(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202192165 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.12.31

(22) Дата подачи заявки
2015.04.10

(51) Int. Cl. ***C07K 16/28*** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ИММУНОГЛОБУЛИНЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ Vγ9Vδ2 Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

(31) **2012604**
(32) **2014.04.10**
(33) **NL**
(62) **201692039; 2015.04.10**

(71) Заявитель:
ЛАВА ТЕРАПЬЮТИКС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Ван Дер Влит Йоханнес Йелле,
Де Брейн Рене Корнелия Герарда,
Де Грюейль Таня Дениз, Верхель Хендрик Маринус Виллем (NL)

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

(57) Изобретение относится к области медицины и к области иммунологии, и в частности относится к молекулам иммуноглобулинов, связывающим человеческий Vγ9Vδ2 Т-клеточный рецептор. Молекулы иммуноглобулинов, связывающие человеческий Vγ9Vδ2 Т-клеточный рецептор, в частности, предназначены для применения при лечении и/или являются полезными в анализах с использованием человеческих Vγ9Vδ2 Т-клеток, где человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки могут быть модулированы.

202192165 A1

202192165 A1

ИММУНОГЛОБУЛИНЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ Vγ9Vδ2 Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

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 Vγ9Vδ2 Т-клеточные рецепторы. В настоящем изобретении предлагаются молекулы иммуноглобулинов, которые связываются с человеческим Vγ9Vδ2 Т-клеточным рецептором, такие как антитела, одноцепочечные антитела или однодоменные антитела, где человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки могут модулироваться.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Большинство лимфоцитов γδ периферической крови (PBL) у взрослых людей экспрессирует Т-клеточные рецепторы (TCR), содержащие области Vγ9 и Vδ2. Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 Т-клетки могут быть сверх-стимулированы или самопроизвольно активированы.

Следовательно, агенты, которые могут активировать Vγ9Vδ2 Т-клетки, могут быть полезны при лечении инфекций или рака, поскольку они могут стимулировать Vγ9Vδ2 Т-клеточную реактивность по отношению к патогену или к инфицированным клеткам или к раку. Кроме того, агенты, которые блокируют активацию Vγ9Vδ2 Т-клетки, могут быть полезны при заболеваниях или при терапевтическом лечении в случае, где предпочтительно уменьшение активации Vγ9Vδ2 Т-клеток, то есть, где Vγ9Vδ2 Т-клетки сверх-стимулированы или

самопроизвольно активированы. Наконец, агенты, которые могут связываться с Vγ9Vδ2 Т-клеткой, но не оказывают влияние на (фосфоантигенную) активацию Vγ9Vδ2 Т-клеток, применяют для мечения клеток, например, для селекции или идентификации Vγ9Vδ2 Т-клеток. Следовательно, в данной области существует необходимость в предоставлении агентов, которые могут связываться с Vγ9Vδ2 Т-клетками, а также агентов, которые могут блокировать фосфоантигенную активацию Vγ9Vδ2 Т-клеток или могут активировать Vγ9Vδ2 Т-клетки.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предлагаются новые агенты, которые могут связываться с Vγ9Vδ2 Т-клетками. Предложенные агенты представляют собой иммуноглобулины. Предложенные иммуноглобулины связываются с Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 Т-клеточного рецептора и может оказывать влияние на действие молекулы иммуноглобулина. Это может, безотносительно к теории, вовлекать последовательность CDR3 в функциональность молекулы иммуноглобулина, то есть тип модуляции, такой как блокирование активации Vγ9Vδ2 Т-клеток, индуцирование активации Vγ9Vδ2 Т-

клеток, или ни блокирование активации, ни индуцирование активации Vγ9Vδ2 Т-клеток. Иммуноглобулины по изобретению предназначены, в частности, для применения в терапевтическом лечении и для применения в анализах, включающих Vγ9Vδ2 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

Фигура 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).

