этом тройном комплексе двойная структура tracrРНК:crРНК функционирует в качестве направляющей РНК, которая направляет эндонуклеазу Cas9 к когнатной последовательности-мишени. Распознавание мишени комплексом Cas9-tracrРНК:crРНК иницируется путем сканирования последовательности-мишени для обнаружения гомологии между последовательностью-мишенью и crРНК. Помимо комплементарности последовательности-мишени и crРНК, нацеливание ДНК требует присутствия короткого мотива, примыкающего к протоспейсеру (примыкающий к протоспейсеру мотив - PAM). После спаривания двойной РНК и последовательности-мишени Cas9 интродуцирует "тупой" двухцепочечный разрыв на расстоянии 3 пар оснований в обратном направлении относительно мотива PAM (Garneau, Dupuis и др., 2010).

Редко расщепляющая эндонуклеаза может представлять собой хоминг-эндонуклеазу, также известную под названием мегануклеаза. Такие хоминг-эндонуклеазы хорошо известны в данной области (Stoddard, 2005). Хоминг-эндонуклеазы распознают последовательность ДНК-мишени и создают одноцепочечный или двухцепочечный разрыв. Хоминг-эндонуклеазы обладают высокой специфичностью, распознавая сайты ДНК-мишени длиной от 12 до 45 пар оснований (bp), как правило, длиной от 14 до 40 пар оснований. Хоминг-эндонуклеаза, предлагаемая в изобретении, может соответствовать, например, эндонуклеазе LAGLIDADG, эндонуклеазе HNH или эндонуклеазе GIY-YIG. Предпочтительно хоминг-эндонуклеаза, предлагаемая в настоящем изобретении, может представлять собой вариант I-CreI.

Под "вектором для доставки" или "векторами для доставки" понимают любой доставляющий вектор, который можно применять согласно настоящему изобретению для приведения в контакт с клеткой (т.е. для "контактирования") или доставки внутрь клетки или в субклеточные компартменты (т.е. для "интродукции") агентов/химических веществ и молекул (белков или нуклеиновых кислот), требующихся для осуществления настоящего изобретения. К ним относятся (но, не ограничиваясь только ими) липосомальные векторы для доставки, вирусные векторы для доставки, векторы для доставки лекарственного средства, химические носители, полимерные носители, липоплексы, полиплексы, дендримеры, микропузырьки (ультразвуковые контрастные агенты), наночастицы, эмульсии или другие пригодные векторы для переноса. Такие векторы для доставки позволяют доставлять молекулы, химические вещества, макромолекулы (гены, белки) или другие векторы, такие как плазмиды, пептиды, разработанные фирмой

Diatos. В этих случаях векторы для доставки представляют собой молекулы-носители. Под "вектором для доставки" или "векторами для доставки" понимают также методы доставки, предназначенные для осуществления трансфекции.

Понятия "вектор" или "векторы" относятся к молекуле нуклеиновой кислоты, обладающей способностью транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она сцеплена. К "векторам", применяемым согласно настоящему изобретению, относятся (но, не ограничиваясь только ими) вирусный вектор, плазида, РНК-вектор или молекула линейной или кольцевой ДНК или РНК, которые могут состоять из хромосомальных, нехромосомальных, полусинтетических или синтетических нуклеиновых кислот. Предпочтительными векторами являются векторы, которые способны автономно реплицировать (эписомальный вектор) и/или экспрессировать нуклеиновые кислоты, с которыми они сцеплены (экспрессионные векторы). Специалистам в данной области известно большое количество пригодных векторов, которые поступают в продажу.

К вирусным векторам относятся ретровирус, аденовирус, парвовирус (например, аденоассоциированный вирус), коронавирусы, РНК-вирусы с негативной цепью, такие как ортомиксовирус (например, вирус гриппа), рабдовирус (например, вирус бешенства и вирус везикулярного стоматита), парамиксовирус (например, вирус кори и вирус Сендай), РНК-вирусы с позитивной цепью, такие как пикорнавирус и альфавирус, и вирусы с двухцепочечной ДНК, включая аденовирус, вирус герпеса (например, вирус герпеса простого типов 1 и 2, вирус Эпштейна-Барра, цитомегаловирус) и вирус оспы (например, вирус коровьей оспы, вирус оспы птиц и вирус оспы канарейки). Другие вирусы включают, например, вирус Норвалк, тогавирус, флавивирус, реовирусы, паповирус, гепаднавирус и вирус гепатита. Примерами ретровирусов являются: вирус птичьего лейкоза-саркомы, вирусы млекопитающих С-типа, В-типа, вирусы D-типа, группа HTLV-BLV, лентивирус, спумавирус (Coffin J. M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, в: *Fundamental Virology*, 3-е изд., под ред. B. N. Fields и др., изд-во Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996).

Под "лентивирусным вектором" подразумевают лентивирусные векторы на основе ВИЧ, которые являются очень перспективными с точки зрения доставки гена благодаря их относительно большой способности к упаковке, пониженной иммуногенности и их способности стабильно транслировать с высокой эффективностью большой спектр различных типов клеток. Лентивирусные векторы, как правило, создают посредством кратковременной трансфекции клеток-продуцентов тремя (упаковывающая плазида, оболочечная плазида и плазида переноса) или большим количеством плазмид. Подобно ВИЧ, лентивирусные векторы проникают в клетку-мишень посредством взаимодействия гликопротеинов вирусной поверхности с рецепторами на клеточной поверхности. После проникновения вирусная РНК подвергается обратной транскрипции, опосредуемой комплексом вирусной обратной транскриптазы. Продуктом обратной транскрипции является двухцепочечная линейная вирусная ДНК, которая служит субстратом для вирусной интеграции в ДНК инфицированных клеток. Понятие "интегрирующие лентивирусные векторы (или LV)" обозначает, например (но, не ограничиваясь только ими), такие векторы, которые способны интегрироваться в геном клетки-мишени. В противоположность этому, понятие "неинтегрирующие лентивирусные векторы (или NILV)" обозначает эффективные векторы для доставки генов, которые не интегрируются в геном клетки-мишени под действием вирусной интегразы.

Векторы для доставки и векторы можно объединять или комбинировать с любыми методами точечной пермеабиллизации, такими как сонопорация или электропорация, или вариантами этих методов.

Под клеткой или клетками подразумевают любые эукариотические живые клетки, первичные клетки и клеточные линии, выведенные из указанных организмов для получения культур *in vitro*.

Под "первичной клеткой" или "первичными клетками" подразумевают клетки, взятые непосредственно из живой ткани (т.е. материал, полученный путем биопсии) и подготовленные для выращивания *in vitro*, в популяции которых имело место лишь небольшое количество удвоений, и, следовательно, они являются более репрезентативными с точки зрения основных функциональных компонентов и характеристик тканей, из которых они происходят, по сравнению с непрерывно поддерживаемыми или искусственно иммортализованными онкогенными клеточными линиями.

Примерами таких клеточных линий могут являться (но, не ограничиваясь только ими) клеточные линии, выбранные из группы, состоящей из клеток линии CHO-K1; клеток линии HEK293; клеток линии Caco2; клеток линии U2-OS; клеток линии NIH 3T3; клеток линии NSO; клеток линии SP2; клеток линии CHO-S; клеток линии DG44; клеток линии K-562, клеток линии U-937; клеток линии MRC5; клеток линии IMR90; клеток линии Jurkat; клеток линии HepG2; клеток линии HeLa; клеток линии HT-1080; клеток линии HCT-116; клеток линии Hu-h7; клеток линии Huvex; клеток линии Molt 4.

Все эти клеточные линии можно модифицировать с помощью способа, предлагаемого в настоящем изобретении, создавая модели клеточных линий для получения, экспрессии, количественной оценки, обнаружения, изучения представляющего интерес гена или белка; эти модели можно применять также для скрининга представляющих интерес биологически активных молекул для исследовательских и промышленных целей в различных областях, например, таких как (но, не ограничиваясь только ими) химия, биотопливо, терапевтические средства и агрономия.

Под "мутацией" подразумевают замену, делецию или инсерцию одного/одной, двух, трех, четырех,

пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати, тринадцати, четырнадцати, пятнадцати, двадцати, двадцати пяти, тридцати, сорока, пятидесяти или большего количества нуклеотидов/аминокислот в полинуклеотидной (кДНК, ген) или полипептидной последовательности. Мутация может влиять на кодирующую последовательность гена или его регуляторную последовательность. Она может влиять также на структуру геномной последовательности или структуру/стабильность кодируемой мРНК.

Под "вариантом(ами)" подразумевают вариант повтора, вариант, ДНК-связывающий вариант, вариант TALE-нуклеазы, вариант полипептида, полученный в результате мутации или замены по меньшей мере одного остатка в аминокислотной последовательности родительской молекулы.

Под "функциональным вариантом" подразумевают обладающий каталитической активностью мутант белка или домена белка; такой мутант может обладать такой же активностью, что и родительский белок или домен белка, или дополнительными свойствами, или более высокой или более низкой активностью.

Понятие "идентичность" относится к идентичности последовательностей двух молекул нуклеиновых кислот или полипептидов. Идентичность можно оценивать путем сравнения положений в каждой из последовательностей, которые можно выравнивать для целей сравнения. Если положение в сравниваемой последовательности занято тем же самым основанием, то молекулы являются идентичными в этом положении. Степень сходства или идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями является функцией количества идентичных или совпадающих нуклеотидов в положениях нуклеотидных последовательностей. Для расчета идентичности двух последовательностей можно использовать различные алгоритмы и/или программы сравнительного анализа первичной структуры последовательностей, включая FASTA или BLAST, которые доступны в виде компонента пакета программ анализа последовательностей GCG (Университет Висконсина, Мэдисон, шт. Висконсин), и их можно применять, например, с использованием задаваемых по умолчанию параметров. Например, можно рассматривать полипептиды, обладающие идентичностью, составляющей по меньшей мере 70, 85, 90, 95, 98 или 99%, с конкретными полипептидами, представленными в настоящем описании, и предпочтительно обладающие практически такими же функциями, а также полинуклеотиды, кодирующие такие полипептиды. Если не указано иное, определение степени сходства базируется на применении матрицы BLOSUM62. При использовании BLASTP процент сходства основан на рассчитанном программой BLASTP балле положительных оценок, а процент идентичности последовательностей основан на рассчитанном BLASTP балле идентичности. Рассчитанные с помощью BLASTP "идентичности" представляют собой количество и пропорцию идентичных остатков относительно общего количества остатков в парах последовательностей с высокими баллами; а рассчитанные с помощью BLASTP "положительные оценки" представляют собой количество и пропорцию остатков, для которых полученные при сравнительном анализе первичной структуры последовательностей баллы являются положительными, и которые сходны друг с другом. В настоящей заявке предложены и подпадают под объем изобретения аминокислотные последовательности, имеющие указанные степени идентичности или сходства, или любую промежуточную степень идентичности или сходства с представленными в настоящем описании аминокислотными последовательностями. Полинуклеотидные последовательности сходных полипептидов выводят с использованием генетического кода и их можно получать с помощью общепринятых методов, в частности, путем обратной трансляции их аминокислотных последовательностей с использованием генетического кода.

Понятия "домен трансдукции сигнала" или "костимуляторный лиганд" относятся к молекуле на антигенпрезентирующей клетке, которая специфически связывается с когнатной костимуляторной молекулой на Т-клетке, обеспечивая тем самым сигнал, который в дополнение к первичному сигналу, обеспечиваемому, например, связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой ГКГС, загруженной пептидом, опосредует Т-клеточный ответ, включая (но, не ограничиваясь только ими) активацию пролиферации, дифференцировку и т.п. Костимуляторным лигандом могут служить (но, не ограничиваясь только ими) CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, индуцибельный костимуляторный лиганд (ICOS-L), молекула межклеточной адгезии (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, рецептор лимфотоксина бета, 3/TR6, ILT3, ILT4, агонист или антитело, который/которое связывается с лигандом Толл-рецептора, и лиганд, который специфически связывается с B7-H3. Костимуляторный лиганд включает также, среди прочего, антитело, которое специфически связывается с костимуляторной молекулой, присутствующей на Т-клетке, такой как (но, не ограничиваясь только ими) CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, ассоциированный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, лиганд, который специфически связывается с CD83.

Понятие "костимуляторная молекула" относится к когнатному связывающему партнеру на Т-клетке, который специфически связывается с костимуляторным лигандом, опосредуя тем самым костимуляторный ответ клетки, такой как (но, не ограничиваясь только им) пролиферация. Костимуляторные молекулы включают (но, не ограничиваясь только ими) молекулу ГКГС класса I, BTLA и лиганд Толл-рецептора.

В контексте настоящего описания понятие "костимуляторный сигнал" относится к сигналу, кото-

рый в сочетании с первичным сигналом, таким как сигнал, обусловленный сцеплением TCR/CD3, приводит к пролиферации Т-клеток и/или повышающей или понижающей регуляции имеющих решающее значение молекул.

В контексте настоящего описания понятие "внеклеточный лигандсвязывающий домен" обозначает олиго- или полипептид, который обладает способностью связываться с лигандом. Предпочтительно домен должен обладать способностью взаимодействовать с молекулой клеточной поверхности. Например, можно выбирать внеклеточный лигандсвязывающий домен для распознавания лиганда, который функционирует в качестве маркера клеточной поверхности на клетках-мишенях, ассоциированных с конкретным болезненным состоянием. Так, примерами маркеров клеточной поверхности, которые могут функционировать в качестве лигандов, являются маркеры, ассоциированные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями, аутоиммунным заболеванием и раковыми клетками.

В контексте настоящего описания понятие "индивидуум" или "пациент" включает всех представителей царства животных, в том числе приматов кроме человека и человека.

В представленном выше описании изобретения изложены подход и способ его осуществления и применения, так что любой специалист в данной области способен осуществлять и применять его, эта возможность относится, прежде всего, к сущности изобретения, изложенной в прилагаемой формуле изобретения, которая представляет собой составную часть исходного описания.

Если в настоящем описании указаны численные пределы или численный диапазон, то они включают их границы. Кроме того, считается, что включены все значения и поддиапазоны, находящиеся в указанных пределах или указанном численном диапазоне, как если бы они были специально указаны.

