

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039086**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.12.01

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

(21) Номер заявки
201692039

(22) Дата подачи заявки
2015.04.10

(54) ИММУНОГЛОБУЛИНЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ V γ 9V δ 2 Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

(31) **2012604**

paragraph 3 - page 324, left-hand column, paragraph 2, page 326, left-hand column

(32) **2014.04.10**

WO-A1-2013147606

(33) **NL**

US-A-5723309

(43) **2017.05.31**

VECCHI M. ET AL.: "INCREASED

(86) **PCT/NL2015/050235**

JEJUNAL INTRAEPITHELIAL LYMPHOCYTES

(87) **WO 2015/156673 2015.10.15**

BEARING GAMMA-DELTA T-CELL RECEPTOR

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЛАВА ТЕРАПЬЮТИКС Н.В. (NL)

IN DERMATITIS HERPETIFORMIS",

GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER,

PHILADELPHIA, PA, vol. 102, no. 5, 1 May

1992 (1992-05-01), pages 1499-1505, XP009180342,

ISSN: 0016-5085, abstract, page 1500, left-hand

column, paragraph 3; table 1

(72) Изобретатель:

**Ван Дер Влит Йоханнес Йелле,
Де Брейн Рене Корнелия Герарда,
Де Грюейль Тания Дениз, Верхель
Хендрик Маринус Виллем (NL)**

LANGERAK A.W. ET AL.: "IMMUNOPHENOTYPIC

AND IMMUNOGENOTYPIC CHARACTERISTICS OF

TCRGAMMADELTA+ T CELL ACUTE

LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA", LEUKEMIA,

MACMILLAN PRESS LTD, US, vol. 13,

no. 2, 1 February 1999 (1999-02-01), pages

206-214, XP001117463, ISSN: 0887-6924, DOI:

10.1038/SJ/LEU/2401276, page 207, left-hand

column, paragraph 2 - paragraph 3 -

& Anonymous: "TCR Vgamma 9", Beckman

Coulter, Inc. XP002730260, Retrieved from

the Internet: URL: [https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/page/itemDetails?](https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/page/itemDetails?itemNumber=IM1463#2/10/0/25/1/0/asc/2/IM1463///0/1/0/)

itemNumber=IM1463#2/10/0/25/1/0/asc/2/

IM1463///0/1/0/ [retrieved on 2014-09-26], the whole

document

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2013110531**

P. WROBEL ET AL.: "Lysis of a Broad Range of Epithelial Tumour Cells by Human ?? T Cells: Involvement of NKG2D ligands and T-cell Receptor- versus NKG2D-dependent Recognition", SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 66, no. 2-3, 1 August 2007 (2007-08-01), pages 320-328, XP055036582, ISSN: 0300-9475, DOI: 10.1111/j.1365-3083.2007.01963.x, page 321, right-hand column, paragraph 2, page 322, left-hand column, paragraph 2, page 322, right-hand column,

(57) Изобретение относится к области медицины и к области иммунологии, и в частности относится к молекуле иммуноглобулина, связывающей человеческий V γ 9V δ 2 Т-клеточный рецептор, нуклеотидной последовательности, которая кодирует молекулу иммуноглобулина, клетке-хозяину, содержащей указанную нуклеотидную последовательность, способу получения молекулы иммуноглобулина, биспецифическому антителу, применению биспецифического антитела при лечении рака, применению молекулы иммуноглобулина для активации человеческих V γ 9V δ 2 Т-клеток.

B1**039086****039086****B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к области медицины и относится к области иммунологии. Изобретение относится к иммуноглобулинам, связывающим Т-клетки. В частности, настоящее изобретение относится к иммуноглобулинам, связывающим человеческие V γ 9V δ 2 Т-клеточные рецепторы. В настоящем изобретении предлагаются молекулы иммуноглобулинов, которые связываются с человеческим V γ 9V δ 2 Т-клеточным рецептором, такие как антитела, одноцепочечные антитела или однодоменные антитела, где человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки могут модулироваться.

Уровень техники

Большинство лимфоцитов $\gamma\delta$ периферической крови (PBL) у взрослых людей экспрессирует Т-клеточные рецепторы (TCR), содержащие области V γ 9 и V δ 2. V γ 9V δ 2 Т-клетки могут реагировать на широкий спектр патогенов и опухолевых клеток. Понятно, что эта широкая реактивность придается фосфоантигенами, которые способны специфически активировать эту субпопуляцию Т-клеток TCR-зависимым образом. Широкая противомикробная и противоопухолевая реактивность V γ 9V δ 2 Т-клеток предполагает непосредственное участие в иммунном контроле раковых заболеваний и инфекций. В дополнение к борьбе с заболеваниями, при некоторых заболеваниях или при терапевтическом лечении V γ 9V δ 2 Т-клетки могут быть сверхстимулированы или самопроизвольно активированы.

Следовательно, агенты, которые могут активировать V γ 9V δ 2 Т-клетки, могут быть полезны при лечении инфекций или рака, поскольку они могут стимулировать V γ 9V δ 2 Т-клеточную реактивность по отношению к патогену или к инфицированным клеткам или к раку. Кроме того, агенты, которые блокируют активацию V γ 9V δ 2 Т-клетки, могут быть полезны при заболеваниях или при терапевтическом лечении в случае, где предпочтительно уменьшение активации V γ 9V δ 2 Т-клеток, т.е., где V γ 9V δ 2 Т-клетки сверхстимулированы или самопроизвольно активированы. Наконец, агенты, которые могут связываться с V γ 9V δ 2 Т-клеткой, но не оказывают влияние на (фосфоантигенную) активацию V γ 9V δ 2 Т-клеток, применяются для меченых клеток, например, для селекции или идентификации V γ 9V δ 2 Т-клеток. Следовательно, в данной области существует необходимость в предоставлении агентов, которые могут связываться с V γ 9V δ 2 Т-клетками, а также агентов, которые могут блокировать фосфоантигенную активацию V γ 9V δ 2 Т-клеток или могут активировать V γ 9V δ 2 Т-клетки.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предлагаются новые агенты, которые могут связываться с V γ 9V δ 2 Т-клетками. Предложенные агенты представляют собой иммуноглобулины. Предложенные иммуноглобулины связываются с V γ 9V δ 2 Т-клеточным рецептором. Удивительно, но было установлено, что предложенные настоящим изобретением иммуноглобулины обладают существенной идентичностью последовательности. Следовательно, в первом аспекте изобретения предлагаются молекулы иммуноглобулинов, связывающиеся с человеческими V γ 9V δ 2 Т-клеточными рецепторами, содержащие область CDR1 и область CDR2, где область CDR1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 40% идентичности последовательности с аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 GRTFSNYAMG; и где область CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32 AISWSGGSTYYADSVKG; где предпочтительно молекула иммуноглобулина представляет собой однодоменное антитело.

Кроме того, такие иммуноглобулины содержат область CDR3, которая способствует связыванию V γ 9V δ 2 Т-клеточного рецептора и может оказывать влияние на действие молекулы иммуноглобулина. Это может, безотносительно к теории, вовлекать последовательность CDR3 в функциональность молекулы иммуноглобулина, т.е. тип модуляции, такой как блокирование активации V γ 9V δ 2 Т-клеток, индуцирование активации V γ 9V δ 2 Т-клеток, или ни блокирование активации, ни индуцирование активации V γ 9V δ 2 Т-клеток. Иммуноглобулины по изобретению предназначены, в частности, для применения в терапевтическом лечении и для применения в анализах, включающих V γ 9V δ 2 Т-клетки.

Предпочтительно молекулы иммуноглобулинов по изобретению содержат область CDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 3, 6, 9, 11, 14, 17, 20, 22, 25, 27, 29, 30, 33, 35, 37, 40, 43 и 46. Эти области CDR3, объединенные с последовательностями CDR1 и CDR2, предлагаются для связывания и функций, как описано подробно ниже.

Чертежи

Фиг. 1: выравнивание последовательностей VHH, где указаны каркасные области (1, 2, 3 и 4), а также CDR1, CDR2 и CDR3. Указан также код для каждой из VHH (т.е. 5C7 представляет собой последовательность VHH 5C7).

Фиг. 2: VHH 5E7 и VHH 6F6 не активируют V γ 9V δ 2 Т-клетки. Данные указывают на относительную экспрессию маркера активации CD25, провоспалительного цитокина IFN- γ , и цитотоксической молекулы гранзима В V γ 9V δ 2 Т-клетками, полученными от здоровых доноров, по сравнению с положительным контролем (клетки HeLa, экспрессирующие фосфоантиген (pAg+)).

Фиг. 3: VHN 5E7 нейтрализует индуцированную фосфоантигеном активацию V γ 9V δ 2 Т-клеток, полученных от здоровых доноров. Характерный пример демонстрирует дозозависимую нейтрализацию phosphoAg-индуцированной активации V γ 9V δ 2 Т-клеток с использованием VHN 5E7, в то время как неспецифическое VHN (отрицательный контроль) не может нейтрализовать phosphoAg-индуцированную активацию V γ 9V δ 2 Т-клеток. На вертикальной оси указана активация V γ 9V δ 2 Т-клеток согласно оценке экспрессии CD25, на горизонтальной оси указаны различные концентрации VHN. Стимулирование V γ 9V δ 2 Т-клеток проводили с использованием клеток HeLa, экспрессирующих фосфоантиген, полученных путем предварительной обработкой клеток HeLa увеличивающимися дозами аминокислот фосфонат памидроната (что приводит к увеличению уровня экспрессии фосфоантигена клетками HeLa).

Фиг. 4: V γ 9V δ 2 TCR-специфичные VHN способны индуцировать активацию и продуцирование цитокинов в V γ 9V δ 2 Т-клетках, полученных от здоровых доноров. Данные указывают на относительную экспрессию маркера активации CD25 и провоспалительного цитокина IFN- γ в V γ 9V δ 2 Т-клетках, полученных от здоровых доноров, по сравнению с положительным контролем (клетки HeLa, экспрессирующие фосфоантиген (PAG +); стандартизированные к 1) и к отрицательному контролю VHN. Каждый столбец представляет индивидуальные V γ 9V δ 2 TCR-специфичные VHN; индивидуальные VHN различаются по их способности индуцировать активацию и продуцирование цитокинов в V γ 9V δ 2 Т-клетках.

Фиг. 5: дозозависимая активации V γ 9V δ 2 Т-клеток, полученных от здоровых доноров. Данные показывают изменения в экспрессии CD25 (MFI) через 24 ч стимуляции с использованием увеличивающихся концентраций (10-100-500 nM) либо неактивирующих анти-V γ 9V δ 2 TCR VHN или активирующих анти-V γ 9V δ 2 TCR VHN.

Фиг. 6: V γ 9V δ 2 TCR-специфичные VHN могут стимулировать смерть опухолевых клеток при слиянии с VHN, специфичными к опухолевому антигену, в виде биспецифической молекулы. Характерный пример эксперимента, в котором V γ 9V δ 2 Т-клетки совместно культивировали в течение ночи вместе с опухолевой клеточной линией A431 в присутствии (вместе с) или в отсутствии (без) конструктора биспецифического нанотела, состоящего из VHN, специфичного к опухолевому антигену, слитого с активирующим анти-V γ 9V δ 2 TCR VHN. Данные показывают экспрессию CD25 (активация), и экспрессию CD107a (дегрануляция) V γ 9V δ 2 Т-клеток и 7AAD⁺ опухолевых клеток (выявляя гибель опухолевых клеток).

Фиг. 7: специфичность связывания с Т-клеточным рецептором V γ 9 и/или V δ 2, как определено с помощью проточной цитометрии: репрезентативная гистограмма проточной цитометрии показывает связывание V γ 9V δ 2 TCR-специфичных VHN (открытая гистограмма) и отрицательного контроля VHN (заполненная гистограмма) с V γ 9V δ 2 TCR-экспрессирующими клетками.