Фигура 2: VHH 5E7 и VHH 6F6 не активируют Vγ9Vδ2 Т-клетки. Данные указывают на относительную экспрессию маркера активации CD25, провоспалительного цитокина IFN-γ, и цитотоксической молекулы гранзима В Vγ9Vδ2 Т-клетками, полученными от здоровых доноров, по сравнению с положительным контролем (клетки HeLa, экспрессирующие фосфоантиген (pAg+))

Фигура 3: VHH 5E7 нейтрализует индуцированную фосфоантигеном активацию Vγ9Vδ2 Т-клеток, полученных от здоровых доноров. Характерный пример демонстрирует дозозависимую нейтрализацию phosphoAg-индуцированной активации Vγ9Vδ2 Т-клеток с использованием VHH 5E7, в то время как неспецифическое VHH (отрицательный контроль) не может нейтрализовать phosphoAg-индуцированную активацию Vγ9Vδ2 Т-клеток. На вертикальной оси указана активация Vγ9Vδ2 Т-клеток согласно оценке экспрессии CD25, на горизонтальной оси указаны различные концентрации VHH. Стимулирование Vγ9Vδ2 Т-клеток проводили с использованием клеток HeLa, экспрессирующих фосфоантиген, полученных путем

предварительной обработкой клеток HeLa увеличивающимися дозами аминобисфосфонат памидроната (что приводит к увеличению уровня экспрессии фосфоантигена клетками HeLa).

Фигура 4: Vγ9Vδ2 TCR-специфичные VHH способны индуцировать активацию и продуцирование цитокинов в Vγ9Vδ2 Т-клетках, полученных от здоровых доноров. Данные указывают на относительную экспрессию маркера активации CD25 и провоспалительного цитокина IFN-γ в Vγ9Vδ2 Т-клетках, полученных от здоровых доноров, по сравнению с положительным контролем (клетки HeLa, экспрессирующие фосфоантиген (PAG +); стандартизированные к 1) и к отрицательному контролю VHH. Каждый столбец представляет индивидуальные Vγ9Vδ2 TCR-специфичные VHH; индивидуальные VHH различаются по их способности индуцировать активацию и продуцирование цитокинов в Vγ9Vδ2 Т-клетках.

Фигура 5: Дозозависимая активации Vγ9Vδ2 Т-клеток, полученных от здоровых доноров. Данные показывают изменения в экспрессии CD25 (MFI) через 24 ч стимуляции с использованием увеличивающихся концентраций (10-100-500нМ) либо неактивирующих анти-Vγ9Vδ2 TCR VHH или активирующих анти-Vγ9Vδ2 TCR VHH.

Фигура 6: Vγ9Vδ2 TCR-специфичные VHH могут стимулировать смерть опухолевых клеток при слиянии с VHH, специфичными к опухолевому антигену, в виде биспецифической молекулы. Характерный пример эксперимента, в котором Vγ9Vδ2 Т-клетки совместно культивировали в течение ночи вместе с опухолевой клеточной линией A431 в присутствии (вместе с) или в отсутствии (без) конструкта биспецифичного нанотела, состоящего из VHH, специфичного к опухолевому антигену, слитого с активирующим анти-Vγ9Vδ2 TCR VHH. Данные показывают экспрессию CD25 (активация), и экспрессию CD107a (дегрануляция) Vγ9Vδ2 Т-клеток и 7AAD+ опухолевых клеток (выявляя гибель опухолевых клеток).

Фигура 7: специфичность связывания с Т-клеточным рецептором Vγ9 и/или Vδ2, как определено с помощью проточной цитометрии: репрезентативная гистограмма проточной цитометрии показывает связывание Vγ9Vδ2 TCR-специфичных VHH (открытая гистограмма) и

отрицательного контроля VHH (заполненная гистограмма) с Vγ9Vδ2 TCR-экспрессирующими клетками.