Приведенное выше описание представлено для того, чтобы дать возможность специалисту в данной области осуществлять и применять изобретение, и оно изложено в контексте конкретного применения и требуемых для этого условий. Специалистам в данной области должны быть очевидны различные модификации предпочтительных вариантов осуществления изобретения, и общие принципы, указанные в нем могут быть применены для других вариантов осуществления изобретения и применений без отклонения от сущности и объема изобретения. Таким образом, не следует считать, что настоящее изобретение ограничено представленными вариантами осуществления изобретения, напротив, оно соответствует наиболее широкому объему, согласующемуся с принципами и отличительными признаками, указанными в настоящем описании.

Имея общее описание настоящего изобретения, можно достичь более полного понимания после ознакомления с некоторыми конкретными примерами, которые представлены в настоящем описании только для целей иллюстрации и не направлены на ограничение объема, если специально не указано иное.

Общий метод

Первичные клетки

Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности из лейкоцитарных пленок, полученных от здоровых доноров (Французская Государственная служба крови, Etablissement Francais du Sang). Затем Т-лимфоциты очищали с использованием набора для обогащения человеческих Т-клеток EasySep (фирма Stemcell Technologies) и активированных гранул Dynabeads® с активатором человеческих Т-клеток CD3/CD28 (фирма Life Technologies) в среде X-vivo 15 (фирма Lonza), дополненной 20 нг/мл IL-2 (фирма Miltenyi) и 5% человеческой сыворотки группы АВ (фирма Seralab).

Клеточные линии

Клеточные линии K562, Jeko-1, MDA-MB-231, PC-3 и MCF-7 получали из Американской коллекции типовых культур. Клетки линии K562 культивировали в среде IMDM, дополненной 10% инактивированной тепловой обработкой FCS, 2 ммоль/л L-глутамина и 100 ед/мл пенициллина, и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки линии Jeko-1 культивировали в среде RPMI 1640, дополненной 20% инактивированной тепловой обработкой FCS, 2 ммоль/л L-глутамина и 100 ед/мл пенициллина, и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки линии MDA-MB-231 культивировали в среде DMEM, дополненной 10% инактивированной тепловой обработкой FCS, 2 ммоль/л L-глутамина и 100 ед/мл пенициллина, и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки линии PC-3 культивировали в среде F-12K, дополненной 10% инактивированной тепловой обработкой FCS, 2 ммоль/л L-глутамина и 100 ед/мл пенициллина, и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки линии MCF-7 культивировали в среде DMEM, дополненной 10% инактивированной тепловой обработкой FCS, 2 ммоль/л L-глутамина и 100 ед/мл пенициллина, и 100 мкг/мл стрептомицина, и 0,01 мг/мл человеческого инсулина.

Количественная оценка экспрессии ROR1 на клеточной поверхности

Количество молекул ROR1 на поверхности различных человеческих клеточных линий определяли на основе насыщающего связывания с использованием клона 2А моноклонального антитела к ROR1 (фирма Miltenyi) и набора Dako QIFIKIT согласно инструкциям производителя.

Синтез ДНК, кодирующей scCAR

ДНК, кодирующую scCAR, синтезировали на фирме GenScript.

Конструирование векторов для транскрипции mPHK scCAR in vitro

ДНК, кодирующую scCAR, клонировали в плазмиде pCLS9632 между промотором T7 и поли-А

BGN.

Транскрипция РНК in vitro

мРНК, кодирующую scCAR транскрибировали и полиаденилировали in vitro с использованием набора mMessage mMachine T7 Ultra (фирма Life technologies) согласно инструкциям производителя. РНК очищали на колонках RNeasy (фирма Qiagen), элюировали в среду Т для электропорации ex vivo и in vivo (цитопорации) (фирма Harvard Apparatus), и количественно оценивали на основе измерения абсорбции при 260 нм с помощью спектрофотометра Nanodrop ND-1000. Качество РНК проверяли на денатурирующем содержащем формальдегид/MOPS агарозном геле.

Перенос РНК путем электропорации в Т-клетки

Через 4-5 или 11-12 дней после активации Т-лимфоциты трансфектировали путем электропереноса матричной РНК с использованием системы AgilePulse MAX (фирма Harvard Apparatus). $1,5 \times 10^6$ клеток смешивали с 15 мкг мРНК, кодирующей scCAR, в кювете размером 0,4 см. Электропорацию осуществляли согласно протоколу, описанному в WO 2013/176915. После электропорации клетки разводили в культуральной среде и инкубировали при 37°C/5% CO₂.

Обнаружение scCAR

С помощью проточной цитометрии: Т-клетки окрашивали меченными РЕ поликлональными козьими антителами к мышинному (Fab)₂ (фирма Jackson Immunoresearch) или меченным биотином белком L (фирма GenScript), а затем меченным фикоэритрином стрептавидином (фирма BD Pharmingen), и, наконец, анализировали с использованием проточного цитометра MACSQuant (фирма Miltenyi).

С помощью вестерн-блоттинга: 1×10^6 Т-клеток лизировали в 50 мкл буфера RIPA, содержащего 1мМ ортованадат, 3 мкг/мл ингибитора протеаз и 2мМ PMSF. Клеточные лизаты разделяли с помощью ДСН-ПААГ на акриламидном геле Any kD™ (фирма BioRad). После переноса на нитроцеллюлозную мембрану продукт инкубировали с мышинным антителом к человеческому CD3z (фирма Pharmingen) и затем с козьим антителом к мышинному IgG, конъюгированным с пероксидазой из хрена (фирма Sigma). Связывание антитела выявляли с использованием набора ECL (фирма Pierce).

Анализ дегрануляции

5×10^4 Т-клеток совместно культивировали с 5×10^4 ROR1-позитивных или ROR1-негативных клеток в объеме 0,1 мл на лунку в 96-луночном планшете. При начале совместного культивирования добавляли меченное APC антитело к CD107a (фирма BD Biosciences) помимо 1 мкг/мл антитела к CD49d (фирма BD Biosciences), 1 мкг/мл антитела к CD28 (фирма Miltenyi) и 1-кратного раствора Monensin (фирма eBioscience). После инкубации в течение 6 ч клетки окрашивали фиксирующим витальным красителем (фирма eBioscience) и меченным красителем VioBlue антителом к CD8 (фирма Miltenyi) и анализировали с использованием проточного цитометра MACSQuant (фирма Miltenyi). Цитотоксические Т-клетки на стадии дегрануляции представляют собой CD8⁺CD107a⁺-клетки.

Анализ высвобождения цитокинов

5×10^4 Т-клеток совместно культивировали с 5×10^4 ROR1-позитивных или ROR1-негативных клеток в объеме 0,1 мл на лунку в 96-луночном планшете.

После инкубации в течение 24 ч супернатанты культуры собирали и анализировали в отношении IFN γ ROR1-позитивных или ROR1-негативных клеток.

Анализ цитотоксичности

Для прикрепившихся клеток-мишеней: 2×10^4 ROR1-позитивных или ROR1-негативных клеток высевали в объеме 0,1 мл на лунку в 96-луночный планшет. Через день после посева ROR1-позитивные и ROR1-негативные клетки метили с помощью CellTrace CFSE и совместно культивировали с 4×10^5 Т-клеток в течение 4 ч. Затем клетки собирали, окрашивали фиксирующим витальным красителем (фирма eBioscience) и анализировали с использованием проточного цитометра MACSQuant (фирма Miltenyi).

Процент специфического лизиса рассчитывали с использованием следующей формулы:

$$\% \text{ лизиса клеток} = 100 - \frac{\% \text{ жизнеспос. клеток-мишеней после совм. культивир. с модифициров. CAR Т-клетками}}{\% \text{ жизнеспос. контрольных клеток после совм. культивир. с немодифициров. CAR Т-клетками}}$$

Для клеток-мишеней, находящихся в суспензии: ROR1-позитивные и ROR1-негативные клетки метили с помощью CellTrace CFSE и CellTrace Violet соответственно. Примерно 2×10^4 ROR1-позитивных клеток совместно культивировали с 2×10^4 ROR1-негативных клеток с 4×10^5 Т-клеток в объеме 0,1 мл на лунку в 96-луночном планшете. После инкубации в течение 4 ч клетки собирали, окрашивали фиксирующим витальным красителем (фирма eBioscience) и анализировали с использованием проточного цитометра MACSQuant (фирма Miltenyi).

Процент специфического лизиса рассчитывали с использованием приведенной выше формулы.

Примеры

Примеры полипептидных последовательностей CAR

Ниже представлены последовательности SEQ ID NO: 79-138 (с пептидными сигнальными последовательностями) 60 scCAR ROR1. Эти CAR имеют архитектуру VI-V6 и scFv из 8 различных антител: 2A2, 4A5, D10, G6, G3, H10, 2A4 и 1C11.

Версии V1, V3 и V5 (scCAR с трансмембранным доменом CD8 α) анализировали в описанных ниже экспериментах за исключением scCAR с scFv 2A2, для которого тестировали только версию V1 (в качестве эталона для сравнения), он имел структуру, которая описана у Hudsek с соавторами (2013).

Последовательности, заключенные в рамку, соответствуют предпочтительным последовательностям VH и VL. Однако, VH и VL можно заменять для повышения эффективности CAR согласно изобретению.

2A2 v1 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 79)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFS~~SDYE~~
 MHWVIQTPVHGLEWIGAIIDPETGGTAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLT
 SEDSAVYYCTGYDYDSFTYWGQGLTVTSA)GGGGSGGGSGGGGS)DIVMTQ
 SQKIMSTTVGDRVSITCKASQNVDAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVP
 DRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYDIYPYTFGGGTKEIKGLAVSTI
 SSFFPPGYQIYIWAFLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
 QEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
 VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
 HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

2A2 v2 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 80)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFS~~SDYE~~
 MHWVIQTPVHGLEWIGAIIDPETGGTAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLT
 SEDSAVYYCTGYDYDSFTYWGQGLTVTSA)GGGGSGGGSGGGGS)DIVMTQ
 SQKIMSTTVGDRVSITCKASQNVDAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVP
 DRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYDIYPYTFGGGTKEIKGLAVSTI
 SSFFPPGYQIISFFLALTSTALLFLFFLTLRFVSVKGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
 TQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
 DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
 GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

2A2 v3 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 81)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFS~~SDYE~~
 MHWVIQTPVHGLEWIGAIIDPETGGTAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLT
 SEDSAVYYCTGYDYDSFTYWGQGLTVTSA)GGGGSGGGSGGGGS)DIVMTQ
 SQKIMSTTVGDRVSITCKASQNVDAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVP
 DRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYDIYPYTFGGGTKEIKITTPAPR
 PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLS
 LVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSR
 SADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
 YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
 PR

2A2 v4 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 82)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFS~~SDYE~~
 MHWVIQTPVHGLEWIGAIIDPETGGTAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMEIRSLT
 SEDSAVYYCTGYDYDSFTYWGQGLTVTSA)GGGGSGGGSGGGGS)DIVMTQ
 SQKIMSTTVGDRVSITCKASQNVDAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVP
 DRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYDIYPYTFGGGTKEIKITTPAPR
 PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIISFFLALTSTALLFLFF
 LTLRFVSVKGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFS
 RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
 YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
 LPPR

2A2 v5 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 83)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFS~~SDYE~~
 MHWVIQTPVHGLEWIGAIIDPETGGTAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLT
 SEDSAVYYCTGYDYDSFTYWGQGLTVTSA)GGGGSGGGSGGGGS)DIVMTQ
 SQKIMSTTVGDRVSITCKASQNVDAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVP
 DRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYDIYPYTFGGGTKEIK)EPKSPDK
 THTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIAITPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALP
 APIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGKIYIWAFLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
 TQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY

DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

2A2 v6 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 84)

MALPVTALLPLALLHAARP[VQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFS~~DYE~~
[MHWVIQTPVHGLEWIGAI~~PETGGTAYNQKFKGKALTADKSSSTAYMELRSLT~~
[SEDSAVYYCTGYDYDSFTYWGQGLTVSA]GGGSGGGSGGGGS[DIVMTQ
[SQKIMSTTVGDRVSITCKASQNVDAVAWYQOKPGQSPKLLIYASNRYTGVP
[DRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYDIYPYTFGGGKLEIK]EPKSPDK
THTCPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGKIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ
TTQEEDGDCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

4A5 v1(SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 85)

MALPVTALLPLALLHAARP[EVLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYA
[MSWVRQIPEKRLEWVASISRG~~TTYYPDSVKGRFTISRDNVRNILYLQMSSLRS~~
[EDTAMYYCGRYDYDGY~~YAMDYWGQGTSVTVSS~~]GGGSGGGSGGGGS[DIK
[MTQSPSSMYASLGERVTITCKASPDINSYLSWFQOKPGKSPKTLIYRANRLVDG
[VPSRFGGGSGQDYSLTINSLEYEDMGIYYCLQYDEFPTYTFGGGKLEMK]GLAV
STISSFFPPGYQIYIWA~~PLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ~~
TTQEEDGDCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

4A5 v2 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 86)

MALPVTALLPLALLHAARP[EVLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYA
[MSWVRQIPEKRLEWVASISRG~~TTYYPDSVKGRFTISRDNVRNILYLQMSSLRS~~
[EDTAMYYCGRYDYDGY~~YAMDYWGQGTSVTVSS~~]GGGSGGGSGGGGS[DIK
[MTQSPSSMYASLGERVTITCKASPDINSYLSWFQOKPGKSPKTLIYRANRLVDG
[VPSRFGGGSGQDYSLTINSLEYEDMGIYYCLQYDEFPTYTFGGGKLEMK]GLAV
STISSFFPPGYQIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPV
QTTQEEDGDCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG
KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

4A5 v3 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 87)

MALPVTALLPLALLHAARP[EVLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYA
[MSWVRQIPEKRLEWVASISRG~~TTYYPDSVKGRFTISRDNVRNILYLQMSSLRS~~
[EDTAMYYCGRYDYDGY~~YAMDYWGQGTSVTVSS~~]GGGSGGGSGGGGS[DIK
[MTQSPSSMYASLGERVTITCKASPDINSYLSWFQOKPGKSPKTLIYRANRLVDG
[VPSRFGGGSGQDYSLTINSLEYEDMGIYYCLQYDEFPTYTFGGGKLEMK]TTTP
APRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA~~PLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGDCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK~~
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