Фиг. 8: клон VHN 5C7 не активирует V γ 9V δ 2 Т-клетки, полученные от здоровых доноров, ни нейтрализует фосфоантиген-индуцированную активацию V γ 9V δ 2 Т-клеток, полученных от здоровых доноров. Характерный пример, демонстрирующий отсутствие как ингибирующего, так и активирующего эффекта VHN 5C7 в отношении phosphoAg-индуцированной активации V γ 9V δ 2 Т-клеток. На вертикальной оси указана активация V γ 9V δ 2 Т-клеток согласно оценке экспрессии CD25, на горизонтальной оси указаны различные концентрации VHN. Стимулирование V γ 9V δ 2 Т-клеток проводили с использованием фосфоантиген-экспрессирующих клеток HeLa, получаемых путем предварительной обработки клеток HeLa возрастающими дозами аминокислот фосфонат памидроната (что приводило к увеличению уровня экспрессии фосфоантигена клетками HeLa).

Фиг. 9: схематическое изображение иммуноглобулинов: А) антитело человека, состоящее из двух тяжелых цепей и двух легких цепей; В) одноцепочечное антитело (или антитело, содержащее только тяжелую цепь), состоящее из двух одиночных цепей (или двух тяжелых цепей), которые могут димеризоваться с помощью дисульфидных мостиков, где каждая цепь содержит переменный домен. Такое одноцепочечное антитело (или антитело, содержащее только тяжелую цепь) может быть антителом ламы; С) однодоменное антитело содержит один переменный домен антитела, например, из одноцепочечного антитела (или антитела, содержащего только тяжелую цепь). Однодоменное антитело может состоять только из области связывания, как показано. Переменный домен обозначен серым цветом, в то время как константные области обозначены белым цветом. Переменный домен легкой цепи обозначен черным цветом.

Определения

В приведенном ниже описании и в примерах используется ряд терминов. Для того чтобы обеспечить ясное и последовательное понимание описания и формулы изобретения и положений, в том числе объема, которые будут обеспечиваться такими терминами, представлены следующие определения. Если иное не определено в настоящем описании, то все технические и научные термины имеют такое же значение, которое обычно используют обычные специалисты в данной области, к которой принадлежит данное изобретение. Раскрытие всех публикаций, патентных заявок, патентов и других ссылок включено в данное описание в полном объеме в качестве ссылки.

Осуществление традиционных методов, используемых в способах по изобретению, будет очевидно специалисту в данной области. Практика обычных методов в области молекулярной биологии, биохимии

мии, вычислительной химии, клеточной культуры, рекомбинантной ДНК, биоинформатики, геномики, секвенирования и в смежных областях хорошо известны специалистам в данной области и описаны, например, в следующей литературе: Sambrook et al., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1987 и периодические переиздания; и серии *Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego.

В данном описании и в формуле изобретения глагол "содержать" и его спряжения используется в его не ограничивающем смысле и означает, что элементы, следующие за словом, включены, но при этом пункты, не указанные конкретно, не исключены. Он включает в себя глаголы "состоящий по существу из", а также "состоящий из".

Используемые в настоящем описании формы единственного числа включают в себя множественное число, если из контекста явно не следует иное. Например, способ выделения ДНК-молекулы, как использовано выше, включает в себя выделение множества молекул (например, 10, 100, 1000, 10 тысяч, 100 тысяч, миллионы или более молекул).

Выравнивание (aligning и alignment): термином "выравнивание" обозначают сравнение двух или более аминокислотных последовательностей на основе присутствия коротких или длинных отрезков идентичных или сходных аминокислот. Известно несколько методов выравнивания аминокислотных последовательностей в данной области, которые будут дополнительно описаны ниже. С помощью термина "выравнивание" также обозначают сравнение двух или более нуклеотидных последовательностей на основе присутствия коротких или длинных отрезков идентичных или сходных нуклеотидов. В данной области известно несколько методов выравнивания нуклеотидных последовательностей, которые будут дополнительно описаны ниже.

"Экспрессия гена" или "экспрессия белка" относится к процессу, в котором область ДНК, которая функционально связана с соответствующими регуляторными областями, в частности, с промотором, транскрибируется в РНК, которая способна транслироваться с помощью механизма клетки в белок или пептид (или активный пептидный фрагмент), который кодируется нуклеотидной последовательностью, или которая активна сама по себе (например, в посттранскрипционном сайленсинге генов или РНКи).

Используемый в данном описании термин "функционально связанный" относится к связыванию полинуклеотидных элементов в функциональном отношении. Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", если она помещена в функциональную взаимосвязь с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор или скорее регуляторная последовательность транскрипции функционально связана с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию кодирующей последовательности. "Функционально связанный" означает, что последовательности ДНК, будучи связанными, как правило, непрерывны и, если необходимо, соединяет две или более областей, кодирующих белок, непрерывных и в рамке считывания.

Термин "генетический конструкт" означает ДНК-последовательность, содержащую область (транскрибируемую область), которая транскрибируется в молекулы РНК (например, мРНК) в клетке, функционально связанную с соответствующими регуляторными областями (например, с промотором). Генетический конструкт может, таким образом, содержать нескольких функционально связанных последовательностей, таких как промотор, 5'-лидерная последовательность, включая например, последовательности, участвующие в инициации трансляции, (белок) кодирующую область, донорный и акцепторный сайты сплайсинга, интронные и экзонные последовательности, и 3' нетранслируемая последовательность (также известная как 3' нетранслируемая последовательность или 3'-UTR), содержащая, например, последовательности сайтов терминации транскрипции.

"Идентичность последовательности" является мерой идентичности нуклеотидных последовательностей или аминокислотных последовательностей. Как правило, последовательности выравнивают таким образом, что получается самый высокий порядок соответствия. "Идентичность" сама по себе имеет признанное в данной области значение и может быть рассчитана с использованием опубликованных методов. См., например, *COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I*, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; и *SEQUENCE ANALYSIS PRIMER*; Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991. В то время как существует ряд методов для измерения идентичности между двумя полинуклеотидными или полипептидными последовательностями, термин "идентичность" хорошо известен специалистам в данной области (Carillo, H., and Lipton, D., *SIAM J. Applied Math* (1988) 48:1073). Методы, обычно применяемые для определения идентичности или сходства между двумя последовательностями, включают, но не ограничиваются этим, те, которые раскрыты в настоящем руководстве *GUIDE TO HUGE COMPUTERS*, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994, and Carillo, H., and Lipton, D., *SIAM J. Applied Math* (1988) 48:1073. Методы определения идентичности и сходства кодифицированы в компьютерных программах. Предпочтительные способы компьютерных программ для определения идентичности и сходства между двумя последовательностями вклю-

чают, но не ограничиваются ими, пакет программ GCS (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* (1984) 12(1):387), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S. F. et al., *J. Molec. Biol.* (1990) 215:403).

В качестве иллюстрации, с помощью аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, например, 70% "идентичность последовательности" с эталонной аминокислотной последовательностью из SEQ ID NO: 31, предполагается, что аминокислотная последовательность идентична эталонной последовательности за исключением того, что полипептидная последовательность может включать до 3 аминокислотных изменений на каждую из 10 аминокислот эталонной аминокислоты SEQ ID NO: 31. Следовательно, процент идентичности аминокислотной последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью должен быть рассчитан по всей длине эталонной аминокислотной последовательности. Другими словами, чтобы получить аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичной с эталонной аминокислотной последовательностью, вплоть до 30% аминокислотных остатков в эталонной последовательности могут быть удалены или заменены другими аминокислотами, или аминокислоты в количестве до 30% от общего количества аминокислотных остатков в эталонной последовательности могут быть вставлены в эталонную последовательность. Эти изменения эталонной последовательности могут происходить на N- или C-концевых положениях эталонной аминокислотной последовательности или в любом месте между этими концевыми положениями, вразброс либо индивидуально среди остатков в эталонной последовательности, или в одной или в нескольких смежных группах внутри эталонной последовательности.

"Нуклеиновая кислота" или "последовательность нуклеиновой кислоты" согласно настоящему изобретению могут включать любой полимер или олигомер пиримидиновых и пуриновых оснований, предпочтительно цитозина, тимина и урацила, и аденина и гуанина соответственно (см. Albert L. Leninger, *Principals of Biochemistry*, at 793-800 (Worth Pub., 1982), который включен в данное описание в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей). Настоящее изобретение рассматривает любой дезоксирибонуклеотид, рибонуклеотид или пептидный компонент нуклеиновой кислоты и любые их химические варианты, такие как метилированные, гидроксиметилированные или гликозилированные формы этих оснований и тому подобное. Полимеры или олигомеры могут быть гетерогенными или гомогенными по составу, и могут быть выделены из природных источников или могут быть получены искусственно или синтетическим путем. Кроме того, нуклеиновые кислоты могут представлять собой ДНК или РНК, или их смесь и могут существовать постоянно или временно в одноцепочечной или двухцепочечной форме, включая гомодуплекс, гетеродуплекс и гибридные состояния.

Используемый в данном описании термин "рак" относится или описывает физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется неконтролируемым ростом клеток. Примеры рака включают, но не ограничиваются ими, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак легкого, рак предстательной железы, печеночно-клеточный рак, рак желудка, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, рак мочевыводящих путей, рак щитовидной железы, рак почки, карциному, рак кожи, рак крови, лейкоз, меланому, рак головы и шеи, а также рак мозга. Используемый в данном описании термин "рак" также относится к злокачественному новообразованию.

Термины "аминокислотная последовательность", или "белок", или "пептид" относятся к молекулам, состоящим из цепи аминокислот, без ссылки на конкретный механизм действия, размер, трехмерную структуру или происхождение. Его "фрагмент" или "часть" может, таким образом, по-прежнему называться "аминокислотной последовательностью", или "белком", или "пептидом". "Выделенная аминокислотная последовательность" используется для обозначения аминокислотной последовательности, которая больше не находится в своей исходной природной среде, например, *in vitro* или в рекомбинантной бактериальной или человеческой клетке-хозяине.

"Т-клетки" или "Т-лимфоциты" принадлежат к группе белых кровяных клеток, называемых лимфоциты, которые играют роль в клеточно-опосредованном иммунитете. Т-клетки происходят из гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге, созревают в тимусе (т.е. отсюда происходит Т), и приобретают их полную функцию в периферических лимфоидных тканях. В процессе развития Т-клеток, CD4⁺CD8⁻ Т-клетки (отрицательные как по CD4, так и по CD8 ко-рецептору) развиваются либо до $\alpha\beta$ или до $\gamma\delta$ в результате первоначальной перестановки β или δ гена TCR. Клетки, которые подвергаются ранней перестановке бета цепи, экспрессируют пре-TCR структуру, состоящую из полной бета-цепи и пре-TCR α -цепи на поверхности клетки. Такие клетки переключаются на состояние CD4⁺CD8⁺, осуществляют перестановку локуса TCR α -цепи, и экспрессируют зрелый $\alpha\beta$ TCR на поверхности. CD4⁺CD8⁻ Т-клетки, которые успешно завершили перестановку гена γ перед перестановкой β -гена, экспрессируют функциональный $\gamma\delta$ TCR и остаются CD4⁺CD8⁻. (Claudio Tripodo et al. *Gamma delta T cell lymphomas Nature Reviews Clinical Oncology* 6, 707-717(December 2009). Т-клеточный рецептор ассоциирует с белковым комплексом CD3. Зрелые Т-клетки, т.е. экспрессирующие $\alpha\beta$ TCR или $\gamma\delta$ TCR, экспрессируют комплекс Т-клеточного рецептора на поверхности клеток. $\gamma\delta$ Т-клетки, которые составляют примерно 1-5% от общей популяции Т-клеток в периферической крови человека, можно разделить на дополнительные подгруппы. Субпопуляция $\gamma\delta$ Т-клеток составляет V γ 9V δ 2 Т-клетки, которые экспрессируют V γ 9V δ 2 TCR. Внутри внеклеточного домена Т-клеточного рецептора располагаются области, определяющие комплементарность (CDR1,

CDR2, CDR3). Эти области в целом представляют собой наиболее переменные домены и вносят существенный вклад в разнообразие среди TCR. CDR-области составляются в процессе развития Т-клетки, где так называемый переменный сегмент (V) гена, сегмент разнообразия- (D), и соединения- (J) случайным образом объединены с получением различных TCR.