Фигура 8: Клон VHH 5C7 ни активирует Vγ9Vδ2 Т-клетки, полученные от здоровых доноров, ни нейтрализует фосфоантиген-индуцированную активацию Vγ9Vδ2 Т-клеток, полученных от здоровых доноров. Характерный пример, демонстрирующий отсутствие как ингибирующего, так и активирующего эффекта VHH 5C7 в отношении phosphoAg-индуцированной активации Vγ9Vδ2 Т-клеток. На вертикальной оси указана активация Vγ9Vδ2 Т-клеток согласно оценке экспрессии CD25, на горизонтальной оси указаны различные концентрации VHH. Стимулирование Vγ9Vδ2 Т-клеток проводили с использованием фосфоантиген-экспрессирующих клеток HeLa, получаемых путем предварительной обработки клеток HeLa возрастающими дозами аминобисфосфонат памидроната (что приводило к увеличению уровня экспрессии фосфоантигена клетками HeLa).

Фигура 9: Схематическое изображение иммуноглобулинов.

A) антитело человека, состоящее из двух тяжелых цепей и двух легких цепей; B) 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 вариабельный домен. Такое одноцепочечное антитело (или антитело, содержащее только тяжелую цепь) может быть антителом ламы; C) Однодоменное антитело содержит один вариабельный домен антитела, например, из одноцепочечного антитела (или антитела, содержащего только тяжелую цепь). Однодоменное антитело может состоять только из области связывания, как показано. Вариабельный домен обозначен серым цветом, в то время как константные области обозначены белым цветом. Вариабельный 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 будет 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, 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 документе и в формуле изобретения и в клаузуле, 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 «a», «an» и «the» 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 включают, 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 (то есть 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 αβ или до γδ 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-TCRα-цепи на поверхности клетки. Такие клетки переключаются на состояние $CD4^+CD8^+$, осуществляют перестановку локуса TCRα-цепи, и экспрессируют зрелый αβTCR на поверхности. $CD4^-CD8^-$ Т-клетки, которые успешно завершили перестановку гена γ перед перестановкой β-гена, экспрессируют функциональный γδTCR 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, то есть экспрессирующие αβTCR или γδTCR, экспрессируют комплекс Т-клеточного рецептора на поверхности клеток. γδТ-клетки, которые составляют примерно 1-5% от общей популяции Т-клеток в периферической крови человека, можно разделить на дополнительные подгруппы. Субпопуляция γδТ-клеток составляет Vγ9Vδ2 Т-клетки, которые экспрессируют Vγ9Vδ2 TCR. Внутри внеклеточного домена Т-клеточного рецептора располагаются области, определяющие комплементарность (CDR1, CDR2, CDR3). Эти области в целом представляют собой наиболее вариабельные домены и вносят существенный вклад в разнообразие среди TCR. CDR-области составляются в процессе развития Т-клетки, где так называемый вариабельный сегмент (V) гена, сегмент разнообразия- (D), и соединения- (J) случайным образом объединены с получением различных TCR.

«Vγ9Vδ2 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 пирофосфат (IPP) и его изомер диметилаллил пирофосфат (DMAPP). IPP является метаболитом из пути мевалоната. (E)-4-гидрокси-3-метил-бут-2-енилпирофосфат (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 Vγ9Vδ2 Т-клеток включает в себя клональную наработку, цитотоксическую активность и экспрессию цитокинов. «Vγ9Vδ2 Т-клетки» также определяются экспрессией Vγ9Vδ2 Т-клеточного рецептора. Например, клетки могут быть выбраны с использованием антитела, специфичного для Vγ9Vδ2 Т-клеточного рецептора, такого как описано ниже. Эти выбранные клетки подверглись перестройке гена γ и δ, и кодируют цепь Vγ9 Т-клеточного рецептора и цепь Vδ2 Т-клеточного рецептора. Из таких отобранных клеток может быть определена последовательность нуклеиновой кислоты (или аминокислоты), соответствующая цепи Vγ9 Т-клеточного рецептора и цепи Vδ2 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, γδTCR и Vγ9Vδ2 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, то есть 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, γδTCR, Vγ9 TCR цепи и Vδ2 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, Vγ9Vδ2 Т-клетки также могут быть определены и выбраны как положительные для Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 Т-клеток или сконструированных Vγ9Vδ2 Т-клеток, таких как доступные из BD Pharmingen (BD, 1 Becton Drive, Franklin Lakes, NJ USA), представляют собой Vγ9-PE (клон B3, # 555733), Vδ2-FITC (клон B6, # 555738), γδTCR-APC (клон B1, # 555718) или, например, доступные от Beckman Coulter представляют собой пан-γδTCR-PE (клон IMMU510, # 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