4A5 v4 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 88)

MALPVTALLPLALLHAARP[EVLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYA
[MSWVRQIPEKRLEWVASISRG~~TTYYPDSVKGRFTISRDNVRNILYLQMSSLRS~~
[EDTAMYYCGRYDYDGY~~YAMDYWGQGTSVTVSS~~]GGGSGGGSGGGGS[DIK
[MTQSPSSMYASLGERVTITCKASPDINSYLSWFQOKPGKSPKTLIYRANRLVDG
[VPSRFGGGSGQDYSLTINSLEYEDMGIYYCLQYDEFPTYTFGGGKLEMK]TTTP
APRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGDCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

4A5 v5 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 89)

MALPVTALLPLALLHAARP[EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYA]
 MSWVRQIPEKRLEWVASISRGGTTYYPDSVKGRFTISRDNVRNILYLQMSSLRS
 EDTAMYYCGRYDYGYYAMDYWGQGTSTVTVSSGGGSGGGSGGGGS[DIK]
 MTQSPSSMYASLGERVTITCKASPDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDG
 VPSRFSGGSGQDYSLTINSLEYEDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEMK]EPKS
 PDKTHTCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHN
 HYTKQSLSLSPGKIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRP
 VQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
 EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
 RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

4A5 v6 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 90)

MALPVTALLPLALLHAARP[EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYA]
 MSWVRQIPEKRLEWVASISRGGTTYYPDSVKGRFTISRDNVRNILYLQMSSLRS
 EDTAMYYCGRYDYGYYAMDYWGQGTSTVTVSSGGGSGGGSGGGGS[DIK]
 MTQSPSSMYASLGERVTITCKASPDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDG
 VPSRFSGGSGQDYSLTINSLEYEDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEMK]EPKS
 PDKTHTCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
 ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHN
 HYTKQSLSLSPGKIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMR
 PVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
 REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
 RRKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

D10 v1 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 91)

MALPVTALLPLALLHAARP[QVQLKESGPGLVAPSQTLSTCTVSGFSLTSYGV]
 HWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGFTNYSALKSRLSISKDNSKSQVLLKMTSLQT
 DDTAMYYCARRGSSYSMDYWGQGTSTVTVSSGGGSGGGSGGGGS[EIVLSQS]
 PAITAASLGQKVTITCSASSNVSYIHWYQQRSGTSPRPWIYEISKLASGVPVRFSG
 SGSGTSYSLTISSMEAEDAAIYYCQQWNYPLITFGSGTKLEIQ]GLAVSTISSFFPP
 GYQIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG
 CSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
 RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY
 QGLSTATKDTYDALHMQALPPR

D10 v2 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 92)

MALPVTALLPLALLHAARP[QVQLKESGPGLVAPSQTLSTCTVSGFSLTSYGV]
 HWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGFTNYSALKSRLSISKDNSKSQVLLKMTSLQT
 DDTAMYYCARRGSSYSMDYWGQGTSTVTVSSGGGSGGGSGGGGS[EIVLSQS]
 PAITAASLGQKVTITCSASSNVSYIHWYQQRSGTSPRPWIYEISKLASGVPVRFSG
 SGSGTSYSLTISSMEAEDAAIYYCQQWNYPLITFGSGTKLEIQ]GLAVSTISSFFPP
 GYQIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED
 GCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
 RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL
 YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

D10 v3 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 93)

MALPVTALLPLALLHAARP[QVQLKESGPGLVAPSQTLSTCTVSGFSLTSYGV]
 HWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGFTNYSALKSRLSISKDNSKSQVLLKMTSLQT
 DDTAMYYCARRGSSYSMDYWGQGTSTVTVSSGGGSGGGSGGGGS[EIVLSQS]
 PAITAASLGQKVTITCSASSNVSYIHWYQQRSGTSPRPWIYEISKLASGVPVRFSG
 SGSGTSYSLTISSMEAEDAAIYYCQQWNYPLITFGSGTKLEIQ]TTPAPRPPTAP
 TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLY
 CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAP
 AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
 KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

D10 v4 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 94)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLKESGPGLVAPSQTL SITCTVSGFSLTSYGV
 HWVRQPPGKLEWLGVIWAGGFTNYSALKSRLSISKDNSKSQVLLKMTSLQT
 DDTAMYCARRGSSYSMDYWGGQTSVTVSSGGGSGGGSGGGGS EIVLSQS
 PAITAASLGQKVTITCSASSNVSYIHWWYQQRSGTSPRPWIYEISKLASGVPVRFSG
 SGGTSYSLTISSMEAEDAIIYCCQQWNYPLITFGSGTKLEIQITTPAPRPPTPAP
 TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFS
 VVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA
 PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
 QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

D10 v5 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 95)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLKESGPGLVAPSQTL SITCTVSGFSLTSYGV
 HWVRQPPGKLEWLGVIWAGGFTNYSALKSRLSISKDNSKSQVLLKMTSLQT
 DDTAMYCARRGSSYSMDYWGGQTSVTVSSGGGSGGGSGGGGS EIVLSQS
 PAITAASLGQKVTITCSASSNVSYIHWWYQQRSGTSPRPWIYEISKLASGVPVRFSG
 SGGTSYSLTISSMEAEDAIIYCCQQWNYPLITFGSGTKLEIQEPKSPDKTHTCPP
 CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGKIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG
 CSCRPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
 RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLY
 QGLSTATKDTYDALHMQALPPR

D10 v6 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 96)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLKESGPGLVAPSQTL SITCTVSGFSLTSYGV
 HWVRQPPGKLEWLGVIWAGGFTNYSALKSRLSISKDNSKSQVLLKMTSLQT
 DDTAMYCARRGSSYSMDYWGGQTSVTVSSGGGSGGGSGGGGS EIVLSQS
 PAITAASLGQKVTITCSASSNVSYIHWWYQQRSGTSPRPWIYEISKLASGVPVRFSG
 SGGTSYSLTISSMEAEDAIIYCCQQWNYPLITFGSGTKLEIQEPKSPDKTHTCPP
 CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
 SKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGKIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE
 DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
 KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDG
 LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Гуманизированная последовательность D10-V1 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 97)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQL(Q/K)ESGPGLV(K/A)PSETLSLTCTVSGFS
 LTSYGYVHWVRQPPGKLEWLGVIWAGGFTNYN(P/S)SLKSRLTISKDNSKNQ
 VSLKLSSVTA(A/D)DTA(V/M)YYCARRGSSYSMDYWGGQGLTVTVSSGGGSGG
 GSGSGGS EIVL(T/S)QSPATLSLSPGERATLSC(R/S)ASSNVSYIHWWYQK(P/S)
 GQAPRPWIYEISKLA(T/S)GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLE(P/A)EDFA(V/I)YYCQ
 QWNYPLITFGQGTKEIKGLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLSLVITL
 YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA
 PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL
 QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Гуманизированная последовательность D10-V2 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 98)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQL(Q/K)ESGPGLV(K/A)PSETLSLTCTVSGFS
 LTSYGYVHWVRQPPGKLEWLGVIWAGGFTNYN(P/S)SLKSRLTISKDNSKNQ
 VSLKLSSVTA(A/D)DTA(V/M)YYCARRGSSYSMDYWGGQGLTVTVSSGGGSGG
 GSGSGGS EIVL(T/S)QSPATLSLSPGERATLSC(R/S)ASSNVSYIHWWYQK(P/S)
 GQAPRPWIYEISKLA(T/S)GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLE(P/A)EDFA(V/I)YYCQ
 QWNYPLITFGQGTKEIKGLAVSTISSFFPPGYQIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRF
 SVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSAD
 APAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE
 LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Гуманизированная последовательность D10-V3 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 99)

MALPVTALLLPLALLHAARPQVQL(Q/K)ESGPGLV(K/A)PSETLSLTCTVSGFS
 LTSYGYVHWVRQPPGKLEWLGVIWAGGFTNYN(P/S)SLKSRLTISKDNSKNQ
 VSLKLSVTA(A/D)DTA(V/M)YYCARRGSSYSMDYWGGTGLVTVSSGGGSGG
 GSGGGGS EIVL(T/S)QSPATLSLSPGERATLSC(R/S)ASSNVSYIHWYQQK(P/S)
 GQAPRPWIYEISKLA(T/S)GIPARFSGSGSGTDYTLTISSE(P/A)EDFA(V/I)YYCQ
 QWNYPLITFGGQTKLEIKITTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT
 RGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT
 EEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDV
 LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Гуманизированная последовательность D10-V4 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 100)

MALPVTALLLPLALLHAARPQVQL(Q/K)ESGPGLV(K/A)PSETLSLTCTVSGFS
 LTSYGYVHWVRQPPGKLEWLGVIWAGGFTNYN(P/S)SLKSRLTISKDNSKNQ
 VSLKLSVTA(A/D)DTA(V/M)YYCARRGSSYSMDYWGGTGLVTVSSGGGSGG
 GSGGGGS EIVL(T/S)QSPATLSLSPGERATLSC(R/S)ASSNVSYIHWYQQK(P/S)
 GQAPRPWIYEISKLA(T/S)GIPARFSGSGSGTDYTLTISSE(P/A)EDFA(V/I)YYCQ
 QWNYPLITFGGQTKLEIKITTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT
 RGLDFACDIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
 TQEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEY
 DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
 GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Гуманизированная последовательность D10-V5 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 101)

MALPVTALLLPLALLHAARPQVQL(Q/K)ESGPGLV(K/A)PSETLSLTCTVSGFS
 LTSYGYVHWVRQPPGKLEWLGVIWAGGFTNYN(P/S)SLKSRLTISKDNSKNQ
 VSLKLSVTA(A/D)DTA(V/M)YYCARRGSSYSMDYWGGTGLVTVSSGGGSGG
 GSGGGGS EIVL(T/S)QSPATLSLSPGERATLSC(R/S)ASSNVSYIHWYQQK(P/S)
 GQAPRPWIYEISKLA(T/S)GIPARFSGSGSGTDYTLTISSE(P/A)EDFA(V/I)YYCQ
 QWNYPLITFGGQTKLEIKEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI
 ARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
 D KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKIYIWA PLAGTCGVLLSLVI
 TLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRS
 ADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
 NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Гуманизированная последовательность D10-V6 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 102)

MALPVTALLLPLALLHAARPQVQL(Q/K)ESGPGLV(K/A)PSETLSLTCTVSGFS
 LTSYGYVHWVRQPPGKLEWLGVIWAGGFTNYN(P/S)SLKSRLTISKDNSKNQ
 VSLKLSVTA(A/D)DTA(V/M)YYCARRGSSYSMDYWGGTGLVTVSSGGGSGG
 GSGGGGS EIVL(T/S)QSPATLSLSPGERATLSC(R/S)ASSNVSYIHWYQQK(P/S)
 GQAPRPWIYEISKLA(T/S)GIPARFSGSGSGTDYTLTISSE(P/A)EDFA(V/I)YYCQ
 QWNYPLITFGGQTKLEIKEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI
 ARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
 D KSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKIISFFLALTSTALLFLLFLT
 LRFVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRS
 ADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
 NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
 R

G6 v1 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 103)

MALPVTALLLPLALLHAARPEVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGFAFTGYN
 MNWVKQTNGKSLWIGSIDPYGGSTYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLKS
 LTTSDSAVYYCARSPGGDYAMDYWGGTSVTVSSGGGSGGGSGGGSGSDIK
 MTQSPSSMYASVGERVTITCKASQGINSYSGWFQKPGKSPKTLIYRGNRLVDG
 VPSRFSGSGQDYSLTISSEYEDMGIIYCLQYDEFPYTFGGGQTKLEIKGLAVS
 TISSFFPPGYQIYIWA PLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT

TQEEEDGCSRCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
 DVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
 GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

G6 v2 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 104)

MALPVTALLPLALLLHAARP[EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGFATGYN]
 [MNWVKQTNGKSLEWIGSIDPYYGGSTYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLKS]
 [LTSDDSAVYYCARSPGGDYAMDYWGQGSTVTVS][GGGSGGGSGGGGS][DIK]
 [MTQSPSSMYASVGERVTITCKASQGINSYSGWFQQKPGKSPKTLIYRGNRLVDG]
 [VPSRFSGSGGDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGKLEIK]GLAVS
 TISSFFPPGYQHISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPV
 QTTQEEEDGCSRCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
 YDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
 GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

G6 v3 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 105)

MALPVTALLPLALLLHAARP[EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGFATGYN]
 [MNWVKQTNGKSLEWIGSIDPYYGGSTYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLKS]
 [LTSDDSAVYYCARSPGGDYAMDYWGQGSTVTVS][GGGSGGGSGGGGS][DIK]
 [MTQSPSSMYASVGERVTITCKASQGINSYSGWFQQKPGKSPKTLIYRGNRLVDG]
 [VPSRFSGSGGDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGKLEIK]ITTPAP
 RPPITAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLL
 SLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSRCRFPEEEEEGGCELRVKFS
 RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEG
 LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
 LPPR

G6 v4 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 106)

MALPVTALLPLALLLHAARP[EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGFATGYN]
 [MNWVKQTNGKSLEWIGSIDPYYGGSTYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLKS]
 [LTSDDSAVYYCARSPGGDYAMDYWGQGSTVTVS][GGGSGGGSGGGGS][DIK]
 [MTQSPSSMYASVGERVTITCKASQGINSYSGWFQQKPGKSPKTLIYRGNRLVDG]
 [VPSRFSGSGGDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGKLEIK]ITTPAP
 RPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIISFLLALTSTALLFLLF
 FLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSRCRFPEEEEEGGCELRVKFS
 RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEG
 LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
 ALPPR

G6 v5 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 107)