"V γ 9V δ 2 Т-клетки" представляют собой клетки, которые могут быть функционально определены в том, что они специфично и быстро активируются с помощью набора непептидных фосфорилированных изопреноидных предшественников, собирательное название которых фосфоантигены. Фосфоантигены продуцируются практически во всех живых клетках. Наиболее распространенным фосфоантигеном, обнаруженным в животных и человеческих клетках (включая раковые клетки) является изопентенил пирогосфат (IPP) и его изомер диметилаллил пирогосфат (DMAPP). IPP является метаболитом из пути мевалоната. (Е)-4-гидрокси-3-метил-бут-2-енилпирогосфат (HMBPP или HMB-PP) является промежуточным продуктом не мевалонатного пути. HMBPP является существенным метаболитом у наиболее патогенных бактерий, включая микобактерии туберкулеза, а также у паразитических простейших, таких как плазмодий (вызывающий малярию) и токсоплазма. Активация V γ 9V δ 2 Т-клеток включает в себя клональную наработку, цитотоксическую активность и экспрессию цитокинов. "V γ 9V δ 2 Т-клетки" также определяются экспрессией V γ 9V δ 2 Т-клеточного рецептора. Например, клетки могут быть выбраны с использованием антитела, специфичного для V γ 9V δ 2 Т-клеточного рецептора, такого как описано ниже. Эти выбранные клетки подверглись перестройке гена γ и δ , и кодируют цепь V γ 9 Т-клеточного рецептора и цепь V δ 2 Т-клеточного рецептора. Из таких отобранных клеток может быть определена последовательность нуклеиновой кислоты (или аминокислоты), соответствующая цепи V γ 9 Т-клеточного рецептора и цепи V δ 2 Т-клеточного рецептора.

Специалист в данной области вполне способен выбрать и/или идентифицировать клеточные популяции, характеризующиеся экспрессией антигена или рецептора на клеточной поверхности, так как описано в данном документе. Понятно, что в отношении экспрессии на поверхности клеток, как например CD3, CD4, CD8, CD25, CD69, $\gamma\delta$ TCR и V γ 9V δ 2 TCR, это обычно происходит в популяции клеток, из которых часть клеток имеет гораздо более высокий уровень экспрессии антигена или рецептора по сравнению с клетками, имеющими более низкий уровень экспрессии.

Следовательно, термины положительные или отрицательные, следует понимать как относительные, т.е. положительные клетки имеют значительно более высокий уровень экспрессии по сравнению с клетками, являющимися отрицательными. Клетки, являющиеся отрицательными в этом смысле, могут, таким образом, по-прежнему иметь уровень экспрессии, который может быть детектирован. Экспрессия на поверхности клеток, может быть проанализирована с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), и многие специфические антитела являются коммерчески доступными, например, такие как для CD3, CD4, CD8, CD25, CD69, $\gamma\delta$ TCR, V γ 9 TCR цепи и V δ 2 TCR цепи, которые подходят для такого анализа FACS, такие как доступные и описанные в примерах. Такие специфические антитела представляют собой иммуноглобулины, которые связываются с их соответствующим антигеном или рецептором. Следовательно, V γ 9V δ 2 Т-клетки также могут быть определены и выбраны как положительные для V γ 9V δ 2 TCR в FACS. Антитела, пригодные для FACS или аналогичных методов разделения (такие как, например, антитела, конъюгированные с использованием магнитных шариков) широко доступны. Условия выбраны, например, так, как это предусмотрено производителем антител, что позволяет осуществлять отбор отрицательных и/или положительных клеток. Примеры антител, которые могут быть пригодны для отбора V γ 9V δ 2 Т-клеток или сконструированных V γ 9V δ 2 Т-клеток, таких как доступные из BD Pharmingen (BD, 1 Becton Drive, Franklin Lakes, NJ USA), представляют собой V γ 9-PE (клон B3, # 555733), V δ 2-FITC (клон B6, # 555738), $\gamma\delta$ TCR-APC (клон B1, # 555718) или, например, доступные от Beckman Coulter представляют собой пан- $\gamma\delta$ TCR-PE (клон IMM510, # IM1418U). Примерами антител, которые могут быть пригодны для детектирования CD25 и CD69, являются CD25-PE (клон M-A251, # 555432) и CD69-FITC (клон L78, # 347823), доступные от BD Pharmingen.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к молекуле иммуноглобулина, связывающей человеческий V γ 9V δ 2 Т-клеточный рецептор, содержащей область CDR1, область CDR2 и область CDR3, где область CDR1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 40% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31 GRTFSNYAMG, и где область CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32 AISWSGGSTY-YADSVKG; и где область CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 6, 9, 11, 14, 17, 20, 22, 25, 29, 33, 35 и 46, и где молекулой иммуноглобулина является молекула иммуноглобулина, которая активирует человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки.

Вариантом настоящего изобретения является молекула иммуноглобулина, отличающаяся тем, что область CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% иден-

тичности последовательности с SEQ ID NO: 32 AISWSGGSTYYADSVKG, где указанная аминокислотная последовательность содержит Т в положении 9, А в положении 12, и V в положении 15.

Другим вариантом настоящего изобретения является молекула иммуноглобулина, отличающаяся тем, что молекула иммуноглобулина представляет собой одноцепочечное антитело.

Другим вариантом настоящего изобретения является молекула иммуноглобулина, отличающаяся тем, что молекула иммуноглобулина представляет собой однодоменное антитело.

Другим вариантом настоящего изобретения является молекула иммуноглобулина, содержащая одну или несколько каркасных областей, выбранных из группы, аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 67-70.

Другим вариантом настоящего изобретения является молекула иммуноглобулина, отличающаяся тем, что молекула иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы аминокислотных последовательностей, состоящих из SEQ ID NO: 48-57, 59, 61, 62 и 66.

Настоящее изобретение относится к нуклеотидной последовательности, которая кодирует вышеуказанную молекулу иммуноглобулина.

Настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вышеуказанную нуклеотидную последовательность.

Настоящее изобретение относится к способу получения вышеуказанной молекулы иммуноглобулина: культивирование вышеуказанной клетки-хозяина; обеспечение экспрессии иммуноглобулина в клетке-хозяине; выделение иммуноглобулина.

Настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу, состоящему из двух связанных между собой однодоменных антител, где первое однодоменное антитело представляет собой вышеуказанную молекулу иммуноглобулина, содержащую вышеуказанные области CDR1, CDR2 и CDR3, а второе однодоменное антитело связывается с раковой клеткой.

Настоящее изобретение относится к применению вышеуказанного биспецифического антитела при лечении рака.

Настоящее изобретение относится к применению вышеуказанной молекулы иммуноглобулина для активации человеческих V γ 9V δ 2 Т-клеток.

В первом аспекте изобретения, предлагается молекула иммуноглобулина, связывающая человеческий V γ 9V δ 2 Т-клеточный рецептор, содержащая область CDR1 и область CDR2, где область CDR1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 40% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31 GRTFSNYAMG; где область CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32 AISWSGGSTYYADSVKG; где предпочтительно молекула иммуноглобулина представляет собой однодоменное антитело.

Молекула иммуноглобулина согласно изобретению, связывающая V γ 9V δ 2 Т-клеточный рецептор, представляет собой молекулу иммуноглобулина, которая связывается, например, с V γ 9V δ 2 Т-клеточным рецептором, таким как определенный аминокислотными последовательностями цепи V γ 9- и V δ 2 Т-клеточного рецептора, представленными в SEQ ID NO: 71 и 72. Связывание с таким Т-клеточным рецептором может детектироваться, например, с помощью анализа FACS, такого, как описано в разделе примеров. Например, клетки, экспрессирующие V γ 9V δ 2 Т-клеточный рецептор, например, SEQ ID NO: 71 и 72, вводят в контакт либо с контрольной молекулой иммуноглобулина, либо с молекулой иммуноглобулина, связывающейся с V γ 9V δ 2 Т-клеточным рецептором. В качестве альтернативы, V γ 9V δ 2 Т-клетки, полученные от здорового донора-человека, как описано в примерах, можно привести в контакт либо с контрольной молекулой иммуноглобулина, либо с молекулой иммуноглобулина, связывающейся с V γ 9V δ 2 Т-клеточным рецептором. Количество иммуноглобулина, связанного с клеткой, увеличивается, когда специфическую молекулу иммуноглобулина сравнивают с контрольной молекулой иммуноглобулина, которая не связывается с V γ 9V δ 2 Т-клеточным рецептором (см., например, фиг. 7). Молекула иммуноглобулина, связывающаяся с человеческим V γ 9V δ 2 Т-клеточным рецептором, согласно настоящему изобретению может быть определена, например, как иммуноглобулин, который приводит минимум к 2-кратному увеличению средней интенсивности флуоресценции (MFI) по сравнению с контрольным иммуноглобулином, как определено с помощью проточной цитометрии. MFI представляет собой среднее значение интенсивности флуоресценции в выбранном флуоресцентном канале (FITC, PE, PerCP и т.д.). В качестве отрицательного антитела может использоваться однодоменное антитело (или VHH, нанотело) против азокрасителя "reactive red 6" (RR6) (Spinelli S et al. Biochemistry 2000;39:1217-1222). Следовательно, специалист в данной области вполне способен выбрать подходящие условия для определения связывания молекулы иммуноглобулина с V γ 9V δ 2 Т-клеточным рецептором. Связывание иммуноглобулина может быть выражено в виде специфичности и аффинности. Специфичность определяет, какой антиген или его эпитоп связывается молекулой иммуноглобулина.

"Молекула иммуноглобулина" (сокращенно "Ig"), используемая в данном документе, хорошо известна в данной области и включает в себя термин "антитело". Термин "иммуноглобулин", используемый в данном документе, относится к любому полипептиду, содержащему антигенсвязывающий сайт с об-

ластями, определяющими комплементарность (CDR). Термин включает, но не ограничивается этим, антитела, моноклональные антитела, моноспецифичные антитела, мультиспецифические антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, человеческие антитела, одноцепочечные антитела, антитела, содержащие только тяжелую цепь, антитела ламы, однодоменные антитела и нанотела (например, VHH). Термин "молекула иммуноглобулина" может также включать в себя фрагменты иммуноглобулина, такие как Fab, F(ab')₂, Fv, ScFv, Fd, dAb и другие фрагменты антител или другие конструкторы, содержащие CDR, которые сохраняют антигенсвязывающую функцию. Как правило, такие фрагменты содержат антигенсвязывающий домен. Молекулы иммуноглобулинов или их фрагменты могут относиться к любому из известных изоформ антител и их конформаций, например, IgA, таким как IgA1 или IgA2, IgD, IgE, IgG, такие как IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, или класс IgM, или могут представлять собой смеси в любой их комбинации, такие как смесь антител из IgG1 и IgG2a класса.

Имуноглобулины представляют собой белки, связанные с иммунной системой. Человеческие антитела состоят из четырех полипептидов - две тяжелые цепи и две легкие цепи, соединенные с образованием "Y"-образной молекулы (см. фиг. 9A). Аминокислотная последовательность на концах "Y" сильно варьирует среди различных антител. Каждый из концов содержит специфичность для связывания антигена. Варибельная область человеческих антител включает в себя концы легких и тяжелых цепей, т.е. варибельные домены легкой и тяжелой цепей. Константная область определяет механизм, используемый, например, для активации иммунной системы.

Антитела делятся на пять основных классов, IgM, IgG, IgA, IgD и IgE, на основе структуры константной области их тяжелой цепи и иммунной функции. Также известны подклассы тяжелой цепи. Например, тяжелые цепи IgG у человека могут относиться к любому из подклассов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Каждая цепь, т.е. молекула иммуноглобулина, содержит варибельный домен. Варибельный домен молекул иммуноглобулина подразделяется на гиперварибельную (HV) и каркасную (FR) области. Области HV имеют высокое соотношение различных аминокислот в заданном положении по отношению к наиболее распространенной аминокислоте в этом положении. Области гиперварибельности обозначаются как области, определяющие комплементарность (CDR). Молекулы иммуноглобулинов содержат три области, определяющие комплементарность (CDR1, CDR2 и CDR3). Четыре каркасные области с гораздо менее варибельными аминокислотными последовательностями отделяют области CDR. Области CDR могут прямо связываться с антигеном, таким как Vγ9Vδ2 T-клеточный рецептор (см., например, фиг. 1, где указаны каркасные области и CDR-области выбранных VHH). Каркасные области образуют структуру бета-листа, которая служит в качестве каркаса для расположения областей CDR для контакта с антигеном.