В первом аспекте изобретения, предлагается молекула иммуноглобулина, связывающая человеческий Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 Т-клеточный рецептор, представляет собой молекулу иммуноглобулина, которая связывается, например, с Vγ9Vδ2 Т-клеточным рецептором, таким как определенный аминокислотными последовательностями цепи Vγ9- и Vδ2 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 Vγ9Vδ2 Т-клеточный рецептор, например, SEQ ID NO. 71 и 72, вводят в контакт либо с контрольной молекулой иммуноглобулина, либо с молекулой иммуноглобулина, связывающейся с Vγ9Vδ2 Т-клеточым рецептором. В качестве альтернативы, Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 Т-клеточным рецептором. Количество иммуноглобулина, связанного с клеткой, увеличивается, когда специфическую молекулу иммуноглобулина сравнивают с контрольной молекулы иммуноглобулина, которая не связывается с Vγ9Vδ2 Т-клеточным рецептором (смотри, например, Фигуру 7). Молекула иммуноглобулина, связывающаяся с человеческим Vγ9Vδ2 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 контрольного 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 Vγ9Vδ2 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 областями, определяющими комплементарность (CDR). Термин включает, но не ограничиваются 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 конструкты, содержащие CDR, которые сохраняют антигенсвязывающую функцию. Как правило, такие фрагменты содержат антигенсвязывающий домен. Молекулы иммуноглобулинов или их фрагменты могут относиться к любому из известных изотипов 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.

Иммуноглобулины представляют собой белки, связанные с иммунной системой. Человеческие антитела состоят из четырех полипептидов - две тяжелые цепи и две легкие цепи, соединенные с образованием «Y»-образный молекулы (смотри фигуру 9a). Аминокислотная последовательность на концах «Y» сильно варьирует

среди различных антител. Каждый из концов содержит специфичность для связывания антигена. Вариабельная область человеческих антител включает в себя концы легких и тяжелых цепей, т.е. вариабельные 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, то есть молекула иммуноглобулина, содержит вариабельный домен. Вариабельный домен молекул иммуноглобулина подразделяется на гипервариабельную (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 гипервариабельности обозначаются как области, определяющие комплементарность (CDR). Молекулы иммуноглобулинов содержат три области, определяющие комплементарность (CDR1, CDR2 и CDR3). Четыре каркасные области с гораздо менее вариабельными аминокислотными последовательностями отделяют области CDR. Области CDR могут прямо связываться с антигеном, таким как Vγ9Vδ2 Т-клеточный рецептор (см., например, фигуру 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. фигуру 9B). Каждая из тяжелых цепей представляет собой молекулу иммуноглобулина с единственным вариабельным доменом. Такое антитело обозначается как одноцепочечное антитело, то есть 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 вариабельный домен

(см. фигуру 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 вариабельный 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 антител (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 Т-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 лама-подобное одноцепочечное антитело (см., например,

фигуру 9B), и содержит области CDR указанной человеческой последовательности тяжелой цепи, замененные последовательностями CDR согласно изобретению. 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 Vγ9Vδ2 T-клеточным рецептором, были отобраны с использованием стратегии с участием иммунизации Llama glamas с человеческими Vγ9Vδ2 T-клетками донорского происхождения и с использованием фагового дисплея. Последовательности VHH, которые были отобраны, секвенировали, и они представлены в таблице 3 и изображены на фигуре 1. CDR1, CDR2 и CDR3 области отобранных VHH приведены ниже в таблице 1. Каждая из CDR также приведена в таблице 3 с соответствующей последовательностью SEQ ID NO.