MALPVTALLPLALLLHAARP[EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGFATGYN]
 [MNWVKQTNGKSLEWIGSIDPYYGGSTYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLKS]
 [LTSDDSAVYYCARSPGGDYAMDYWGQGSTVTVS][GGGSGGGSGGGGS][DIK]
 [MTQSPSSMYASVGERVTITCKASQGINSYSGWFQQKPGKSPKTLIYRGNRLVDG]
 [VPSRFSGSGGDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGKLEIK]EPKSP
 DKHTCPCPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
 YTQKSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLLTVLITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPV
 QTTQEEEDGCSRCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
 YDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
 GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

G6 v6 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 108)

MALPVTALLPLALLLHAARP[EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGFATGYN]
 [MNWVKQTNGKSLEWIGSIDPYYGGSTYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLKS]
 [LTSDDSAVYYCARSPGGDYAMDYWGQGSTVTVS][GGGSGGGSGGGGS][DIK]
 [MTQSPSSMYASVGERVTITCKASQGINSYSGWFQQKPGKSPKTLIYRGNRLVDG]
 [VPSRFSGSGGDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGKLEIK]EPKSP
 DKHTCPCPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH

YTQKSLSLSPGKIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRP
VQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

G3 v1 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 109)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYNFTNY
WINWVKLRPGQGLEWIGEIYPGSGSTNYNEFKSKATLTADTSSSTAYMQLSSL
ASEDSALYYCARDGNYYAMDYWGQTSVTVSSGGGSGGGSGGGGSDIQM
TQTSSLSASLGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSALHSGV
PSRFGSGSGTDYSITISNLEQEDIATYFCQQGNTLPPYTFGGGTKLEIKGLAVST
ISSFFPPGYQIYIWA PLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT
QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

G3 v2 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 110)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYNFTNY
WINWVKLRPGQGLEWIGEIYPGSGSTNYNEFKSKATLTADTSSSTAYMQLSSL
ASEDSALYYCARDGNYYAMDYWGQTSVTVSSGGGSGGGSGGGGSDIQM
TQTSSLSASLGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSALHSGV
PSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPPYTFGGGTKLEIKGLAVST
ISSFFPPGYQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ
TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

G3 v3 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 111)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYNFTNY
WINWVKLRPGQGLEWIGEIYPGSGSTNYNEFKSKATLTADTSSSTAYMQLSSL
ASEDSALYYCARDGNYYAMDYWGQTSVTVSSGGGSGGGSGGGGSDIQM
TQTSSLSASLGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSALHSGV
PSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPPYTFGGGTKLEIKITTPAP
RPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLL
SLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS
RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

G3 v4 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 112)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYNFTNY
WINWVKLRPGQGLEWIGEIYPGSGSTNYNEFKSKATLTADTSSSTAYMQLSSL
ASEDSALYYCARDGNYYAMDYWGQTSVTVSSGGGSGGGSGGGGSDIQM
TQTSSLSASLGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSALHSGV
PSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPPYTFGGGTKLEIKITTPAP
RPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIISFFLALTSTALLFL
FLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKF
SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR

G3 v5 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 113)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYNFTNY
WINWVKLRPGQGLEWIGEIYPGSGSTNYNEFKSKATLTADTSSSTAYMQLSSL
ASEDSALYYCARDGNYYAMDYWGQTSVTVSSGGGSGGGSGGGGSDIQM
TQTSSLSASLGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSALHSGV
PSRFGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPPYTFGGGTKLEIKEPKSPD
KTHTCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTKISAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVNFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGKIYIWA PLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPV
QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE

YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG
KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

G3 v6 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 114)

MALPVTALLPLALLHAARPQVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYNFTNY
WINWVKLRPGQGLEWIGEIYPGSGSTNYNEFKSKATLTADTSSSTAYMQLSSL
ASEDSALYYCARDGNYYAMDYWGQGSVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQM
TQTSSLSASLGDRVTITCRASQDINNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSALHSGV
PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPPYTFGGGKLEIKEPKSPD
KTHTCPPCPAPPVAGPSVFLPPPKDITLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVNFSCVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGKIIFFLALTSTALLFLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRP
VQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

H10 v1 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 115)

MALPVTALLPLALLHAARPEVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYA
MSWVRQTPEKRLEWVASISTGASAYFPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRS
EDTAMYYCARITTSTWYFDVWGAGTTTVTSSGGGGSGGGSGGGGSDIKMTQ
SPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSR
FSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPTYFGGGKLEIKGLAVSTISSF
FPPGYQIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE
DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDG
LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

H10 v2 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 116)

MALPVTALLPLALLHAARPEVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYA
MSWVRQTPEKRLEWVASISTGASAYFPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRS
EDTAMYYCARITTSTWYFDVWGAGTTTVTSSGGGGSGGGSGGGGSDIKMTQ
SPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSR
FSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPTYFGGGKLEIKGLAVSTISSF
FPPGYQIISFFLALTSTALLFLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE
EDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDG
GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

H10 v3 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 117)

MALPVTALLPLALLHAARPEVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYA
MSWVRQTPEKRLEWVASISTGASAYFPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRS
EDTAMYYCARITTSTWYFDVWGAGTTTVTSSGGGGSGGGSGGGGSDIKMTQ
SPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSR
FSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPTYFGGGKLEIKTTTPAPRPPT
PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVI
TLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

H10 v4 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 118)

MALPVTALLPLALLHAARPEVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYA
MSWVRQTPEKRLEWVASISTGASAYFPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRS
EDTAMYYCARITTSTWYFDVWGAGTTTVTSSGGGGSGGGSGGGGSDIKMTQ
SPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSR
FSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPTYFGGGKLEIKTTTPAPRPPT
PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIISFFLALTSTALLFLFFLTL
RFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCELRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

H10 v5 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 119)

MALPVTALLPLALLHAARP[EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYA]
 [MSWVRQTPEKRLEWVASISTGASAYFPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRS]
 [EDTAMYYCARITTSTWYFDVWGAGTTTVTVSS]GGGGGGGGGGGG[DIKMTQ]
 [SPSSMYASLGERVITITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSR]
 [FSGSGGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFPTYFGGGTKLEIK]EPKSPDKTH
 TCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGKIYWAPLAGTCGVLLLSLITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ
 EEDGCSRFPSEEEGGCELVRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV
 LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

H10 v6 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 120)

MALPVTALLPLALLHAARP[EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYA]
 [MSWVRQTPEKRLEWVASISTGASAYFPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRS]
 [EDTAMYYCARITTSTWYFDVWGAGTTTVTVSS]GGGGGGGGGGGG[DIKMTQ]
 [SPSSMYASLGERVITITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSR]
 [FSGSGGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFPTYFGGGTKLEIK]EPKSPDKTH
 TCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGKIISFFLALTSTALLFLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT
 QEEDGCSRFPSEEEGGCELVRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
 VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Гуманизированная последовательность H10-v1 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 121)

MALPVTALLPLALLHAARP[E(V/K)LVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS]
 [YAMSWVRQAPGKGLEWVASISTGASAYF(A/P)DSVKGRFTISRDNKNSLYLQ]
 [MNSLRAEDTA(V/M)YYCARITTSTWYFDVWGQGTITTVTVSS]GGGGGGGGGGGG
 GGS[DIQMT(Q/K)SPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIY]
 [RANRL(Q/V)SGVPSRFSGSGGQDYTLTISSLQ(P/Y)EDFATYYCLQYDEFPTYFG]
 [QGTKEIK]GLAVSTISSFFPPGYQIYWAPLAGTCGVLLLSLITLYCKRGRKKLL
 YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPSEEEGGCELVRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
 YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS
 EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Гуманизированная последовательность H10-v2 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 122)

MALPVTALLPLALLHAARP[E(V/K)LVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS]
 [YAMSWVRQAPGKGLEWVASISTGASAYF(A/P)DSVKGRFTISRDNKNSLYLQ]
 [MNSLRAEDTA(V/M)YYCARITTSTWYFDVWGQGTITTVTVSS]GGGGGGGGGGGG
 GGS[DIQMT(Q/K)SPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIY]
 [RANRL(Q/V)SGVPSRFSGSGGQDYTLTISSLQ(P/Y)EDFATYYCLQYDEFPTYFG]
 [QGTKEIK]GLAVSTISSFFPPGYQIISFFLALTSTALLFLFFLTLRFSVVKRGRKK
 LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPSEEEGGCELVRVKFSRSADAPAYQQGQN
 QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
 YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Гуманизированная последовательность H10-v3 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 123)

MALPVTALLPLALLHAARP[E(V/K)LVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS]
 [YAMSWVRQAPGKGLEWVASISTGASAYF(A/P)DSVKGRFTISRDNKNSLYLQ]
 [MNSLRAEDTA(V/M)YYCARITTSTWYFDVWGQGTITTVTVSS]GGGGGGGGGGGG
 GGS[DIQMT(Q/K)SPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIY]
 [RANRL(Q/V)SGVPSRFSGSGGQDYTLTISSLQ(P/Y)EDFATYYCLQYDEFPTYFG]
 [QGTKEIK]TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
 WAPLAGTCGVLLLSLITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFP
 EEEEGGCELVRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
 MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA
 TKDTYDALHMQALPPR

Гуманизированная последовательность H10-v4 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 124)

MALPVTALLPLALLHAARP[E(V/Q/K)LVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS
YAMSWVRQAPGKGLEWVASISTGASAYF(A/P)DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ
MNSLRAEDTA(V/M)YYCARITTSTWYFDVWGQTTVTVSS]GGGSGGGGSGG
GG\$[DIQMT(Q/K)SPSSLSASVGDRTTITCRASQDINSYLSWFQKPKGAPKTLIY
RANRL(Q/V)SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQ(P/Y)EDFATYYCLQYDEFPYTFG
QGTKEIK]ITTPAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIIS
FFLALTSTALLFLLFLLTLRFVSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR
FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD
PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLS
TATKDTYDALHMQALPPR

Гуманизированная последовательность H10-v5 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 125)

MALPVTALLPLALLHAARP[E(V/Q/K)LVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS
YAMSWVRQAPGKGLEWVASISTGASAYF(A/P)DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ
MNSLRAEDTA(V/M)YYCARITTSTWYFDVWGQTTVTVSS]GGGSGGGGSGG
GG\$[DIQMT(Q/K)SPSSLSASVGDRTTITCRASQDINSYLSWFQKPKGAPKTLIY
RANRL(Q/V)SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQ(P/Y)EDFATYYCLQYDEFPYTFG
QGTKEIK]EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKL
LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ
LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Гуманизированная последовательность H10-v6 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 126)

MALPVTALLPLALLHAARP[E(V/Q/K)LVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSS
YAMSWVRQAPGKGLEWVASISTGASAYF(A/P)DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ
MNSLRAEDTA(V/M)YYCARITTSTWYFDVWGQTTVTVSS]GGGSGGGGSGG
GG\$[DIQMT(Q/K)SPSSLSASVGDRTTITCRASQDINSYLSWFQKPKGAPKTLIY
RANRL(Q/V)SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQ(P/Y)EDFATYYCLQYDEFPYTFG
QGTKEIK]EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFVSVVKRGRKK
LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN
QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

2A4 v1 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 127)

MALPVTALLPLALLHAARP[EVKLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYT
MHWVKQSHGKSLEWIGGINPNNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRS
LTSEDSAVYYCALQGFAYWGQGTPLTVSS]GGGSGGGGSGGGGS[MEIETQTP
ALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWYLTSLNLSAGVPARF
SGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQWSSNPYTFGGGTRLELK]GLAVSTISSF
FPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE
DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG
LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

2A4 v2 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 128)

MALPVTALLPLALLHAARP[EVKLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYT
MHWVKQSHGKSLEWIGGINPNNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRS
LTSEDSAVYYCALQGFAYWGQGTPLTVSS]GGGSGGGGSGGGGS[MEIETQTP
ALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWYLTSLNLSAGVPARF
SGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQWSSNPYTFGGGTRLELK]GLAVSTISSF
FPPGYQIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFVSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE

EDGCSRCFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD
GLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

2A4 v3 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 129)

MALPVTALLPLALLLHAARP[EVKLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYT]
[MHWVKQSHGKSLEWIGGINPNNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRS]
[LTSEDSAVYYCALQGFAIWGQGTPLTVSS]GGGSGGGSGGGGS[MEIEITQTP]
[ALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIYLTSLNASGVPARF]
[SGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQWSSNPYTFGGGTRLELK]ITTPAPRPPT
PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLSLVI
TLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRCFPEEEEGGCELRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYN
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

2A4 v4 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 130)

MALPVTALLPLALLLHAARP[EVKLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYT]
[MHWVKQSHGKSLEWIGGINPNNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRS]
[LTSEDSAVYYCALQGFAIWGQGTPLTVSS]GGGSGGGSGGGGS[MEIEITQTP]
[ALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIYLTSLNASGVPARF]
[SGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQWSSNPYTFGGGTRLELK]ITTPAPRPPT
PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIISFFLALTSTALLFLLFFLTL
RFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRCFPEEEEGGCELRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYN
ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

2A4 v5 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 131)

MALPVTALLPLALLLHAARP[EVKLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYT]
[MHWVKQSHGKSLEWIGGINPNNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRS]
[LTSEDSAVYYCALQGFAIWGQGTPLTVSS]GGGSGGGSGGGGS[MEIEITQTP]
[ALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIYLTSLNASGVPARF]
[SGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQWSSNPYTFGGGTRLELK]EPKSPDKTH
TCPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQK
SLSLSPGKIYIWAFLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ
EEDGCSRCFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV
LDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

2A4 v6 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 132)

MALPVTALLPLALLLHAARP[EVKLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYT]
[MHWVKQSHGKSLEWIGGINPNNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRS]
[LTSEDSAVYYCALQGFAIWGQGTPLTVSS]GGGSGGGSGGGGS[MEIEITQTP]
[ALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPWIYLTSLNASGVPARF]
[SGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQWSSNPYTFGGGTRLELK]EPKSPDKTH
TCPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQK
SLSLSPGKIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT
QEEDGCSRCFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD
VLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

1C11 v1 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 133)

MALPVTALLPLALLLHAARP[EVKLQESGAELARPGASVKMSCKASGYTFTSY]
[TMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSSGYTEYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLSS]
[LTSGDSAVYYCARRVLWRRGDYWGQGTILTVSA]GGGSGGGSGGGGS[ME]
[VLITQTSSLASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQQEPDGTIKRLIYATSSLDSG]
[VPKRFSGSRGSDYSLTISSLESEDFVYYCLQYASSPYTFGGGKLELK]GLAVS
TISSFFPPGYQIYIWAFLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT
QEEDGCSRCFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY

DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

1C11 v2 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 134)

MALPVTALLLPLALLHAARP[EVKLQESGAELARPGASVKMSCKASGYTFTSY]
[TMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSSGYTEYNQKFCDKTTLTADKSSSTAYMQLSS]
[LTSGDSAVYYCARRVLWLRGQDYWGQGTILTVSA]GGGSGGGSGGGGS[ME]
[VLITQTPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQQEPDGTIKRLIYATSSLD SG]
[VPKRFGSRSGSDYSLTISSLESEDFVYYCLQYASSPYTFGGGKLELK]GLAVS
TISSFFPPGYIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPV
QTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

1C11 v3 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 135)

MALPVTALLLPLALLHAARP[EVKLQESGAELARPGASVKMSCKASGYTFTSY]
[TMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSSGYTEYNQKFCDKTTLTADKSSSTAYMQLSS]
[LTSGDSAVYYCARRVLWLRGQDYWGQGTILTVSA]GGGSGGGSGGGGS[ME]
[VLITQTPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQQEPDGTIKRLIYATSSLD SG]
[VPKRFGSRSGSDYSLTISSLESEDFVYYCLQYASSPYTFGGGKLELK]ITTPA
PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLL
LSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVK
FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR

1C11 v4 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 136)

MALPVTALLLPLALLHAARP[EVKLQESGAELARPGASVKMSCKASGYTFTSY]
[TMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSSGYTEYNQKFCDKTTLTADKSSSTAYMQLSS]
[LTSGDSAVYYCARRVLWLRGQDYWGQGTILTVSA]GGGSGGGSGGGGS[ME]
[VLITQTPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQQEPDGTIKRLIYATSSLD SG]
[VPKRFGSRSGSDYSLTISSLESEDFVYYCLQYASSPYTFGGGKLELK]ITTPA
PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIISFFLALTSTALLFLL
FLLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVK
FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHM
QALPPR

1C11 v5 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 137)

MALPVTALLLPLALLHAARP[EVKLQESGAELARPGASVKMSCKASGYTFTSY]
[TMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSSGYTEYNQKFCDKTTLTADKSSSTAYMQLSS]
[LTSGDSAVYYCARRVLWLRGQDYWGQGTILTVSA]GGGSGGGSGGGGS[ME]
[VLITQTPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQQEPDGTIKRLIYATSSLD SG]
[VPKRFGSRSGSDYSLTISSLESEDFVYYCLQYASSPYTFGGGKLELK]EPKSP
DKTHTCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIETISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGKIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPV
QTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

1C11 v6 (SEQ ID NO: 1 + SEQ ID NO: 138)

MALPVTALLLPLALLHAARP[EVKLQESGAELARPGASVKMSCKASGYTFTSY]
[TMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSSGYTEYNQKFCDKTTLTADKSSSTAYMQLSS]
[LTSGDSAVYYCARRVLWLRGQDYWGQGTILTVSA]GGGSGGGSGGGGS[ME]
[VLITQTPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQQEPDGTIKRLIYATSSLD SG]
[VPKRFGSRSGSDYSLTISSLESEDFVYYCLQYASSPYTFGGGKLELK]EPKSP
DKTHTCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIETISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGKIISFFLALTSTALLFLLFLLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRP
VQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR
RGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Пример 1. Отбор ROR1-позитивных и ROR1-негативных клеточных линий.

Для идентификации клеточных линий, характеризующихся различными уровнями экспрессии ROR1 на поверхности клеток, анализировали 12 человеческих клеточных линий с помощью проточной цитометрии с использованием набора Qifikit (фирма Dako) и клона МАт 2А2 к человеческому ROR1 (см. раздел "Материалы и методы"). Девять из этих клеточных линий были описаны ранее в литературе в качестве ROR1-позитивных на уровне мРНК или уровне белка (табл. 10).

Таблица 10. Клеточные линии, описанные в литературе в качестве ROR1-позитивных

Клеточная линия	Описание	Клеточный тип
MDA-MB-231	прикрепленная	аденокарцинома молочной железы
PC-3	прикрепленная	аденокарцинома предстательной железы
MDA-MB-468	прикрепленная	аденокарцинома молочной железы
Hs746T	прикрепленная	карцинома желудка
NCI-H1993	прикрепленная	немелкоклеточный рак легкого
HT-29	прикрепленная	колоректальная аденокарцинома
A549	прикрепленная	человеческая аденокарцинома легкого
Cal51	прикрепленная	аденокарцинома молочной железы
Jeko-1	суспензия	лимфома из клеток мантии

Результаты анализа методом проточной цитометрии показали, что клетки линий MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26), MDA-MB-468 (ATCC® HTB. 132), Hs746T (ATCC® HTB-135) и HT-29 (ATCC® HTB-38) характеризовались наиболее высокими уровнями экспрессии ROR1 на поверхности клеток. Более низкие уровни экспрессии ROR1 на клеточной поверхности, составляющие примерно половину от уровней, имевших место для клеточных линий с наиболее высокими уровнями экспрессии, были выявлены для клеток линий PC-3 (ATCC® CRL-1435), NCI-H1993 (ATCC® CRL 5909), A549 (ATCC CCL-185) и Jeko-1 (ATCC CRL-3006) (фиг. 5).

Результаты этого анализа продемонстрированы также, что клетки линий MCF-7, K562 и Т-клетки не экспрессировали ROR1 и что клетки линии Cal51 характеризовались лишь очень низкими уровнями экспрессии ROR1 на своей поверхности.

Из указанных клеточных линий были отобраны три прикрепившиеся линии для скрининга в отношении активности scCAR к ROR1: клетки линий PC-3 MDA-MB-231, характеризующиеся различными уровнями экспрессии ROR1, и клетки линии MCF-7, являющиеся ROR1-негативными.

Для скрининга в отношении активности scCAR к ROR1 были отобраны также две клеточные линии, находившиеся в суспензии: клетки линии Jeko-1, являющиеся ROR1-позитивными, и клетки линии K562, являющиеся ROR1-негативными.

Пример 2. Создание анти-ROR1 scCAR.

Был создан набор из 18 ROR1-специфических scCAR 2-го поколения (фиг. 1B) и он был протестирован в описанных ниже экспериментах.

Их получали путем слияния указанных ниже конструктивных элементов, представленных в таблицах 1-2:

scFv из мышиного антитела или его гуманизированная форма из антител D10, G6, G3, H10, 2A4 или 1C11;

один спейсер: шарнир человеческого FcγRIIIα, CD8α или IgG1;

трансмембранный домен человеческого CD8α и костимуляторный домен человеческого 41BB;

активирующий домен человеческого CD3ζ.

Для создания рецепторов, обладающих различными аффинностями связывания и различными специфичностями к эпитопам, в конструкциях scCAR использовали различные scFv.

Мишенью МАт D10 и G6 является Ig-подобная 3'-область и линкерная область между Ig-подобным доменом и доменом CRD ROR1 (фиг. 2).

Мишенью МАт G3, H10 и 2A4 является IgG-подобная область ROR1 (фиг. 2).

Мишенью МАт 1C11 является домен CRD ROR1 (фиг. 2).

В конструкциях scCAR применяли три спейсера различной длины (16 АК, 45 АК и 231 АК) для того, чтобы попытаться оптимизировать сцепление scCAR и с проксимальным и дистальным эпитопами ROR1 (Guest и др., 2005).

Пример 3. Тестирование анти-ROR1 scCAR in vitro.

Анти-ROR1 scCAR, сконструированные согласно описанному выше методу, тестировали на человеческих первичных Т-клетках с помощью двухстадийного метода скрининга, проиллюстрированного на фиг. 6.

На первой стадии процесса скрининга первичные человеческие Т-клетки, предварительно активированные в течение 4-5 дней с использованием анти-CD28/CD3 гранул и IL-2, подвергали электропорации с использованием мРНК, кодирующей 18 указанных выше анти-ROR1 scCAR. Через один день после электропорации оценивали экспрессию scCAR с помощью проточной цитометрии и вестерн-блоттинга, и оценивали активность модифицированных scCAR Т-клеток путем измерения Т-клеточной дегрануляции. scCAR, которые были выявлены с помощью вестерн-блоттинга и которые индуцировали значительную специфическую дегрануляцию Т-клеток (≥20%) после совместного культивирования по меньшей мере с

одной ROR1-позитивной клеточной линией, отбирали для осуществления второй стадии процесса скрининга.

На второй стадии процесса скрининга первичные человеческие Т-клетки, предварительно активированные в течение 11-12 дней с использованием анти-CD28/CD3 гранул и IL-2, подвергали электропорации с использованием мРНК, кодирующей анти-ROR1 scCAR, отобранные в результате осуществления первой стадии скрининга. Через один-два дня после электропорации оценивали экспрессию scCAR с помощью проточной цитометрии и оценивали активность модифицированных scCAR Т-клеток путем измерения эффекторных функций Т-клеток (дегрануляция, производство IFN γ и цитолитическая активность). scCAR, которые индуцировали значительную специфическую дегрануляцию Т-клеток ($\geq 20\%$), значительную специфическую цитотоксичность Т-клеток (лизис $\geq 20\%$ клеток-мишеней) и значительное производство IFN γ Т-клетками (≥ 1500 пг/мл) при совместном культивировании по меньшей мере с одной ROR1-позитивной клеточной линией, отбирали в качестве перспективных scCAR-кандидатов.

Указанные выше scCAR систематически сравнивали с эталонным scCAR, содержащим scFv 2A2, слитый с коротким шарниром (SEQ ID NO: 79), поскольку у Hudecek с соавторами (Hudecek и др., 2013) было продемонстрировано, что этот scCAR обладал функциональностью.

а) Первичный скрининг scCAR.

Экспрессия scCAR.

Во-первых, оценивали общую экспрессию анти-ROR1 scCAR в Т-клетках с помощью вестерн-блоттинга с использованием МАТ к человеческому CD3 дзета. Было установлено, что scCAR, которые содержали спейсер промежуточной длины (шарнир CD8 α) или длинный спейсер (шарнир IgG1), с трудом можно было обнаружить в Т-клеточных лизатах независимо от того, какой scFv они несли. Однако, среди scCAR, которые содержали короткий спейсер (Fc γ RIII α), легко можно было обнаружить конструкции с scFv G6, G3 и H10, в то время как конструкции с scFv D10, 2A4 и 1C11 можно было обнаружить с трудом или их не удавалось выявить (фиг. 7А и 7Б).

Затем оценивали экспрессию анти-ROR1 scCAR на поверхности Т-клеток с помощью проточной цитометрии с использованием антитела к Fab или белка L (фиг. 8А и 8Б).

Было установлено, что

scCAR D10-v3, D10-v5, G6-v3, G6-v5, G3-v3, G3-v5, H10-v3, H10-v5, 2A4-v3 и 2A4-v5, которые хорошо поддавались обнаружению в лизате Т-клеток с помощью вестерн-блоттинга, также хорошо поддавались обнаружению на Т-клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии;

scCAR D10-v1, 2A4-v1 и 1C11-v1, которые не поддавались или почти не поддавались обнаружению в лизатах Т-клеток с помощью вестерн-блоттинга, также не поддавались обнаружению на поверхности Т-клеток с помощью проточной цитометрии.

Активность scCAR.

Для оценки активности scCAR проводили анализ дегрануляции модифицированных scCAR Т-клеток после совместного культивирования с ROR1-позитивными (MDA-MB-231 и PC-3) или ROR1-негативными (MCF-7) клетками.

Было установлено, что Т-клетки, модифицированные scCAR D10-v1, D10-v3, D10-v5, H10-v1, H10-v3 и H10-v5, подвергаются существенно большей дегрануляции ($\geq 20\%$) при совместном культивировании с клетками линий MDA-MB-231 и PC-3, чем при совместном культивировании с клетками линии MCF-7 (фиг. 9А и 9Б).

На фиг. 9А и фиг. 9Б продемонстрировано, что немодифицированные Т-клетки, а также Т-клетки, модифицированные scCAR H10 и D10, подвергаются полной дегрануляции при совместном культивировании с клетками линий MDA-MB-231, PC-3 и MCF-7 намного лучше, чем модифицированные scCAR G6, G3, 2A4 и 1C11.

Вывод на основе результатов первичного скрининга.

Взятые в совокупности, представленные результаты свидетельствуют о том, что среди 18 анти-ROR1 scCAR, сконструированных согласно настоящему изобретению, 6 (D10-v1, D10-v3, D10-v5, H10-v1, H10-v3 и H10-v5) удовлетворяют критериям отбора для проведения второй стадии процесса скрининга.

б) Вторичный скрининг scCAR.

Экспрессия scCAR.

Экспрессию анти-ROR1 scCAR на поверхности Т-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием белка L.

Было установлено, что scCAR D10-v3, D10-v5, H10-v3 и H10-v5, которые легко поддавались обнаружению на Т-клетках, подвергнутых электропорации через 4-5 дней после активации (фиг. 8А и 8Б), не поддавались обнаружению или лишь с трудом поддавались обнаружению на Т-клетках, подвергнутых электропорации через 11-12 дней после активации (фиг. 10).

Активность scCAR.

Сначала для оценки активности scCAR анализировали дегрануляцию модифицированных scCAR Т-клеток после совместного культивирования с ROR1-позитивными (MDA-MB-231, PC-3 и Jeko-1) или

ROR1-негативными (MCF-7 и K562) клетками.

Было установлено, что в отличие от Т-клеток, модифицированных scCAR D10-v1, H10-v1 и H10-v5, Т-клетки, модифицированные scCAR D10-v3, D10-v5 и H10-v3, подвергались деградации при совместном культивировании с клетками линий MDA-MB-231 и PC-3 в существенно большей степени ($\geq 20\%$), чем при совместном культивировании с клетками линии MCF-7 или только в среде (фиг. 11).

Затем анализировали производство IFN γ модифицированными scCAR Т-клетками после совместного культивирования с ROR1-позитивными (MDA-MB-231, PC-3 и Jeko-1) или ROR1-негативными (MCF-7 и K562) клетками.