Антитела ламы состоят из двух тяжелых цепей (см. фиг. 9B). Каждая из тяжелых цепей представляет собой молекулу иммуноглобулина с единственным варибельным доменом. Такое антитело обозначается как одноцепочечное антитело, т.е. оно содержит один тип цепи. Такое антитело может также обозначаться как антитело, содержащее только тяжелую цепь.

Однодоменное антитело представляет собой молекулу иммуноглобулина, содержащего один мономерный варибельный домен (см. фиг. 9C). Однодоменные антитела, таким образом, содержат одну область CDR1, одну CDR2 и одну CDR3. Однодоменное антитело может быть получено из одноцепочечного антитела (или из антитела, состоящего только из тяжелой цепи). Как и цельное антитело, однодоменное антитело способно селективно связываться со специфическим антигеном. Однодоменные антитела могут содержать только варибельный домен цепи иммуноглобулина, содержащей CDR1, CDR2 и CDR3 и каркасные области, такие антитела также могут обозначаться как VHH или нанотела. С молекулярной массой всего примерно 12-15 кДа, нанотела намного меньше, чем обычные антитела (150-160 кДа), которые состоят из двух тяжелых цепей и двух легких цепей.

CDR1, CDR2 и CDR3 последовательности могут подвергаться обмену между видами. Например, из молекулы иммуноглобулина ламы, могут быть выбраны CDR-последовательности и подвергнуты обмену с CDR-последовательностями в молекулах иммуноглобулина человека, с получением молекулы иммуноглобулина человека, имеющей специфичность, которая является производной CDR-последовательностей ламы. Это может быть предпочтительным, поскольку человеческая последовательность может быть менее иммуногенной для человека по сравнению с исходной каркасной последовательностью ламы. Такой обмен CDR-последовательностей известен как гуманизация. Следовательно, молекулы иммуноглобулина, одноцепочечные антитела и однодоменные антитела согласно изобретению могут содержать последовательности иммуноглобулина человеческого происхождения или последовательности иммуноглобулина из ламы и содержат последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, замененные последовательностями CDR согласно изобретению с целью обеспечения связывания Vγ9Vδ2 2 T-клеточного рецептора человека. Например, одноцепочечное человеческое антитело может содержать последовательность, соответствующую человеческой последовательности тяжелой цепи, но подвергнутую мутации, например, содержащую делецию домена CH1, таким образом, что образуется ламаподобное одноцепочечное антитело (см., например, фиг. 9B), и содержит области CDR указанной человеческой последовательности тяжелой цепи, замененные последовательностями CDR согласно изобрете-

нию. Человеческий иммуноглобулин, человеческое одноцепочечное антитело или человеческое однодоменное антитело, следовательно, относятся к происхождению каркасных и/или константных областей, а не к происхождению CDR1, CDR2 и CDR3 областей по изобретению.

Как описано в разделе примеров, молекулы иммуноглобулинов, связывающиеся с человеческим V γ 9V δ 2 Т-клеточным рецептором, были отобраны с использованием стратегии с участием иммунизации Llama glamas с человеческими V γ 9V δ 2 Т-клетками донорского происхождения и с использованием фагового дисплея. Последовательности VHH, которые были отобраны, секвенировали, и они представлены в табл. 3 и изображены на фиг. 1. CDR1, CDR2 и CDR3 области отобранных VHH приведены ниже в табл. 1. Каждая из CDR также приведена в табл. 3 с соответствующей последовательностью SEQ ID NO.

Таблица 1

Из 20 VHH, которые были отобраны, приведены последовательности CDR1, CDR2 и CDR3. Обозначения

CDR1 и CDR2 приведены выше (соответствующие SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 32 соответственно) и, кроме того, приведена идентичность последовательности (%) каждой CDR1 и CDR2 области с соответствующими обозначениями CDR1 и CDR2

		CDR1	%	CDR2	%	CDR3
N	Обознач.	GRTFSNYA MG		AISWSGGSTYYA DSVKG		
1	5C7	GRTFSRYT MG	80	AISWSGGRTNFA GSVKG	71	DWLPVPGRESY DY
2	5E3	GRTFSSYA MG	90	AISWSGGTTYA DSVKG	94	SLDCSGPGCHT AEYDY
3	6H1	GRTFSEYA MG	90	AISWTGSKTYA DSVKG	82	SSDCSGPGCHT EEYDY
4	5G3	GRTFSSYA MG	90	AVSWSGGSTYYA DSVKG	94	SQDCSGPGCYT NEYDS
5	5C1	GSIFSNYA MA	70	AVSWSGGRTYA DSVKG	88	SLSCSGPGCSL EEYDY
6	5D3	GRPFSSNYA MG	90	VISWSGGSTYYA DSVKG	94	QFSGASTVVAG TALDYDY
7	6E3	GRPFSSNYG MG	90	GISWSGGSTDYA DSVKG	88	VFSGAETAYYP SDDYDY
8	6H4	GRPFSSNYG MG	90	GISWSGGSTDYA DSVKG	88	VFSGAETAYYP SDDYDY
9	6C1	GRPFSSNYG MG	90	GISWSGGSTDYA DSVKG	94	VFSGAETAYYP SDDYDY
10	6H3	GRPFSSNYG MG	90	GITWSGGSTHYA DLVKG	76	VFSGAETAYYP STEYDY
11	6G3	GRPFSSNYG MG	70	GISWSGGSTYYA DSVKG	94	VFSGAETAQYP SYDYDY
12	6F6	GRPFSSNYA MG	90	AVTWSGGSTYYA DSVKG	88	QFNGAENIVPA TTTPTSYYDY
13	5C8	GRPFSSNYA MG	90	AISWSGGSTSYA DSVKG	94	QFSGADYGFR LGIRGYEYDY
14	5E7	GRPFSSNYA MG	90	AISWSGGSTSYA DSVKG	94	QFSGADYGFR LGIQGYEYDY
15	5F5	GRTFSNYA MG	100	AISWSGGSTYYA DSVKG	100	MFSGSESQLVV VITNLYEYDY

16	6A1	GRTFSNYA MG	100	TISWSGGSTYYA DSVKG	94	AFSGSDYANTK KEVEYDY
17	5D7	GRTFSNYA MG	100	AISWSGGMTDHA DSVKG	82	AFAGDIPYGSS WYGDPTTYDY
18	5B11	GRTSSTFS MA	50	AINWSGGSTRYA DSVSD	76	RRGGIYYSTQN DYDY
19	6C4	VRTFSDYR MG	70	TISWSGGLTYA DSVKG	94	GGGYAGGTYYH PEE
20	6E4	GFTFDDYC IA	40	CITTS DGSTYYA DSVKG	76	YFGYGCYGAQ DYRAMDY

У иммуноглобулинов, которые были отобраны авторами изобретения для связывания с V γ 9V δ 2 Т-клеточным рецептором человека, неожиданно оказалась существенная идентичность последовательности в отношении CDR1 и CDR2. Без привязки к теории, такие последовательности CDR1 и CDR2 по существу способствуют связыванию V γ 9V δ 2 Т-клеточного рецептора. Большая вариабельность была обнаружена для области CDR3, которая, без привязки к теории, может вовлекать последовательность CDR3 в функциональность молекулы иммуноглобулина, т.е. в тип модуляции, такой как блокирование активации V γ 9V δ 2 Т-клеток, индуцирование активации V γ 9V δ 2 Т-клеток или ни блокирование активации, ни индуцирование активации V γ 9V δ 2 Т-клеток. Следовательно, молекула иммуноглобулина содержит область CDR1 и область CDR2, где область CDR1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 40% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31 GRTFSNYAMG, и где область CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32 AISWSGGSTYYADSVKG. Предпочтительно область CDR2, содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32.

Предпочтительно молекула иммуноглобулина представляет собой одноцепочечное антитело. Как уже говорилось, иммуноглобулины получены из ламы. Ламы вырабатывают антитела с одной тяжелой цепью, которая димеризуется с помощью дисульфидных мостиков, т.е. антитело ламы имеет два одиночных вариабельных домена из двух цепей (см. фиг. 9b).

В одном воплощении область CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 32 AISWSGGSTYYADSVKG, где указанная аминокислотная последовательность содержит Т в положении 9, А в положении 12, и V в положении 15. Когда последовательности выбранных областей CDR2 сравниваются, аминокислоты в этих положениях не демонстрируют вариации. Следовательно, без привязки к теории, эти положения, как представляется, имеют важное значение для связывания V γ 9V δ 2 Т-клеточного рецептора. Понятно, что обозначенное положение относится к положению в эталонной последовательности и не относится к положению в молекуле иммуноглобулина в целом. Следовательно, область CDR2 содержит идентичные аминокислоты в SEQ ID NO: 32 в указанном положении.

Как описано в разделе примеров, области CDR1, CDR2 и CDR3 были отобраны из антител лам. Следовательно, одноцепочечное антитело согласно изобретению может содержать последовательности молекулы иммуноглобулина, которые имеют происхождение из лам. Понятно, что в таком одноцепочечном антителе ламы исходные последовательности CDR заменены путем замены CDR-последовательностей, например, таких, которые приведены в табл. 1, чтобы прийти к одной цепи ламы, имеющей специфичность замены CDR-последовательностей. Аналогичным образом, то же самое может быть сделано с человеческими последовательностями тяжелой цепи. Человеческое одноцепочечное антитело приобретает специфичность, руководствуясь заменой CDR-последовательностей. Перенос областей CDR1, CDR2 и CDR3 в другие каркасы, например, других видов, таких как человеческие каркасные области, хорошо известен в данной области техники.

В одном воплощении одноцепочечное антитело представляет собой однодоменное антитело. Одноцепочечные антитела содержат каркасные области. Следовательно, человеческое однодоменное антитело может иметь человеческие каркасные области, например, полученные либо из человеческой последовательности тяжелой цепи и/или человеческой последовательности легкой цепи, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 согласно настоящему изобретению. Однодоменное антитело ламы содержит каркасные области ламы.

В одном воплощении одна или несколько каркасных областей выбраны из группы аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 67-70. Эти каркасные области представляют собой каркасные области из одного из клонов VHH, который был выделен. Как можно заметить, каркасные области из 20 выделенных клонов существенно не различаются.

В одном воплощении молекула иммуноглобулина, одноцепочечное антитело или однодоменное ан-

титело содержат область CDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 3, 6, 9, 11, 14, 17, 20, 22, 25, 27, 29, 30, 33, 35, 37, 40, 43 и 46. Эти области CDR3 объединяли с последовательностями CDR1 и CDR2, предусмотренными для связывания и функции, как обсуждается ниже.

В одном воплощении молекула иммуноглобулина, одноцепочечное антитело или однодоменное антитело имеют комбинации аминокислотных последовательностей областей CDR1, CDR2 и CDR3 из антител, таких как перечисленные в табл. 1. В одном воплощении молекула иммуноглобулина, одноцепочечное антитело или однодоменное антитело содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы аминокислотных последовательностей, состоящих из SEQ ID NO: 47-66.

В одном воплощении предлагается молекула иммуноглобулина по настоящему изобретению, как описано выше, для использования в терапевтическом лечении. Понятно, что молекула иммуноглобулина, связывающаяся с человеческим V γ 9V δ 2 T-клеточным рецептором, когда она связывается с человеческой V γ 9V δ 2 T-клеткой *in vivo*, например, при терапевтическом лечении, при котором может быть не желательным, чтобы молекула иммуноглобулина представляла собой полностью функциональную молекулу иммуноглобулина, как при связывании с человеческими V γ 9V δ 2 T-клетками, она может вызвать иммунный ответ, направленный против человеческих V γ 9V δ 2 T-клеток. Следовательно, при таком сценарии, молекулы иммуноглобулина, которые не содержат функциональных константных областей, т.е. они инактивированы или делетированы, являются предпочтительными, так как, например, в нанотелах и VHH. Это может быть, в частности, полезно, когда требуется функционирование человеческих V γ 9V δ 2 T-клеток *in vivo*.