Было установлено, что в отличие от Т-клеток, модифицированных scCAR D10-v1, H10-v1 и H10-v5, Т-клетки, модифицированные scCAR D10-v3, D10-v5 и H10-v3, продуцировали IFN γ в существенно больших количествах (≥ 1500 пг/мл) после совместного культивирования с клетками линий MDA-MB-231, PC-3 и Jeko-1, чем после совместного культивирования с клетками линий MCF-7, K562 или только в среде (фиг. 12).

И, наконец, анализировали цитотоксическую активность модифицированных scCAR Т-клеток после совместного культивирования с ROR1-негативными (MCF-7 и K562) или ROR1-позитивными (MDA-MB-231, PC-3 и Jeko-1) клетками.

Было установлено, что, в отличие от Т-клеток, модифицированных scCAR D10-v1, H10-v1 и H10-v5, Т-клетки, модифицированные scCAR D10-v3, D10-v5 и H10-v3, специфически уничтожали более 20% клеток линии PC-3 при совместном культивировании (фиг. 13). Хотя Т-клетки, модифицированные scCAR D10-v3 и H10-v3, также уничтожали более 20% клеток линий MDA-MB-231 и Jeko-1 при совместном культивировании, это не имело место в случае Т-клеток, модифицированных scCAR D10-v5 (фиг. 13 и фиг. 14).

Вывод на основе результатов вторичного скрининга.

Взятые в совокупности, представленные результаты свидетельствуют о том, что среди всех протестированных scCAR наиболее перспективными являются scCAR D10-v3, D10-v5 и H10-v3.

Можно отметить, что 2 CAR версии V2 обладали небольшим преимуществом с точки зрения индукции цитотоксичности (более высокие ответы для различных протестированных ROR1-позитивных клеточных линий).

Пример 4. Пролиферация инактивированных TCR α клеток, экспрессирующих ROR1-CAR.

На фиг. 15 представлена схематическая иллюстрация инактивации TCR α с использованием редко расщепляющей эндонуклеазы. Конструировали и получали гетеродимерную TALE-нуклеазу, нацеленную на две последовательности длиной 17 пар оснований (так называемые полумишени),

разделенные спейсером длиной 15 пар оснований, находящиеся в гене константной области Т-клеточного рецептора альфа (TRAC). Каждая из полумишеней распознавалась повторами TALE-нуклеаз, представленными в таблице 11.

Таблица 11. TALE-нуклеазы, мишенью которых является ген TCR-альфа

Мишень	Последовательности-мишени	Последовательности повторов	Половина TALE-нуклеазы
TRAC_T01	TTGTCCCACAGATATCC Agaaccctgaccctg CCGTGTACCAGCTGAGA (SEQ ID NO: 139)	повтор TRAC_T01-L (SEQ ID NO: 140)	TRAC_T01-L TALEN (SEQ ID NO: 142)
		повтор TRAC_T01-R (SEQ ID NO: 141)	TRAC_T01-R TALEN (SEQ ID NO: 143)

Каждую конструкцию TALE-нуклеазы субклонировали, применяя расщепление рестриктазами, в экспрессионном векторе для клеток млекопитающих под контролем промотора T7. мРНК, кодирующую TALE-нуклеазу, которая расщепляла геномную последовательность TRAC, синтезировали с использованием плазмиды, несущей кодирующую последовательность, расположенную в прямом направлении от носителя промотора T7.

Очищенные Т-клетки, предварительно активированные в течение 72 ч покрытыми антителом к CD3/CD28 гранулами, трансфектировали каждой из 2 мРНК, кодирующих обе половины TRAC_T01 TALE-нуклеаз. Через 48 ч после трансфекции различные группы Т-клеток из одного и того же донора соответственно трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим один из ранее описанных ROR1 CAR (SEQ ID NO: 79-138). Через 2 дня после трансдукции CD3_{NEG}-клетки очищали с использованием покрытых антителом к CD3 магнитных гранул и через 5 дней после трансдукции клетки реактивировали растворимым антителом к CD28 (5 мкг/мл).

Мониторинг клеточной пролиферации осуществляли в течение периода времени вплоть до 30 дней после реактивации, подсчитывая количество клеток 2 раза в неделю. Обнаружено увеличение пролиферации клеток с инактивированным TCR альфа, экспрессирующих ROR1 CAR, прежде всего в том случае, когда их реактивировали антителом к CD28, по сравнению с нетрансдуцированными клетками.

Для изучения вопроса о том, находятся ли человеческие Т-клетки, экспрессирующие ROR1 CAR, в активированном состоянии, анализировали экспрессию маркера активации CD25 с помощью FACS через 7 дней после трансдукции. Очищенные клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, кодирующим ROR1 CAR, экспрессировали значительно в большем количестве CD25 на своей поверхности, чем

нетрансдуцированные клетки. Повышенный уровень экспрессии CD25 обнаружен как в условиях после реактивации антителом к CD28, так и в условиях без реактивации.

Ссылки

- Arimondo P. B., C. J. Thomas и др., "Exploring the cellular activity of camptothecin-triple-helix-forming oligonucleotide conjugates", *Mol Cell Biol* 26(1), 2006, cc. 324-333.
- Atkins J. F., N. M. Wills и др., "A case for "StopGo": reprogramming translation to augment codon meaning of GGN by promoting unconventional termination (Stop) after addition of glycine and then allowing continued translation (Go)", *Rna* 13(6), 2007, cc. 803-810.
- Baskar S., Kwong K.Y., Hofer T., Levy J.M., Kennedy M.G., Lee E., Staudt L.M., Wilson W.H., Wiestner A. и Rader C., Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 2008, cc. 396-404.
- Bicocca V.T., Chang B.H., Masouleh B.K., Muschen M., Loriaux M.M., Druker B.J. и Tyner J.W., Crosstalk between ROR1 and the Pre-B cell receptor promotes survival of t(1;19) acute lymphoblastic leukemia, *Cancer Cell* 22, 2012, cc. 656-667.
- Bierer B. E., G. Hollander и др., "Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology", *Curr Opin Immunol* 5(5), 1993, cc. 763-773.
- Boch J., H. Scholze и др., "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors", *Science* 326(5959), 2009, cc. 1509-1512.
- Byrd John., "Chronic Lymphocytic Leukemia", *ASH Annual Meeting & Exposition*, 2014).
- Choudhury A., Derkow K., Daneshmanesh A.H., Mikaelsson E., Kiaii S., Kokhaei P., Osterborg A. и Mellstedt H., Silencing of ROR1 and FMO5 with siRNA results in apoptosis of CLL cells, *Br. J. Haematol.* 151, 2010, cc. 327-335.
- Choulika A., A. Perrin и др., "Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*", *Mol Cell Biol* 15(4), 1995, cc. 1968-1973.
- Christian M., T. Cermak и др., "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases", *Genetics* 186(2), 2010, cc. 757-761.
- Cong L., F. A. Ran и др., "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems", *Science* 339(6121), 2013, cc. 819-823.
- Cooper L., Innovative T Cell-Targeted Therapy for Ovarian Cancer. Annual report 2012 prepared for US Army medical research and Medical Command.
- Cros E. и др., "Problems related to resistance to cytarabine in acute myeloid leukemia", *Leukemia & Lymphoma.* 45(6), 2004, cc. 1123-1132.
- Daneshmanesh A.H., Mikaelsson E., Jaddi-Tehrani M. и др., "Ror1, a cell surface receptor tyrosine kinase is expressed in Chronic Lymphocytic Leukemia and may serve as a putative target for therapy", *Int. J. Cancer* 123 (5), 2008, cc. 1190-1195. doi:10.1002/ijc.23587.
- Dave H., Anver M.R., Butcher D.O., Brown P., Khan J., Wayne A.S., Baskar S. и Rader C., Restricted cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in pediatric B-lineage acute lymphoblastic leukemia suggests targetability with therapeutic monoclonal antibodies, *Plos One* 7, e52655, 2012.
- Deltcheva E., K. Chylinski и др., "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III", *Nature* 471(7340), 2011, cc. 602-607.
- Donnelly M. и G. Elliott, "Nuclear localization and shuttling of herpes simplex virus tegument protein VP13/14", *J Virol* 75(6), 2001, cc. 2566-2574.
- Doronina V. A., C. Wu и др., "Site-specific release of nascent chains from ribosomes at a sense codon", *Mol Cell Biol* 28(13), 2008, cc. 4227-4239.
- Eisenschmidt K., T. Lanio и др., "Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage", *Nucleic Acids Res* 33(22), 2005, cc. 7039-7047.
- Fukuda T., Chen L., Endo T., Tang L., Lu D., Castro J.E., Widhopf G.F., 2nd, Rassenti, L.Z., Cantwell, M.J., Prussak, C.E., и др., Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 2008, cc. 3047-3052.

- Gardin C. и др., "Postremission treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia in first complete remission after intensive induction chemotherapy: results of the multicenter randomized Acute Leukemia French Association (ALFA) 9803 trial", *Blood*, 109(12), 2007, cc. 5129-5135.
- Gentile A., Lazzari L., Benvenuti S., Trusolino L. и Comoglio P.M., Ror1 is a pseudokinase that is crucial for Met-driven tumorigenesis, *Cancer Res.* 71, 2011, cc. 3132–3141.
- Garneau J. E., M. E. Dupuis и др., "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA", *Nature* 468(7320), 2010, cc. 67-71.
- Gasiunas G., R. Barrangou и др., "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria", *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(39), 2012, cc. E2579-2586.
- Guest R.D., Hawkins R.E., Kirillova N., Cheadle E.J., Arnold J., O'Neill A., Irlam J., Chester K.A., Kemshead J.T., Shaw D.M. и др., The role of extra cell spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens, *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 28, 2005, cc. 203–211.
- Henderson D. J., I. Naya и др., "Comparison of the effects of FK-506, cyclosporin A and rapamycin on IL-2 production", *Immunology* 73(3), 1991, cc. 316-321.
- Hudecek M., Schmitt T.M., Baskar S., Lupo-Stanghellini M.T., Nishida T., Yamamoto T.N., Bleakley M., Turtle C.J., Chang W.-C., Greisman H.A., и др., The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptors, *Blood* 116, 2010, cc. 4532–4541.
- Hudecek M., Lupo Stanghellini M.T., Kosasih P.L., Sommermeyer D., Jensen M., Rader C., Riddell S., "Receptor affinity and extra cell domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T-cells", *Clinical Cancer Research* 19(12), 2013, cc. 153-164
- Jena B., G. Dotti и др., "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor", *Blood* 116(7), 2010, cc. 1035-1044.
- Jinek M., K. Chylinski и др., "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity", *Science* 337(6096), 2012, cc. 816-821.
- June C. H. и др., "T Cells with specific chimeric antigen receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia", *Sci. Transl. Med.* 3(95), 2011, ra73.
- Kalish J. M. и P. M. Glazer, "Targeted genome modification via triple helix formation", *Ann N Y Acad Sci* 1058, 2005, cc. 151-й61.
- Klein U., Tu Y., Stolovitzky G.A., Mattioli M., Cattoretti G., Husson H., Freedman A., Inghirami G., Cro L., Baldini L. и др., Gene expression profiling of B cell Chronic Lymphocytic Leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells, *J. Exp. Med.* 194, 2001, cc. 1625–1638.
- Li T., S. Huang и др., "TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain", *Nucleic Acids Res* 39(1), 2011, cc. 359-372.
- Liu J., M. W. Albers и др., "Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity", *Biochemistry* 31(16), 1992, cc. 3896-3901.
- Mali P., L. Yang и др., "RNA-guided human genome engineering via Cas9", *Science* 339(6121), 2013, cc. 823-826.
- Matsuda T., Nomi M., Ikeya M., Kani S., Oishi I., Terashima T., Takada S. и Minami Y., Expression of the receptor tyrosine kinase genes, Ror1 and Ror2, during mouse development., *Mech. Dev.* 105, 2001, cc. 153–156.
- Moscou M. J. и A. J. Bogdanove, "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors", *Science* 326(5959), 2009, c. 1501.
- Paques F. и P. Duchateau, "Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy", *Curr Gene Ther* 7(1), 2007, cc. 49-66.
- Park, T. S., S. A. Rosenberg, и др. (2011). "Treating cancer with genetically engineered T cells", *Trends Biotechnol* 29(11): 550-7.
- Peipp M., D. Saul и др., "Efficient eukaryotic expression of fluorescent scFv fusion proteins directed against CD antigens for FACS applications", *J Immunol Methods* 285(2), 2004, cc. 265-280.
- Perrin A., M. Buckle и др., "Asymmetrical recognition and activity of the I-SceI endonuclease on its site and on intron-exon junctions", *Embo J* 12(7), 1993, cc. 2939-2947.

- Pingoud A. и G. H. Silva, "Precision genome surgery", *Nat Biotechnol* 25(7), 2007, сс. 743-744.
- Porteus M. H. и D. Carroll, "Gene targeting using zinc finger nucleases", *Nat Biotechnol* 23(8), 2005, сс. 967-973.
- Reddy U.R., Phatak S., Allen C. и др., "Localization of the human Ror1 gene (NTRKR1) to chromosome 1p31-p32 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid analysis", *Genomics* 41 (2), 1997, сс. 283-285.
doi:10.1006/geno.1997.4653
- Rosenwald A., Alizadeh A.A., Widhopf G., Simon R., Davis R.E., Yu X., Yang L., Pickeral O.K., Rassenti L.Z., Powell J. и др., Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell Chronic Lymphocytic Leukemia, *J. Exp. Med.* 194, 2001, сс. 1639-1647.
- Rouet P., F. Smih и др., "Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease", *Mol Cell Biol* 14(12), 1994, сс. 8096-8106.
- Sorek R., C. M. Lawrence и др., "CRISPR-mediated Adaptive Immune Systems in Bacteria and Archaea", *Annu Rev Biochem.*, 2013).
- Stoddard B. L., "Homing endonuclease structure and function", *Q Rev Biophys* 38(1), 2005, сс. 49-95.
- Yamaguchi T., Yanagisawa K., Sugiyama R., Hosono Y., Shimada Y., Arima C., Kato S., Tomida S., Suzuki M., Osada H. и др., NKX2-1/TITF1/TTF-1-Induced ROR1 is required to sustain EGFR survival signaling in lung adenocarcinoma. *Cancer Cell* 21, 2012, сс. 348-361.
- Zhang S., Chen L., Cui B., Chuang H.-Y., Yu J., Wang-Rodriguez J., Tang L., Chen G., Basak G.W. и Kipps T.J., ROR1 is expressed in human breast cancer and associated with enhanced tumor-cell growth. *Plos One* 7, 2012a, e31127.
- Zhang S., Chen L., Wang-Rodriguez J., Zhang L., Cui B., Frankel W., Wu R. и Kipps T.J., The onco-embryonic antigen ROR1 is expressed by a variety of human cancers. *Am. J. Pathol.* 181, 2012b, сс. 1903-1910.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. ROR1-(NTRKR1)-специфический химерный антигенный рецептор (CAR), который имеет по меньшей мере одну из полипептидных структур, выбранных из V3, V5 и V1, которые проиллюстрированы на фиг. 4, где указанная структура содержит внеклеточный лигандсвязывающий домен, содержащий VH и VL из моноклонального антитела к ROR1, шарнир, трансмембранный домен CD8 α и цитоплазматический домен, включающий сигнальный домен CD3 дзета и костимуляторный домен 4-1BB; где указанный внеклеточный лигандсвязывающий домен содержит
 вариабельную тяжелую VH цепь, содержащую CDR мышиноного моноклонального антитела H10 с SEQ ID NO: 54 (CDR-H1), SEQ ID NO: 55 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 56 (CDR-H3), и
 вариабельную легкую VL цепь, содержащую CDR мышиноного моноклонального антитела H10 с SEQ ID NO: 59 (CDR-L1), SEQ ID NO: 60 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 61 (CDR-L3); или
 вариабельную тяжелую VH цепь, содержащую CDR мышиноного моноклонального антитела D10 с SEQ ID NO: 28 (CDR-H1), SEQ ID NO: 29 (CDR-H2) и SEQ ID NO: 30 (CDR-H3), и
 вариабельную легкую VL цепь, содержащую CDR мышиноного моноклонального антитела D10 с SEQ ID NO: 33 (CDR-L1), SEQ ID NO: 34 (CDR-L2) и SEQ ID NO: 35 (CDR-L3).
2. ROR1-специфический CAR по п.1, в котором последовательность трансмембранного домена CD8 α по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95% и еще более предпочтительно по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 6.
3. ROR1-специфический CAR по п.1 или 2, в котором шарнир выбран из шарнира CD8 α , шарнира IgG1 и шарнира Fc γ RIII α .
4. ROR1-специфический CAR по п.1 или 2, в котором последовательность шарнира по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95% и еще более предпочтительно по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 4 (CD8 α), SEQ ID NO: 5 (IgG1) и SEQ ID NO: 3 (Fc γ RIII α) для структур V3, V5 и V1 соответственно.
5. ROR1-специфический CAR по любому из пп.1-4, имеющий полипептидную структуру V3, которая содержит шарнир CD8 α , аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 4, и трансмембранный домен CD8 α , аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 6.
6. ROR1-специфический CAR по любому из пп.1-4, имеющий полипептидную структуру V5, которая содержит шарнир IgG1, аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 80%

идентична последовательности SEQ ID NO: 5, и трансмембранный домен CD8 α , аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 6.

7. ROR1-специфический CAR по любому из пп.1-4, имеющий полипептидную структуру V1, которая содержит шарнир Fc γ RIII α , аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 3, и трансмембранный домен CD8 α , аминокислотная последовательность которого по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 6.

8. ROR1-специфический CAR по любому из пп.1-7, в котором указанный внеклеточный лигандсвязывающий домен содержит VH- и VL-цепи, последовательности которых по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95% и еще более предпочтительно по меньшей мере на 99% идентичны SEQ ID NO: 53 (H10-VH) и SEQ ID NO: 58 (H10-VL) соответственно.

9. ROR1-специфический CAR по любому из пп.1-7, в котором указанный внеклеточный лигандсвязывающий домен содержит VH- и VL-цепи, последовательности которых по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95% и еще более предпочтительно по меньшей мере на 99% идентичны SEQ ID NO: 27 (D10-VH) и SEQ ID NO: 32 (D10-VL) соответственно.

10. ROR1-специфический CAR по любому из пп.1-9, в котором указанный внеклеточный лигандсвязывающий домен содержит VH- и VL-цепи из антитела H10 или антитела D10, которые гуманизированы.

11. ROR1-специфический CAR по п.10, в котором указанный внеклеточный лигандсвязывающий домен содержит

VH-цепь, которая кодируется SEQ ID NO: 57, и

VL-цепь, которая кодируется SEQ ID NO: 62.

12. ROR1-специфический CAR по п.10, в котором указанный внеклеточный лигандсвязывающий домен содержит

VH-цепь, которая кодируется SEQ ID NO: 31, и

VL-цепь, которая кодируется SEQ ID NO: 36.

13. ROR1-специфический CAR по п.1, последовательность которого по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, и еще более предпочтительно по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 117 (последовательность H10v3-CAR).

14. ROR1-специфический CAR по п.1, последовательность которого по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, и еще более предпочтительно по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 93 (последовательность D10v3-CAR).

15. ROR1-специфический CAR по п.1, последовательность которого по меньшей мере на 80%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, и еще более предпочтительно по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 95 (последовательность D10v5-CAR).

16. ROR1-специфический CAR по любому из пп.1-15, в котором последовательность указанного костимуляторного домена 4-1BB по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 8.

17. ROR1-специфический CAR по любому из пп.1-16, в котором последовательность указанного сигнального домена CD3 дзета по меньшей мере на 80% идентична SEQ ID NO: 9.

18. ROR1-специфический CAR по любому из пп.1-17, дополнительно содержащий сигнальный пептид.

19. ROR1-специфический CAR по п.1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117 (последовательность H10v3-CAR), SEQ ID NO: 93 (последовательность D10v3-CAR) или SEQ ID NO: 95 (последовательность D10v5-CAR).

20. Полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор по одному из пп.1-18.

21. Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид по п.20.

22. Сконструированная иммунная клетка, экспрессирующая на мембране клеточной поверхности ROR1-специфический химерный антигенный рецептор по любому из пп.1-18, для лечения рака.

23. Сконструированная иммунная клетка по п.22, полученная из воспалительных Т-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов, регуляторных Т-лимфоцитов или хелперных Т-лимфоцитов.

24. Сконструированная иммунная клетка по п.22 или п.23, в которой подавляется экспрессия TCR.

25. Сконструированная иммунная клетка по любому из пп.22-24, которая подвергнута мутации для придания устойчивости по меньшей мере к одному иммунодепрессанту или химиотерапевтическому лекарственному средству.

26. Сконструированная иммунная клетка по любому из пп.22-25, где рак характеризуется присутствием клеток, экспрессирующих ROR1.

27. Сконструированная иммунная клетка по любому из пп.22-25 для лечения гематологического рака, такого как лейкоз.

28. Сконструированная иммунная клетка по п.27, где гематологический рак выбран из группы, включающей хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому

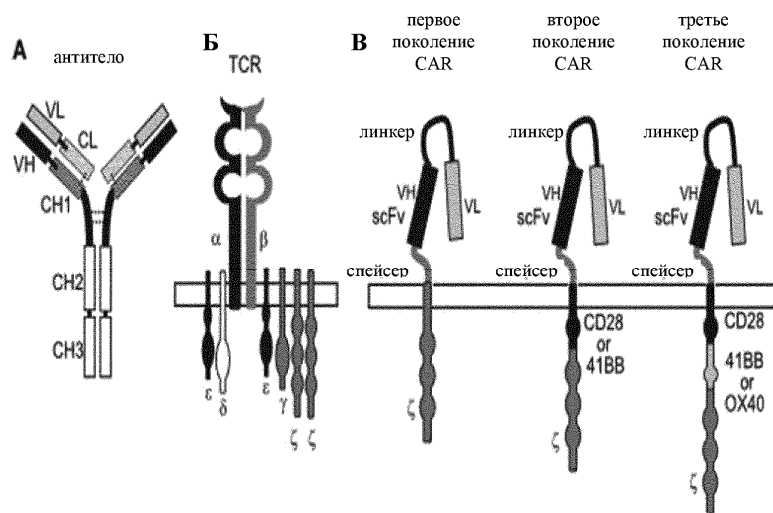
(SLL), острый миелогенный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, миелодиспластический синдром, лимфому из клеток мантии (MCL) и острый лимфобластный лейкоз (ALL) с хромосомной транслокацией t(1;19).

29. Сконструированная иммунная клетка по одному из пп.22-25, предназначенная для лечения солидной злокачественной опухоли.

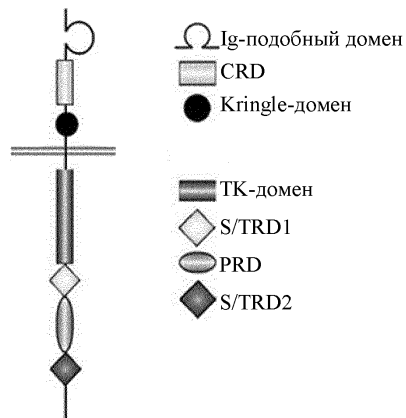
30. Способ лечения пациента, у которого диагностировано предзлокачественное или злокачественное состояние, характеризующееся клетками, экспрессирующими ROR1, включающий:

а) получение иммунной клетки, экспрессирующей на поверхности ROR1-специфический химерный антигенный рецептор по любому из пп.1-19; и

б) введение указанной иммунной клетки указанному пациенту.



Фиг. 1



Фиг. 2

034081

(1)

D10 - VH

[illegible]

IMGT DomainGapAlign-анализ

(11)

[illegible]

Фиг. 3А

(1)

D10 - VL

Figure 1: Schematic representation of the domain architecture of the protein. The top part shows the domain architecture of the protein, with domains labeled as D10_VL, IGRV3-11*01, IGRJ2*01, and YTFQOTKLEIK. The bottom part shows the domain architecture of the protein, with domains labeled as D10_VL, IGRV3-11*01, IGRJ2*01, and YTFQOTKLEIK. The domains are represented by colored boxes and connected by lines. The domains are labeled as D10_VL, IGRV3-11*01, IGRJ2*01, and YTFQOTKLEIK. The domains are represented by colored boxes and connected by lines.

ФИГ. 3Б

(1)

H10 – VH

[illegible]

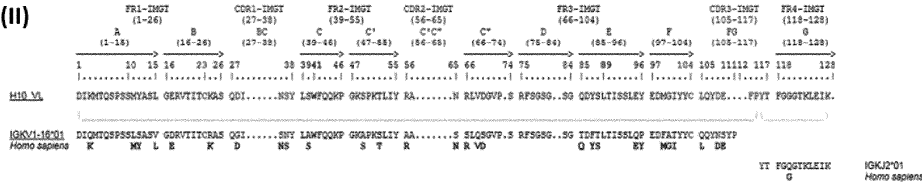
Фиг. 3В

(I)

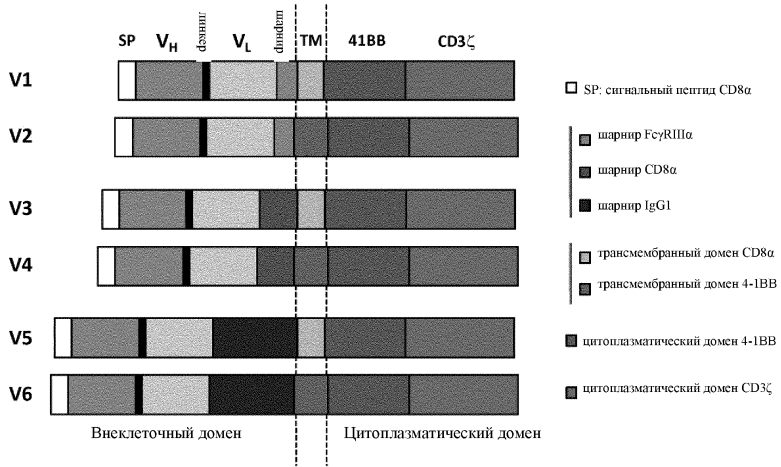
H10 – VL



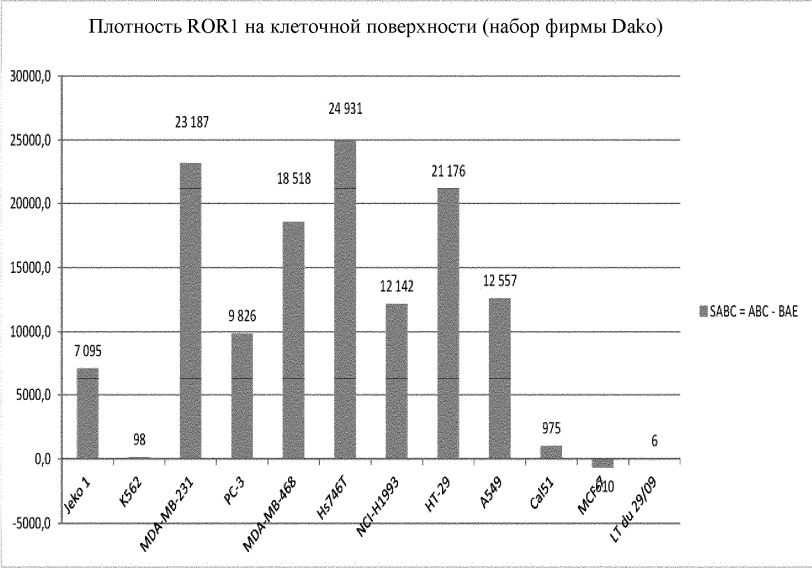
(II)