В одном воплощении предлагается нуклеотидная последовательность, которая кодирует молекулу иммуноглобулина согласно настоящему изобретению. Последовательности, раскрытые в данном описании, относятся к аминокислотным последовательностям. Следовательно, специалист в данной области вполне способен обеспечить нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, так как это требуется, с использованием таблицы кодонов для преобразования аминокислотной последовательности в нуклеотидную последовательность. Такая нуклеотидная последовательность может быть использована для ее функционального связывания с промоторной последовательностью, полиА-сигналами и т.д., с получением генетической конструкции, с которой антитело может экспрессироваться. Такая генетическая конструкция, содержащая нуклеотидную последовательность, может содержаться в клетке-хозяине.

В одном воплощении предлагается способ получения молекулы иммуноглобулина по настоящему изобретению, включающий:

культивирование клетки-хозяина согласно изобретению, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует молекулу иммуноглобулина согласно изобретению;

возможность клетки-хозяина экспрессировать иммуноглобулин;

получение иммуноглобулина.

Кроме того, в изобретении также предлагается молекула иммуноглобулина, связывающаяся с человеческим V γ 9V δ 2 T-клеточным рецептором, где молекула иммуноглобулина представляет собой молекулу иммуноглобулина, которая блокирует активацию человеческих V γ 9V δ 2 T-клеток. Блокирование активации человеческих V γ 9V δ 2 T-клеток является предпочтительным при заболеваниях и/или терапиях, при которых нецелесообразна активация человеческих V γ 9V δ 2 T-клеток.

V γ 9V δ 2 T-клетки могут сильно и специфически активироваться с помощью низкомолекулярных непептидных фосфорилированных промежуточных продуктов, называемых фосфоантигенами (pAg), из пути мевалоната у млекопитающих или микробных дезоксисилулоза-фосфатных путей. Фосфоантигены могут затем специфически распознаваться (что приводит к активации) с помощью V γ 9V δ 2 T-клеток через взаимодействие между pAg и мембраносвязанными молекулами бутирофин 3A1/CD277. Молекулы иммуноглобулинов, связывающиеся с V γ 9V δ 2 T-клеточным рецептором, как показано в примерах, могут блокировать активацию V γ 9V δ 2 T-клеток, индуцированную фосфоантигенами.

Предпочтительно молекула иммуноглобулина, связывающаяся с человеческим V γ 9V δ 2 T-клеточным рецептором, представляет собой молекулу иммуноглобулина, которая блокирует активацию человеческих V γ 9V δ 2 T-клеток, представляет собой молекулу иммуноглобулина, связывающуюся с человеческим V γ 9V δ 2 T-клеточным рецептором, содержащую области CDR1 и области CDR2, где область CDR1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 40% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31 GRTFSNYAMG; и где область CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32 AISWSGGSTY-YADSVKG; и где предпочтительно молекула иммуноглобулина представляет собой одноцепочечное антитело. В одном воплощении область CDR2 указанной молекулы иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 AISWSGGSTYYADSVKG, где указанная аминокислотная последовательность содержит T в положении 9, A в положении 12, и V в положении 15. В другом воплощении молекула иммуноглобулина

представляет собой однодоменное антитело, предпочтительно, где однодоменное антитело получено из одноцепочечного антитела ламы или из человеческого одноцепочечного антитела. В следующем воплощении, молекула иммуноглобулина представляет собой одноцепочечное антитело или однодоменное антитело. В следующих воплощениях, молекула иммуноглобулина или одноцепочечное антитело или однодоменное антитело содержит одну или несколько каркасных областей, выбранных из группы аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 67-70.

В одном воплощении указанная молекула иммуноглобулина связывающаяся с человеческим V γ 9V δ 2 Т-клеточным рецептором, которая блокирует активацию человеческих V γ 9V δ 2 Т-клеток, предназначена для применения в терапевтическом лечении. В следующем воплощении, указанная молекула иммуноглобулина предназначена для применения в терапевтическом лечении, которое включает применение ингибиторов пути мевалоната, или где терапевтическое лечение включает лечение рака. В другом дополнительном воплощении, указанная молекула иммуноглобулина предназначена для применения в терапевтическом лечении, которое включает лечение инфекционного заболевания.

Ингибиторы пути мевалоната, которые действуют после продуцирования pAg, которые обычно включают в себя клинически предписанные аминокислоты, такие как памидронат, алендронат, ризедронат, ибандронат и золедронат. Другой класс соединений включает в себя алкиламины, такие как изобутиламмин, изоамиламин и n-бутиламин. Такие соединения могут быть использованы для лечения болезни Паджета, остеопороза, гиперкальциемии и профилактики костных осложнений в случае злокачественных костных метастазов. Это приводит к внутриклеточному аккумуляции эндогенных pAg изопентенилпирофосфата (I ПП) и последующей селективной активации и наработке V γ 9V δ 2 Т-клеток. Введение аминокислоты часто сопровождается острой лихорадочной реакцией, обусловленной этой селективной активацией V γ 9V δ 2 Т-клеток. Эта острая фаза реакции имеет максимальное проявление 1 день и среднюю продолжительность 3 дня и в основном состоит из лихорадки, озноба, приливов, острых скелетно-мышечных симптомов, боли, общего дискомфорта и местных жалоб, связанных со спиной, шеей, грудью или плечами, тошнотой, рвотой и диареей. Следовательно, при терапевтическом лечении, указанные молекулы иммуноглобулина, связывающиеся с человеческим V γ 9V δ 2 Т-клеточным рецептором, которые блокируют активацию человеческих V γ 9V δ 2 Т-клеток, могут предотвращать острую фазу реакции, вызванную например введением аминокислоты у пациентов с болезнью Паджета, остеопорозом, метастазами в кости и гиперкальциемией. Кроме того, такие молекулы иммуноглобулина могут также быть полезным в терапевтическом лечении избыточной активации V γ 9V δ 2 Т-клеток *in vivo*, которые могут происходить, например, во время инфекции, где V γ 9V δ 2 Т-клетки сверхстимулированы или хронически стимулированы, или при некоторых злокачественных заболеваниях, когда хроническая сверхактивность пути мевалоната в опухолевых клетках может привести к истощению V γ 9V δ 2 Т-клеток. Такое (сверх) стимулирование может быть измерено у пациентов, например, путем измерения увеличения V γ 9V δ 2 Т-клеток по сравнению с исходным уровнем, или путем измерения избыточного уровня V γ 9V δ 2 Т-клеток, например, более чем 5% Т-клеток представляют собой V γ 9V δ 2 Т-клетки в сочетании с положительной регуляцией поверхностных маркеров, таких как CD69 (ранний маркер активации) или CD25 (поздний маркер активации) на V γ 9V δ 2 Т-клетках. Понятно, что из-за миграции V γ 9V δ 2 Т-клеток из крови в ткани, измерение избыточного уровня V γ 9V δ 2 Т-клеток не является обязательным требованием. С другой стороны, при хроническом сверхстимулировании, V γ 9V δ 2 Т-клетки могут менее хорошо активированы, и что это также может быть признаком сверхстимулирования. Продуцирование цитокинов (IFN-гамма, TNF-альфа) и содержание цитотоксических гранул также могут быть измерены внутриклеточно с помощью проточной цитометрии.

В предпочтительном воплощении указанная молекула иммуноглобулина, связывающаяся с человеческим V γ 9V δ 2 Т-клеточным рецептором, которая блокирует активацию человеческих V γ 9V δ 2 Т-клеток, представляет собой молекулу иммуноглобулина, содержащую область CDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 27 и 30.

В одном воплощении указанная молекула иммуноглобулина, связывающаяся с человеческим V γ 9V δ 2 Т-клеточным рецептором, которая блокирует активацию человеческих V γ 9V δ 2 Т-клеток, используется для блокирования активации человеческих V γ 9V δ 2 Т-клеток. Согласно этому воплощению указанная молекула иммуноглобулина (которая включает в себя одноцепочечное антитело или однодоменное антитело), используется в анализах, например, таких как описано в примерах, для блокирования активации.

В изобретении также предлагается молекула иммуноглобулина, которая активирует человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки, т.е. молекула иммуноглобулина, связывающаяся с человеческим V γ 9V δ 2 Т-клеточным рецептором, содержащая область CDR1 и область CDR2, где область CDR1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 40% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31 GRTFSNYAMG; и где область CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32 AISWSGGSTYYADSVKG; и где предпочтительно мо-

лекула иммуноглобулина представляет собой одноцепочечное антитело. В одном воплощении область CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 AISWSGGSTYYADSVKG, где указанная аминокислотная последовательность содержит Т в положении 9, А в положении 12, и В в положении 15. В другом воплощении, молекула иммуноглобулина представляет собой однодоменное антитело, которое предпочтительно, представляет собой одноцепочечное антитело ламы или человеческое одноцепочечное антитело. В следующем воплощении, одноцепочечное антитело представляет собой однодоменное антитело. В других воплощениях, молекула иммуноглобулина или одноцепочечное антитело или однодоменное антитело включает в себя одну или несколько каркасных областей, выбранных из группы аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 67-70.

Предпочтительно указанные молекулы иммуноглобулина, которые активируют человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки, включают в себя область CDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 6, 9, 11, 14, 17, 20, 22, 25, 29, 33, 35 и 46.

Современные стратегии, направленные на использование V γ 9V δ 2 Т-клеток, зависят от их системной активации (например, путем аминокислотных фосфонатов или синтетических фосфоантигенов, таких как B γ HPP) или, например, от адоптивного переноса V γ 9V δ 2 Т-клеток. Эти подходы, как было показано, хорошо переносились пациентами, и признаки противоопухолевой активности были зарегистрированы. Однако, результаты недостаточно постоянные, чтобы обеспечить широкое клиническое применение. Описываемые стратегии приводят к системной активации V γ 9V δ 2 Т-клеток, но не приводят к специфическому привлечению данных клеток к опухоли, где они, как предполагается, оказывают свое противоопухолевое действие. Указанная молекула иммуноглобулина, которая активирует человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки, и которые предпочтительно связаны с агентом, может быть использована для активации V γ 9V δ 2 Т-клеток в клинических условиях.

Предпочтительно указанная молекула иммуноглобулина, которая активирует человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки, связана с агентом. Указанный агент предпочтительно представляет собой агент, который может связываться с мишенью, например, с раковой клеткой или с инфицированной клеткой, например, инфицированной вирусом, или не хозяйской клеткой, например, бактерии. Предпочтительно указанный агент представляет собой молекулу иммуноглобулина. Более предпочтительно, указанная молекула иммуноглобулина представляет собой одноцепочечное антитело или однодоменное антитело. При связывании с агентом он может привлекать и активировать человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки в место, где требуется действие человеческих V γ 9V δ 2 Т-клеток, в отличие от системной активации. Например, молекула иммуноглобулина, которая активирует человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки, может быть связана с опухолеспецифичным антителом, противовирусным антителом или антибактериальным антителом. Таким опухолеспецифичным антителом может быть любое антитело. Такая молекула иммуноглобулина, связанная с другим антителом, может обозначаться как биспецифичное антитело. Биспецифичное антитело может также состоять из первой молекулы иммуноглобулина, включающей области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно изобретению, которая представляет собой цепь, как например, включающую одноцепочечное антитело, где первая цепь иммуноглобулина спаривается со второй молекулой иммуноглобулина, которая также представляет собой цепь, как например, включает одноцепочечное антитело, где второй иммуноглобулин связывается с мишенью. Таким образом, образуется биспецифичное антитело, которое имеет две цепи (аналогично тому, как показано на фиг. 9В), причем каждая цепь содержит разные единственные связывающие домены, где один связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 согласно настоящему изобретению, а другой связывающий домен связывается с мишенями. Указанная молекула иммуноглобулина, которая активирует человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки и которая связана с агентом, также может представлять собой биспецифичное антитело, которое содержит два однодоменных антитела, где первое однодоменное антитело содержит области CDR1, CDR2 и CDR3 согласно изобретению, где первое однодоменное антитело связано со вторым однодоменным антителом, где второе однодоменное антитело связывается с мишенью.

Следовательно, в одном воплощении указанная молекула иммуноглобулина, которая активирует человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки, и которая предпочтительно связана с агентом, предназначена для использования в терапевтическом лечении. Предпочтительно терапевтическое лечение представляет собой лечение рака или инфекции.

В следующем воплощении, предлагается применение указанной молекулы иммуноглобулина, которая активирует человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки, для активации человечески V γ 9V δ 2 Т-клеток. Такое применение полезно, например, в анализах, таких как описанные в примерах.

В следующем воплощении указанная молекула иммуноглобулина, которая активирует человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки, содержит метку. Эти молекулы иммуноглобулина особенно полезны для проточной цитометрии клеток, экспрессирующих человеческий V γ 9V δ 2 Т-клеточный рецептор. Молекула иммуноглобулина может содержать метку, например, метку тус, как описано в примерах, или his-метку или последовательность флуоресцентного белка, или она может быть соединена с соответствующим кра-

сителем для визуализации. Кроме того, в сочетании, например, с магнитными шариками, эти молекулы иммуноглобулинов могут быть использованы для выделения и очистки этих клеток из клеточных суспензий, в том числе из периферической крови. Поскольку это иммуноглобулины, которые активируют человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки, они особенно полезны для селекции этих клеток, в то же самое время для активации и наработки клеточной популяции. Следовательно, дополнительно предлагается применение этих молекул иммуноглобулинов для мечения и/или для селекции, а также для активации человеческих V γ 9V δ 2 Т-клеток.

В следующем аспекте изобретения, предлагается молекула иммуноглобулина, которая не блокирует активацию человеческих V γ 9V δ 2 Т-клеток; и не активирует человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки, и где она представляет собой молекулу иммуноглобулина, связывающуюся с человеческим V γ 9V δ 2 Т-клеточным рецептором, содержащую область CDR1 и область CDR2, где область CDR1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 40% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31 GRTFSNYAMG; и где область CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32 AISWSGGSTYYADSVKG; и где предпочтительно молекула иммуноглобулина представляет собой одноцепочечное антитело. В одном воплощении область CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 AISWSGGSTYYADSVKG, где указанная аминокислотная последовательность содержит Т в положении 9, А в положении 12, и V в положении 15. В другом воплощении, молекула иммуноглобулина представляет собой однодоменное антитело, предпочтительно, где однодоменное антитело представляет собой одноцепочечное антитело ламы или человеческое одноцепочечное антитело. В следующем воплощении одноцепочечное антитело представляет собой однодоменное антитело. В следующих воплощениях, молекула иммуноглобулина или одноцепочечное антитело или однодоменное антитело содержит одну или несколько каркасных областей, выбранных из группы аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 67-70.

В одном воплощении указанная молекула иммуноглобулина, которая не блокирует активацию и не активирует человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки, содержит область CDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 37, 40 и 43.

В следующем воплощении, указанная молекула иммуноглобулина, которая не блокирует активацию человеческих V γ 9V δ 2 Т-клеток, содержит метку.

Эти молекулы иммуноглобулина особенно полезны для проточной цитометрии или иммуногистохимического детектирования клеток, экспрессирующих человеческий V γ 9V δ 2 Т-клеточный рецептор. Молекула иммуноглобулина может содержать метку, например, метку тус, как описано в примерах, или метку his или последовательность флуоресцентного белка, или она может быть соединена с соответствующим красителем для визуализации. Кроме того, в сочетании, например, с магнитными шариками, эти молекулы иммуноглобулинов могут быть использованы для выделения и очистки этих клеток из клеточных суспензий, в том числе из периферической крови. Эти молекулы иммуноглобулина, связывающиеся с V γ 9V δ 2 Т-клеточными рецепторами, могут быть разработаны в качестве исследовательских инструментов для детектирования в иммуногистохимии, проточной цитометрии, визуализации и для магнитной очистки от клеточных суспензий. Поскольку они не оказывают влияния на человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки, эти молекулы иммуноглобулина особенно полезны для селекции этих клеток для дальнейших применений. Следовательно, дополнительно предлагается применение этих молекул иммуноглобулина для мечения или для селекции человеческих V γ 9V δ 2 Т-клеток.

В другом аспекте изобретения, предлагается молекула иммуноглобулина, содержащая область CDR1 и область CDR2, где область CDR1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 40% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31 GRTFSNYAMG; и где область CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32 AISWSGGSTYYADSVKG; и где предпочтительно молекула иммуноглобулина представляет собой одноцепочечное антитело. В одном воплощении область CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2 AISWSGGSTYYADSVKG, где указанная аминокислотная последовательность содержит Т в положении 9, А в положении 12, и V в положении 15. В следующем воплощении, молекула иммуноглобулина представляет собой однодоменное антитело, где предпочтительно, однодоменное антитело представляет собой одноцепочечное антитело ламы или человеческое одноцепочечное антитело. В следующем воплощении, одноцепочечное антитело представляет собой однодоменное антитело. В других воплощениях, молекула иммуноглобулина или одноцепочечное антитело или однодоменное антитело содержит одну или несколько каркасных областей, выбранных из группы аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 67-70. В следующем воплощении данного аспекта изобретения, молекула иммуноглобулина, одноцепочечное антитело или однодоменное антитело содержат область CDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей

SEQ ID NO: 3, 6, 9, 11, 14, 17, 20, 22, 25, 27, 29, 30, 33, 35, 37, 40, 43 и 46.

В другом аспекте изобретения предлагается молекула иммуноглобулина, которая содержит область CDR3, которая содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 3, 6, 9, 11, 14, 17, 20, 22, 25, 27, 29, 30, 33, 35, 37, 40, 43 и 46.

Примеры

Получение V γ 9V δ 2 Т-клеток донорского происхождения V γ 9V δ 2 Т-клетки, полученные от здорового донора (человека), получали и культивировали, как описано (Schneiders FL, et al. Clin Immunol 2012; 142:194-200).

Получение V γ 9V δ 2 Т-клеточных линий Jurkat и V γ 9V δ 2 Т-клеточных линий Jurma.

Клеточные линии Jurkat и JurMa, экспрессирующие V γ 9V δ 2 TCR, были синтезированы согласно ранее описанным методикам (Scholten KB, et al. Clin Immunol 2006; 119:135-45). Вкратце, белковые последовательности V γ 9- и V δ 2-цепи клона G9 (Allison TJ et al. Nature 2001; 411:820-4), Davodeau F et al. Eur J Immunol 1993; 23: 804-8), разделенные последовательностью 2A, выделенной из пикорнавируса, модифицировали по кодонам для оптимального продуцирования белка и синтезировали с помощью GeneART (Life technologies), а затем клонировали в LZRS. После трансфекции в упаковочную клеточную линию Phoenix-A ретровирусные надосадочные жидкости собирали для трансдукции клеток Jurkat или Jurma.

Селекция анти- V γ 9V δ 2 TCR VHH.

2 Llama glamas иммунизировали четыре раза каждую с использованием 1×10^8 человеческих V γ 9V δ 2 Т-клеток донорского происхождения в стерильном PBS в течение шести недель. Фаговые библиотеки конструировали из экстрагированной РНК, выделенной из РВМС лам, как описано ранее (Roovers RC et al. Cancer Immunol Immunother. 2007; 56: 303-17) и лигировали в фагмидный вектор pUR8100. VHH, специфичные к V γ 9V δ 2 Т-клеточному рецептору (TCR), генерировали с помощью двух раундов селекции фагового дисплея. В 1-м раунде фаги из обеих библиотек инкубировали в течение 2 ч при 4°C с клетками Jurkat, трансдуцированными для стабильной экспрессии V γ 9V δ 2 TCR (Jurkat V γ 9V δ 2). После инкубации клетки отмывали и фаги элюировали с помощью 100 мМ HCl. Через 7 мин инкубации при 4°C несвязанные фаги удаляли и нейтрализовали трис-HCl, после чего ими инфицировали E. coli. После извлечения отобранных фагов, фаги второго раунда фаги сначала встречно селектировали 2х в течение 1 ч при 4°C с клетками Jurkat, после чего несвязанные фаги инкубировали в течение 1 ч с Jurkat V γ 9V δ 2. Фаги элюировали и инфицировали в E.coli, как описано для первого раунда селекции. Бактерии высевали на чашки со средой LB/2% глюкоза/ампициллин для генерации одиночных бактериальных колоний кодирующих ДНК элюированного VHH.

Продуцирование и очистка VHH.

ДНК VHH из индивидуальных клонов гидролизуют с помощью SfiI/BstEII и клонируют в плазмиду pMEK219, производное от pHen1 (Hoogenboom et al. Nucleic Acids Res 1991) с добавлением кассеты HC-V для возможности клонирования по SfiI/BstEII, добавляли С-концевую Мус-метку и делецию 6х His-меткой последовательности genIII. pMEK219-VHH трансформировали в бактерии TG1. Ночную культуру использовали для инокуляции среды 2хTY, содержащей 0,1% глюкозу и 100 мкг/мл ампициллина. Когда OD₆₀₀ достигало 0,5, добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Продуцирование белка обеспечивали в течение 2-5 ч. Рост всех культур проводили при 37°C при встряхивании со скоростью 200-220 об/мин. Продуцирование белка останавливали путем откручивания культур в течение 15 мин при температуре 4°C. Бактериальный осадок суспендировали в PBS и замораживали в течение по меньшей мере 1 ч. Бактериальную суспензию оттаивали, слегка встряхивали в течение 1 ч при 4°C и центрифугировали при 4500 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость инкубировали с промытой смолой Talon (Clontech, 1290 Terra Bella Ave. Mountain View, CA, USA) в течение 1 ч при комнатной температуре. Смолу Talon промывали 3 раза PBS, а затем 1 раз с 15 мМ имидазола/PBS pH 7 и элюировали с помощью 150 мМ имидазола/PBS pH 7. Элюированную фракцию подвергали диализу против PBS 2 раза. Очищенное VHH проверяли на предмет чистоты с помощью окрашенного кумасси белкового геля.

Связывание VHH с V γ 9V δ 2 Т-клетками донорского происхождения или с V γ 9V δ 2 Т-клетками Jurkat.

5×10^4 V γ 9V δ 2 Т-клеток донорского происхождения промывали буфером FACS. Все инкубации проводили в буфере FACS в течение 30 мин при 4°C. Клетки инкубировали с 25 мкл 500 нМ VHH. После промывания клетки инкубировали с 10 мкл 1:500 клона 4A6 антитела против Мус (Merck Millipore, 290 Cocard роуд Billerica, MA, USA). После промывки клетки инкубировали вместе с 10 мкл 1: 200 козьего анти-мышинного F(ab)2 APC (Beckman Coulter, Фуллертон, Калифорния, США) в течение 30 мин при 4°C. После заключительного этапа промывки измеряли связывание VHH с клетками с помощью проточной цитометрии (FACSCalibur, BD Biosciences).

Активация V γ 9V δ 2 Т-клеток донорского происхождения с помощью VHH.

На плоскодонные 96-луночные культуральные планшеты (Costar) наносили покрытие в течение но-

чи с помощью 50 мкл 4 мкг/мл клона 9E10 мышинового антитела к Мус (собственного производства) при 4°C. Лунки промывали PBS и блокировали 200 мкл 4% BSA/PBS, при комнатной температуре в течение 30 мин. Блокирующий раствор отбрасывали и лунки инкубировали с 30 мкл 500 нМ VHH в PBS в течение 2 ч при комнатной температуре. Лунки промывали и добавляли 1×10^4 V γ 9V δ 2 T в 200 мкл IMDM+(Schneiders FL, et al. Clin Immunol 2012; 142: 194-200), в каждую лунку и инкубировали в течение ночи при температуре 37°C в CO₂ инкубаторе с увлажненной атмосферой в присутствии golgiplug (1:500) (BD Biosciences) для внутриклеточного удержания цитокина. Проточную цитометрию затем использовали для определения CD25, IFN- γ и экспрессии гранзима B (как описано; Schneiders FL, et al. Clin Immunol 2012; 142: 194-200 (CD25-PE (клон M-A251, #555432), IFN- γ APC (клон B27 #554702) оба доступны из BD Pharmingen. Гранзим B PE (клон GB-12 #M2289) доступен из Sanquin, Амстердам, Нидерланды).