Фиг. 3Г



Фиг. 4

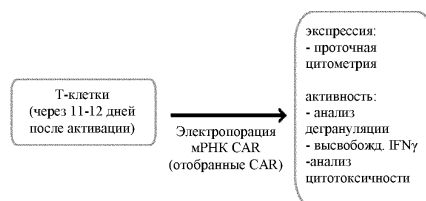


Фиг. 5

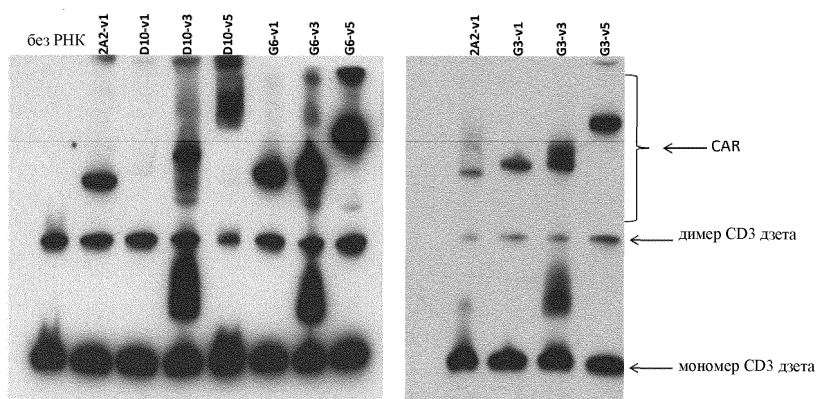
Первая стадия скрининга:



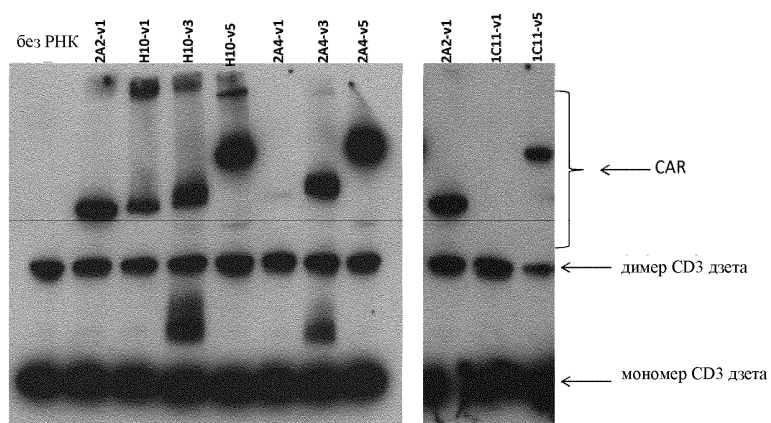
Вторая стадия скрининга:



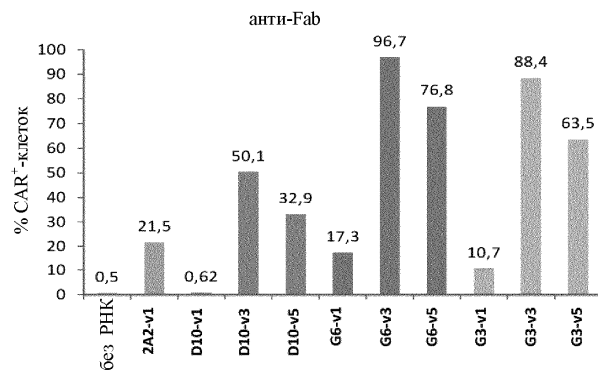
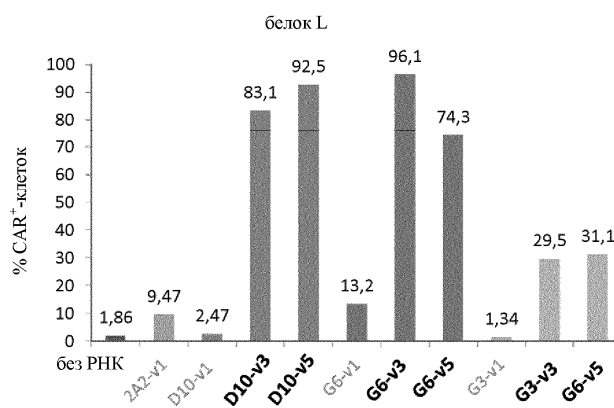
Фиг. 6



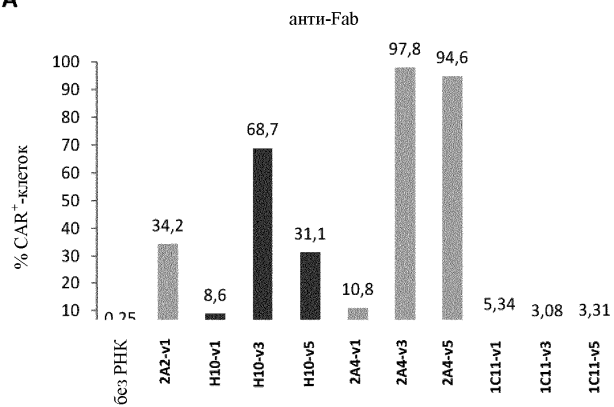
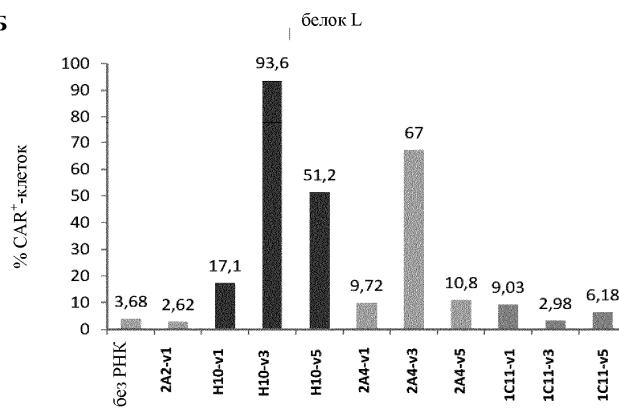
Фиг. 7А



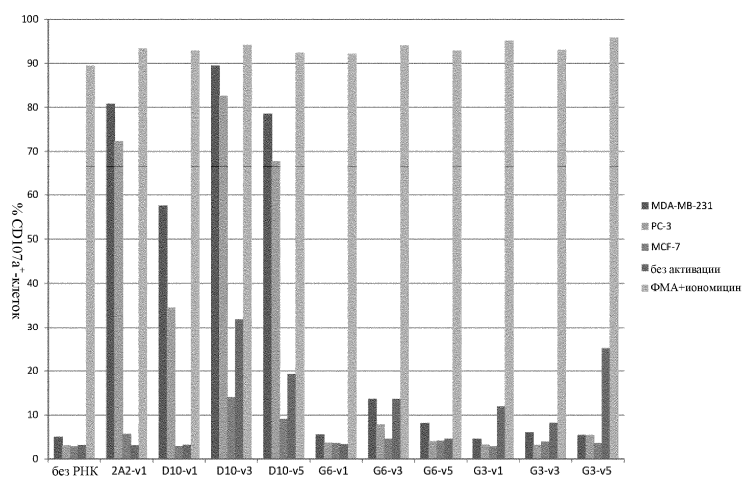
Фиг. 7Б

А**Б**

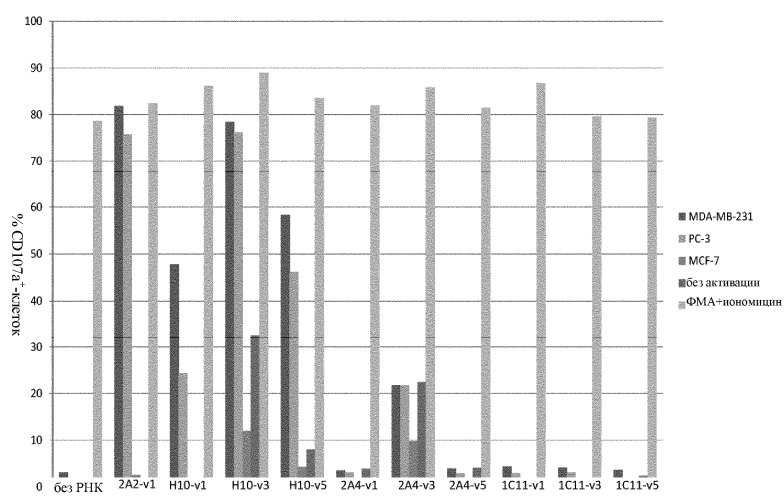
Фиг. 8А

А**Б**

Фиг. 8Б

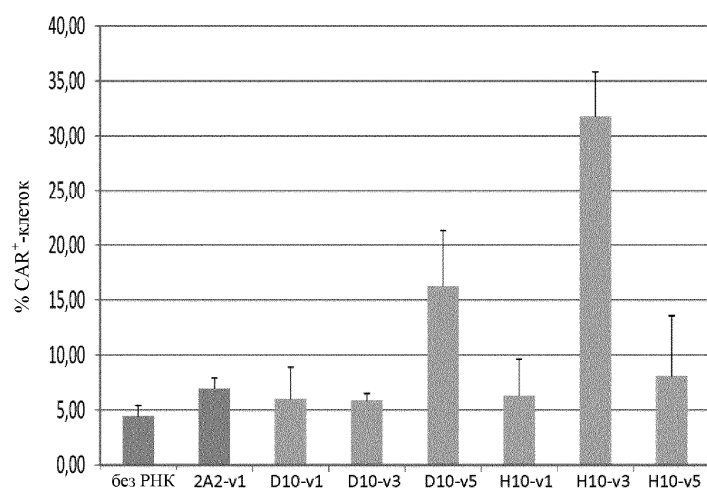


Фиг. 9А

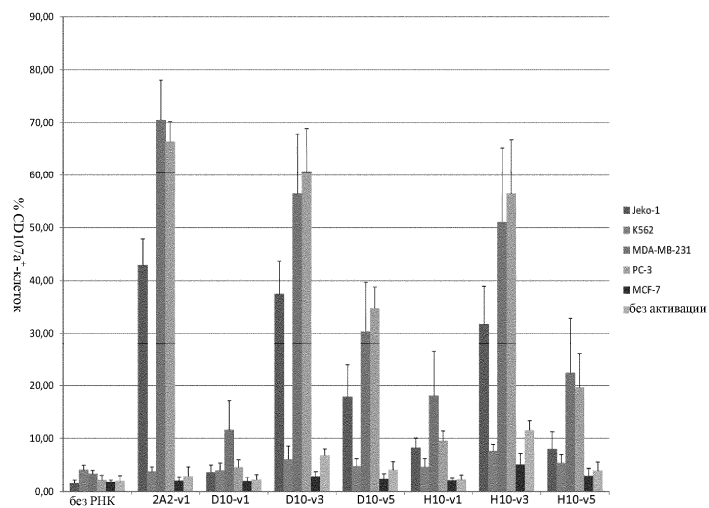


Фиг. 9Б

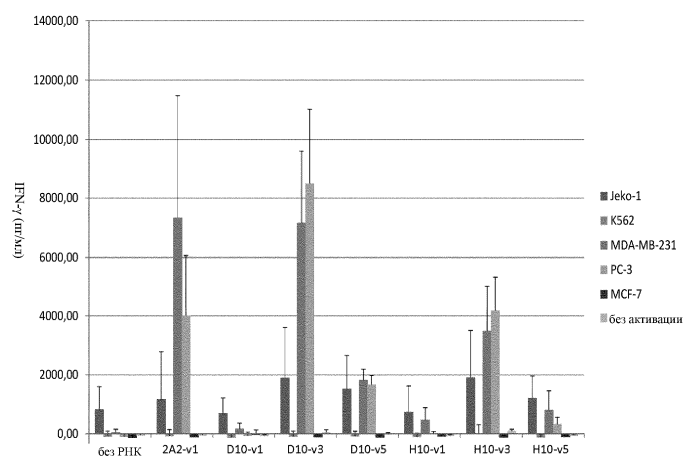
Белок L



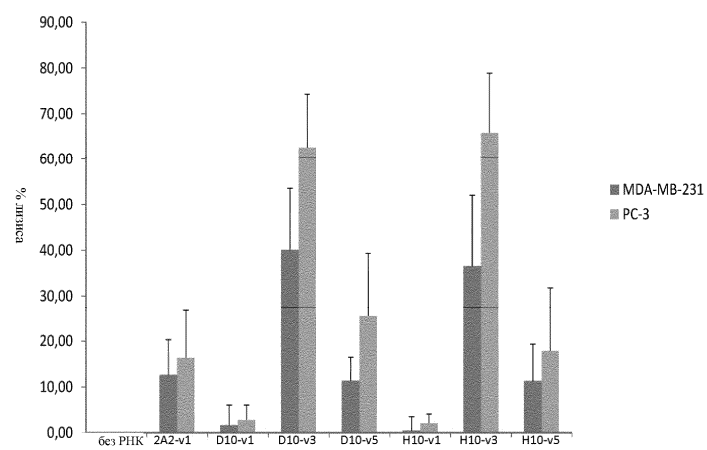
Фиг. 10



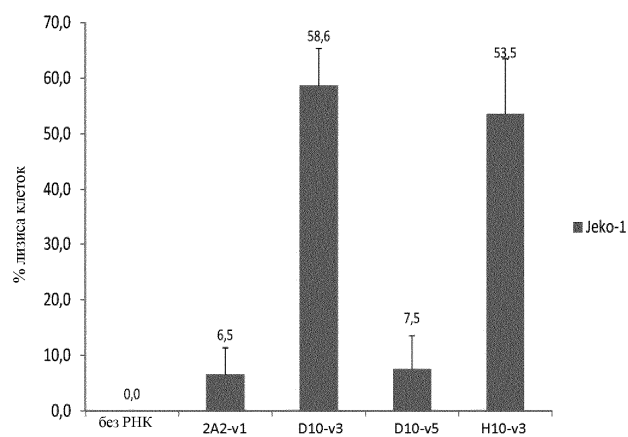
Фиг. 11



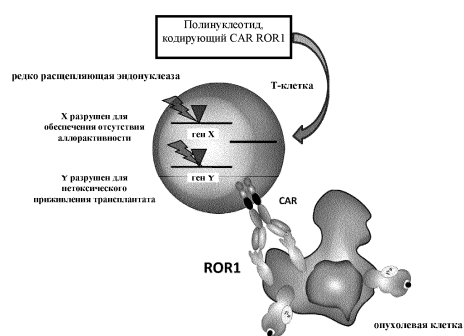
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15