Нейтрализация V γ 9V δ 2 T-клеток донорского происхождения с помощью VHH.

Клетки HeLa инкубировали с указанными количествами аминокислот (NBP; ABP памидронат-динатрий, PHARMACHEMIE, Харлем, Нидерланды) в течение 2 ч при температуре 37°C в CO₂ инкубаторе с увлажненной атмосферой. Затем клетки промывали и высевали в количестве 5×10^4 в 100 мкл IMDM+ на лунку в плоскодонный 96-луночный культуральный планшет (Costar) и давали им возможность прикрепиться в течение 2 ч при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе в увлажненной атмосфере. Клетки промывали PBS и культивировали в 100 мкл IMDM+. V γ 9V δ 2 T-клетки донорского происхождения инкубировали с указанной концентрацией VHH в течение 1 ч при 4°C. 75×10^3 VHH-инкубированные V γ 9V δ 2 T-клетки добавляли в лунки, покрытые NBP-обработанными клетками HeLa и инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в увлажненной атмосфере. Клетки собирали с помощью трипсина в 96-луночном круглодонном планшете, Golgiplug (1:500, BD Biosciences) добавляли для внутриклеточного удержания цитокинов. Проточную цитометрию использовали для определения CD25, IFN- γ и экспрессии Гранзима B (как описано; Schneiders FL, et al. Clin Immunol 2012; 142:194-200).

Специфичность VHH-цепи.

V γ 9V δ 2 T-клеточную линию донорского происхождения окрашивали мышинным антителом к человеческому V δ 2-FITC и мышинным антителом к человеческому V γ 9-PE (оба BD Biosciences) и сортировали с использованием FACS Aria (BD Biosciences) для популяций: $\gamma\delta$ T-клетки, положительные по одиночной цепи V δ 2, $\gamma\delta$ T-клетки, положительные по одиночной цепи V γ 9, $\gamma\delta$ T-клетки, дважды положительные по V γ 9V δ 2, и $\gamma\delta$ T-клетки, дважды отрицательные по V γ 9V δ 2. Отсортированные клетки культивировали таким же образом, как V γ 9V δ 2 T-клеточные линии донорского происхождения. Для определения VHH специфичности 10^4 клеток полученных, очищенных, отсортированных клеточных линий окрашивали с помощью VHH аналогично методике, описанной для связывания VHH с V γ 9V δ 2 T-клетками донорского происхождения с той корректировкой, что использовали 10 мкл 1:80 козьих антител к мышинному F(ab)₂ RPE (# R0480 из Dako, Glostrup, Дания) для детектирования антитела к Мус.

Результаты.

Отобранные VHH тестировали на специфичность, как описано выше, и все 20 VHH (табл. 2) продемонстрировали связывание с клетками Jurkat, экспрессирующими V γ 9V δ 2 T-клеточный рецептор, а также с первичными V γ 9V δ 2 T-клетками, в то время как они не связывались с клетками Jurkat, не экспрессирующими V γ 9V δ 2 T-клеточный рецептор.

Молекулы иммуноглобулинов, которые блокируют фосфоантиген-индуцированную активацию.

Клоны 6F6 и 5E7 были охарактеризованы как нанотела, которые блокируют фосфоантиген-индуцированную стимуляцию V γ 9V δ 2 T-клеток. Оба клона 6F6 и 5E7 являются нанотелами, которые связываются с V52 цепью V γ 9V δ 2 T-клеточного рецептора. Экспрессия GrB, CD25 и IFN-гамма была аналогична нестимулированным контролям, в то время как положительный контроль продемонстрировал относительно высокие уровни экспрессии (смотри фиг. 2). В кривой доза-ответ, при экспонировании с фосфоантигеном представлена дозозависимая нейтрализация фосфоантиген-индуцированной V γ 9V δ 2 T-клеточной активации (см. фиг. 3). Далее было показано, что нанотело VHH 5E7 ингибирует активацию V γ 9V δ 2 T-клеток с помощью аминокислот (ABP) дозозависимым образом, т.е. более высокая доза 5E7 приводит к относительно более сильному уменьшению экспрессии CD25 и CD107a, а также к относительно более сильному снижению интерферона- γ и TNF- α . Также было продемонстрировано, что нанотело 5E7 ингибирует спонтанный лизис клеток Daudi с помощью V γ 9V δ 2 T-клеток дозозависимым образом, в то время как контрольное нанотело не продемонстрировало какого-либо значительного эффекта. В том же самом анализе азотсодержащий бисфосфонат памидронат использовали для активации V γ 9V δ 2 T-клеток, что приводило к повышенному лизису клеток Daudi. Опять же, нанотело 5E7 уменьшало лизис клеток Дауди дозозависимым образом. Это указывает на то, что любая нежелательная активация V γ 9V δ 2 T-клеток может быть уменьшена с помощью нанотела, которое блокирует активацию V γ 9V δ 2 T-клеток. Такое антитело, которое блокирует активацию V γ 9V δ 2 T-клеток, может представлять собой антитело, которое связывается с цепью V52 V γ 9V δ 2 T-клеточного рецептора.

Молекулы иммуноглобулина, которые вызывают активацию.

Было продемонстрировано, что различные VHH активируют V γ 9V δ 2 Т-клетки, как это показано с помощью увеличения экспрессии CD25 и увеличения экспрессии IFN-гамма (см. фиг. 4). Кроме того, такие VHH продемонстрировали типичный дозовый ответ, т.е. увеличение дозы VHH также приводило к увеличению экспрессии CD25 (см. фиг. 5, правая панель). Такой VHH был также связан с молекулой иммуноглобулина и изучали влияние на апоптоз опухолевых клеток (см. фиг. 6). Биспецифичный VHH (связывание противораковой клеткой и связывание V γ 9V δ 2 Т-клеток и активация) продемонстрировал высокую активность по отношению к гибели опухолевых клеток. Биспецифичный VHH получали путем связывания нанотела 6H4 к V γ 9V δ 2 с нанотелом против опухоли. Как и биспецифичные контроли, нанотело к V γ 9V δ 2 было связано с контрольным нанотелом, и противоопухолевое нанотело было связано с контрольным нанотелом. При самой высокой дозе (10 нМ), контроли индуцировали только примерно 22% лизиса опухолевых клеток. Биспецифичные VHH (или нанотело), связывающие как V γ 9V δ 2 Т-клетки, так и опухолевые клетки, индуцировали примерно 8 5% лизиса опухолевых клеток, опосредованного V γ 9V δ 2 Т-клетками. В кривой дозового ответа, процент лизиса с помощью V γ 9V δ 2 Т-клеток уменьшался при более низкой дозе (1 нМ, примерно 80%, 100пМ примерно 78%, 10 пМ примерно 50%, 1пМ примерно 23% и 0 примерно 24%). В контрольном эксперименте без (биспецифических) нанотел только с использованием бифосфонатов наблюдали примерно 80% лизиса опухолевых клеток. Эти результаты демонстрируют, что опухоль-специфический лизис с помощью V γ 9V δ 2 Т-клеток может быть повышен с помощью биспецифичных VHH (или нанотел), в которых и опухолевые, и V γ 9V δ 2 Т-клетки являются мишенями, и где конкретное нацеливание на опухоль V γ 9V δ 2 Т-клеток вызывает также активацию V γ 9V δ 2 Т-клеток.

Молекулы иммуноглобулинов, которые не вызывают активацию и не блокируют активацию фосфоантигена.

Несколько VHH (5D7, 5C7, 5B11 и 6C4) не продемонстрировали ни активации человеческих V γ 9V δ 2 Т-клеток, ни того, что они оказывают эффект на блокирование фосфоантигеном активации человеческих V γ 9V δ 2 Т-клеток (фиг. 8 и фиг. 5, левая панель). Такие VHH полезны, например, в FACS сортировке (см. фиг. 7).

Разделение с использованием магнитных шариков.

Антитело к V52 (например, 6H4) или нанотело V γ 9 (например, 6H1) биотинилировали и смешивали с RBMC. Клетки промывали для удаления несвязанного нанотела. Магнитные шарики со стрептавидином (например, доступные от Miltenyi Biotec) добавляли к смеси, и клетки, связанные с шариками, с помощью биотинилированного нанотела, отделяли от несвязанных клеток с использованием магнитной разделяющей колонки. RBMC анализировали на FACS в отношении экспрессии V γ 9 и V δ 2. Отличной очистки добивались как с использованием антитела к V γ 9, так и с нанотелами V52. Например, с использованием нанотела 6H4 4,5% RBMC экспрессировали обе цепи, после разделения на магнитных шариках 97,4% клеток были положительными для обеих цепей V γ 9 и V δ 2. Фракция клеток, которые не связываются с магнитными шариками, были отрицательными для обеих цепей V γ 9 и V δ 2 (0%).

Таблица 2

Связывание VHH с $\gamma\delta$ Т-клетками, экспрессирующими V γ 9V δ 2 или не экспрессирующими V γ 9V δ 2 или экспрессирующими одиночную цепь V γ 9 и V δ 2

N	Обознач.	V δ 2+	V γ 9 +	V γ 9V δ 2 +	V γ 9V δ 2 -
1	5C7	+/-	-	+/-	-
2	5E3	-	++	++	-
3	6H1	-	++	++	-
4	5G3	-	++	++	-
5	5C1	+/-	++	++	-
6	5D3	++	-	++	-
7	6E3	++	-	++	-
8	6H4	++	-	++	-
9	6C1	++	-	++	-
10	6H3	++	+/-	++	-
11	6G3	++	-	++	-
12	6F6	++	-	++	-
13	5C8	++	-	++	-

14	5E7	++	-	++	-
15	5F5	++	-	++	-
16	6A1	++	-	++	-
17	5D7	++	-	++	-
18	5B11	-	-	+	-
19	6C4	+/-	++	++	-
20	6E4	++	-	++	-

Таблица 3

Последовательности (В=связывание, нет активации, нет
блокирования активации фосфоантигеном (РА); А=активация;
РА=блокирует активацию РА)

SEQ ID.	код	Описание		Последовательность
1	5C7	CDR1	B	GRTFSRYTMG
2	5C7	CDR2	B	AISWSGGRTNFAGSVKG
3	5C7	CDR3	B	DWLPVPGRESYDY
4	5E3	CDR1	A	GRTFSSYAMG
5	5E3	CDR2	A	AISWSGGTTYADSVKG
6	5E3	CDR3	A	SLDCSGPGCHTAEYDY
7	6H1	CDR1	A	GRTFSEYAMG
8	6H1	CDR2	A	AISWTGSKTYADSVKG
9	6H1	CDR3	A	SSDCSGPGCHTEEYDY
4	5G3	CDR1	A	GRTFSSYAMG
10	5G3	CDR2	A	AVSWSGGSTYADSVKG
11	5G3	CDR3	A	SQDCSGPGCYTNEYDS
12	5C1	CDR1	A	GSIFSNYAMA
13	5C1	CDR2	A	AVSWSGGRTYADSVKG
14	5C1	CDR3	A	SLSCSGPGCSLEEYDY
15	5D3	CDR1	A	GRPFSNYAMG
16	5D3	CDR2	A	VISWSGGSTYADSVKG
17	5D3	CDR3	A	QFSGASTVVAGTALDYDY
18	6E3	CDR1	A	GRPFSNYGMG
19	6E3	CDR2	A	GISWSGGSTDYADSVKG
20	6E3	CDR3	A	VFSGAETAYPSDDYDY
18	6H4	CDR1	A	GRPFSNYGMG
19	6H4	CDR2	A	GISWSGGSTDYADSVKG
20	6H4	CDR3	A	VFSGAETAYPSDDYDY
18	6C1	CDR1	A	GRPFSNYGMG
19	6C1	CDR2	A	GISWSGGSTDYADSVKG
20	6C1	CDR3	A	VFSGAETAYPSDDYDY
18	6H3	CDR1	A	GRPFSNYGMG
21	6H3	CDR2	A	GITWSGGSTHYADLVKG
22	6H3	CDR3	A	VFSGAETAYPSTEYDY
23	6G3	CDR1	A	GRPFSNYGMG
24	6G3	CDR2	A	GTSWSGGSTYADSVKG
25	6G3	CDR3	A	VFSGAETAQYPSYDYDY
15	6F6	CDR1	PA	GRPFSNYAMG
26	6F6	CDR2	PA	AVTWSGGSTYADSVKG
27	6F6	CDR3	PA	QFNGAENIVPATTTPTSVDY
15	5C8	CDR1	A	GRPFSNYAMG
28	5C8	CDR2	A	AISWSGGSTYADSVKG
29	5C8	CDR3	A	QFSGADYGFGRLGIRGYEYDY
15	5E7	CDR1	PA	GRPFSNYAMG

28	5E7	CDR2	PA	AISWGGSTSYADSVKG
30	5E7	CDR3	PA	QFSGADYGFGRLLGIQGYEYDY
31	5F5	CDR1	A	GRTFSNYAMG
32	5F5	CDR2	A	AISWGGSTYYADSVKG
33	5F5	CDR3	A	MFSGSESQLVVVITNLLEYDY
31	6A1	CDR1	A	GRTFSNYAMG
34	6A1	CDR2	A	TISWGGSTYYADSVKG
35	6A1	CDR3	A	AFSGSDYANTKKEVEYDY
31	5D7	CDR1	B	GRTFSNYAMG
36	5D7	CDR2	B	AISWGGMTDHADSVKG
37	5D7	CDR3	B	AFAGDIPYGSSWYGDPPTYDY
38	5B11	CDR1	B	GRTSSTFSMA
39	5B11	CDR2	B	AINWGGSTRYADSVSD
40	5B11	CDR3	B	RRGGIYYSTQNDYDY
41	6C4	CDR1	B	VRTFSDYRMG
42	6C4	CDR2	B	TISWGGGLTYADSVKG
43	6C4	CDR3	B	GGGYAGGTYHPEE
44	6E4	CDR1	A	GFTFDDYCIA
45	6E4	CDR2	A	CITTSDGSTYYADSVKG
46	6E4	CDR3	A	YFGYGCYGGAQDYRAMDY
47	5C7	VHH		EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTF SRYTMGWFRQAPGKEREFVAAISWGGRT NFAGSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCAADWLPVPGRESYDYWGQGT QVTVSS
48	5E3	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRTF SSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWGGTT YYADSVKGRFTISRDNAKNTVSLQMNSLK PEDTAVYFCAASLDCSGPGCHTAEYDYWG QGTQVTVSS
49	6H1	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAATGRTF SEYAMGWFRQAPGKEREFAAAISWTGSKT YYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCAASSDCSGPGCHTEYDYWG QGTQVTVSS
50	5G3	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTF SSYAMGWFRQAPGKEREFVAAVSWGGST YYADSVKGRFTISRDNARNTVYLQMNSLN PEDTAVYYCAASQDCSGPGCYTNEYDSWG QGTQVTVSS
51	5C1	VHH		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIF SNYAMAWFRQAPEKERDFLAAVSWGGRT YYADSVKGRFTISRDNAKNTVNLQMNSLK PEDTAVYYCAASLSCSGPGCSLEEYDYWG QGTQVTVSS
52	5D3	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF SNYAMGWFRQAPGKEREFVTVISWGGST YYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCAAQFSGASTVVAGTALDYDY WGQGRVTVSS

53	6E3	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF SNYGMGWFRQAPGKKREFVAGISWSSGGST DYADSVKGRLTISRDNAKNTVYLMNSLK PEDTAVYYCAAVFSGAETAYYPSDDYDYW GGGTQVTVSS
54	6H4	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF SNYGMGWFRQAPGKKREFVAGISWSSGGST DYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLK PEDTAVYYCAAVFSGAETAYYPSDDYDYW GGGTQVTVSS
55	6C1	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF SNYGMGWFRQAPGKKRESVAGISWSSGGST DYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLK PEDTAVYYCAAVFSGAETAYYPSDDYDYW GGGTQVTVSS
56	6H3	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRPF SNYGMGWFRQAPGKEREVAGITWSSGGST HYADLVKGRFTISRDNAKNTVHLMNSLK PEDTAVYYCAAVFSGAETAYYPSTEYDYW GGGTQVTVSS
57	6G3	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF NNYGMGWFRQAPGKEREVAGISWSSGGST YYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLK PEDTAVYYCAAVFSGAETAQYPSYDYDYW GGGTQVTVSS
58	6F6	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRPF SNYAMGWFRQAPGKEREVFAAVTWSSGGST YYADSVKGRFAISRDNAKNTVYLMNSLK PEDTAVYYCAAQFNGAENIVPATTTPTSY DYWGQGTQVTVSS
59	5C8	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF SNYAMGWFRQAPGKEREVFAAISWSSGGST SYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSPK PEDTAIYYCAAQFSGADYGFGRLGIRGYE YDYWGQGTQVTVSS
60	5E7	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF SNYAMGWFRQAPGKEREVFAAISWSSGGST SYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSPK PEDTAIYYCAAQFSGADYGFGRLGIRGYE YDYWGQGTQVTVSS
61	5F5	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTF SNYAMGWFRQAPGKEREVFAAISWSSGGST YYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLK PEDTAVYYCAAMFSGSESQLVVVITNLYE YDYWGQGTQVTVSS
62	6A1	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTF SNYAMGWFRQAPGKEREVATISWSSGGST YYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLK PEDTAVYYCAAFSGSDYANTKKEVEYDY WGQGTQVTVSS

63	5D7	VHH	1EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGRT FSNYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWGGM TDHADS VKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSL KPEDTAVYYCAAFAAGDIPYGSSWYGDPT TYDYWGQGTQVTVSS
64	B11	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTS STFSMAWFRQAPRKEREFVAAINWGGST RYADSVSDRFAISRDNKNTVYLQMNLSL PEDTAVYYCAARRGGIYYSTQNDYDYWGQ GTQVTVSS
65	6C4	VHH	3EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSVRT FSDYRMGWFRQAPGKEREFVSTISWGGGL TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSL KPEDTAVYYCAAGGGYAGGTYHPEEWGQ GTQVTVSS
66	6E4	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTF DDYCIWFRQAPGKEREPVSCITSDGST YYADSVKGRFTISSDNKNTVYLQMNRLK PEDTAVYYCAAYFGYGCYGAQDYRAMDY WGKGTSLTVTVSS
67	5C7	FRW1	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAAS
68	5C7	FRW2	WFRQAPGKEREFVA
69	5C7	FRW3	RFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTAVYY CAA
70	5C7	FRW4	WGQGTQVTVSS
71	Человеческая цепь V гамма 9	TCR	MLSLHASTLAVLGALCVYAGHLEQPPQI SSTKTLSTARLECVVSGITISATSVYWY RERPGEVIQFLVSIYDGTVRKESGIPSG KFEVDRIPESTSTLTIHNVKQDIATYY CALWEAQQLGKKIKVFGPGTKLIITDKQ LDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLC LLEKFFPDVIKIHWEKKSNITLGSQEGN TMKTNDTYMKFSWLTVPKSLDKHRCIV RHENNKNGVDQEIIFFPIKTDVITMDPKD NCSKDANDTLLLQLTNTSAYMYLLLLLK SVVYFAIITCCLLRRTAFCCNGEKS
72	Человеческая цепь V дельта 2	TCR	MQRISLIHLSLFWAGVMSAIELVPEHQT VPVSGVPAFLRCSMKGEAIGNYYINWYR KTQGNMTTFIYREKDIYGPFGKDNFQGD DIAKNLAVLKILAPSERDEGSYYCACDTL GMGGEYTDKLI FGKGRVTVPEPRSQPHTK PSVFMKNGTNVACLKVEFYPKDIRINLV SSKKITEFDPAIVISPSGKYNAVKLGKYE DSNSVTCVQHDNKTVHSTD FEVKTDSTD HVKPKETENTKQPSKSKPKAIVHTEKV NMMSLTVLGLRMLFAKTAVAVNFLTAKLF FL

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула иммуноглобулина, связывающая человеческий V γ 9V δ 2 Т-клеточный рецептор, содержащая область CDR1, область CDR2 и область CDR3, где область CDR1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 40% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31 GRFTSNYAMG, и где область CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32 AISWGGSTYYADSVKG; и где область CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 6, 9, 11, 14, 17, 20, 22, 25, 29, 33, 35 и 46, и где молекулой иммуноглобулина является молекула иммуноглобулина, которая активирует человеческие V γ 9V δ 2 Т-клетки.

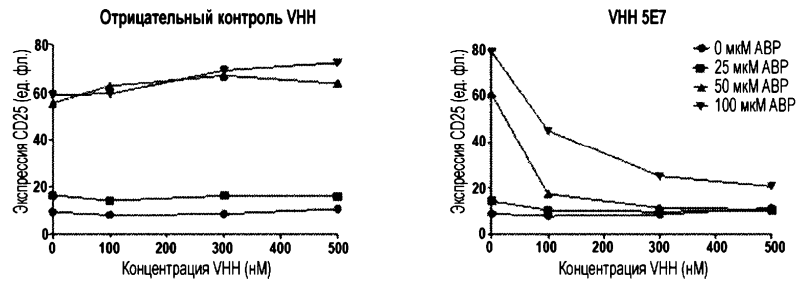
2. Молекула иммуноглобулина по п.1, отличающаяся тем, что область CDR2 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 32 AISWGGSTYYADSVKG, где указанная аминокислотная последовательность содержит Т в положении 9, А в положении 12 и V в положении 15.

3. Молекула иммуноглобулина по п.1 или 2, отличающаяся тем, что молекула иммуноглобулина представляет собой одноцепочечное антитело.

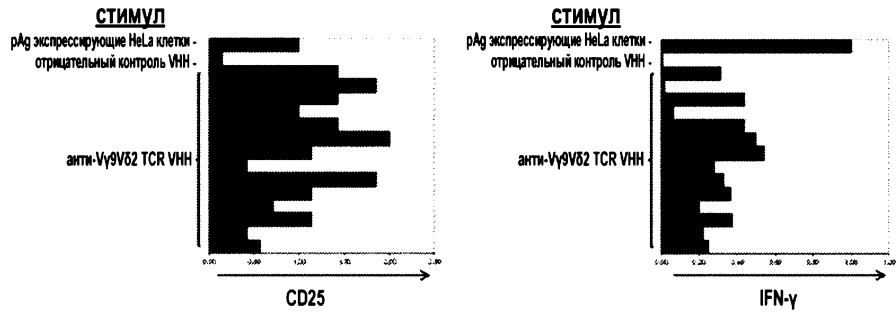
4. Молекула иммуноглобулина по п.1 или 2, отличающаяся тем, что молекула иммуноглобулина представляет собой однодоменное антитело.

5. Молекула иммуноглобулина по любому из пп.1-4, содержащая одну или несколько каркасных областей, выбранных из группы аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 67-70.

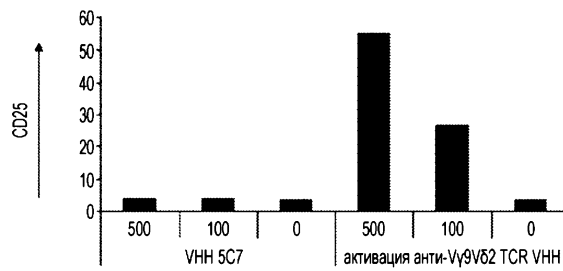
6. Молекула иммуноглобулина по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что молекула иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы аминокислотных последовательностей, состоящих из SEQ ID NO: 48-57, 59, 61, 62 и 66.



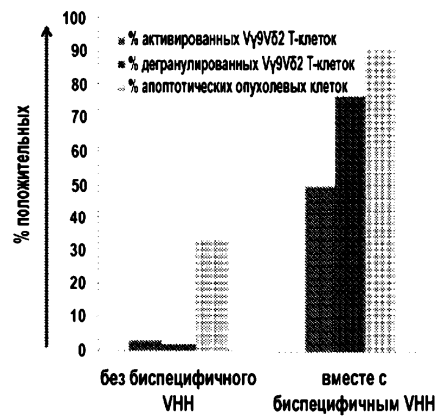
Фиг. 3



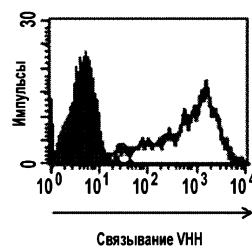
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