Таблица 1

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

		CDR1	%	CDR2	%	CDR3
N	Обознач.	GRTFSNYAMG		AISWSGGSTYYADSVKG		
1	5C7	GRTFSRYTMG	80	AISWSGGRTNFAGSVKG	71	DWLPVPGRESYDY
2	5E3	GRTFSSYAMG	90	AISWSGGTTYYADSVKG	94	SLDCSGPGCHTAEYDY
3	6H1	GRTFSEYAMG	90	AISWTGSKTYYADSVKG	82	SSDCSGPGCHTEEYDY
4	5G3	GRTFSSYAMG	90	AVSWSGGSTYYADSVKG	94	SQDCSGPGCYTNEYDS

5	5C1	GSIFSNYAMA	70	AVSWSGGRTYYADSVKG	88	SLSCSGPGCSLEEYDY
6	5D3	GRPFSNYAMG	90	VISWSGGSTYYADSVKG	94	QFSGASTVVAGTALDYDY
7	6E3	GRPFSNYGMG	90	GISWSGGSTDYADSVKG	88	VFSGAETAYYPSDDYDY
8	6H4	GRPFSNYGMG	90	GISWSGGSTDYADSVKG	88	VFSGAETAYYPSDDYDY
9	6C1	GRPFSNYGMG	90	GISWSGGSTDYADSVKG	94	VFSGAETAYYPSDDYDY
10	6H3	GRPFSNYGMG	90	GITWSGGSTHYADLVKG	76	VFSGAETAYYPSTEYDY
11	6G3	GRPFNNYGMG	70	GISWSGGSTYYADSVKG	94	VFSGAETAQYPSYDYDY
12	6F6	GRPFSNYAMG	90	AVTWSGGSTYYADSVKG	88	QFNGAENIVPATTTPTSYDY
13	5C8	GRPFSNYAMG	90	AISWSGGSTSYADSVKG	94	QFSGADYGFGRLGIRGYEYDY
14	5E7	GRPFSNYAMG	90	AISWSGGSTSYADSVKG	94	QFSGADYGFGRLGIQGYEYDY
15	5F5	GRTFSNYAMG	100	AISWSGGSTYYADSVKG	100	MFSGSESQLVVVITNLYEYDY
16	6A1	GRTFSNYAMG	100	TISWSGGSTYYADSVKG	94	AFSGSDYANTKKEVEYDY
17	5D7	GRTFSNYAMG	100	AISWSGGMTDHADSVKG	82	AFAGDIPYGSSWYGDPTTYDY
18	5B11	GRTSSTFSMA	50	AINWSGGSTRYADSVSD	76	RRGGIYYSTQNDYDY
19	6C4	VRTFSDYRMG	70	TISWSGGLTYYADSVKG	94	GGGYAGGTYYHPEE
20	6E4	GFTFDDYCIA	40	CITTSDGSTYYADSVKG	76	YFGYGCYGGAQDYRAMDY

У иммуноглобулинов, которые были отобраны авторами изобретения для связывания с Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 Т-клеточного рецептора. Большая вариабельность была обнаружена для области CDR3, которая, без привязки к теории, может вовлекать последовательность CDR3 в функциональность молекулы иммуноглобулина, то есть в тип модуляции, такой как блокирование активации Vγ9Vδ2 Т-клеток, индуцирование активации Vγ9Vδ2 Т-клеток или ни блокирование активации, ни индуцирование активации Vγ9Vδ2 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. фигуру 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 T в положении 9, A 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 Vγ9Vδ2 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 таблице 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 антитело 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. 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 имеет комбинации аминокислотных последовательностей областей CDR1, CDR2 и CDR3 из антител, таких, как перечисленные в таблице 1. В одном воплощении, молекула иммуноглобулина, одноцепочечное антитело или однодоменное антитело содержит 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 Vγ9Vδ2 Т-клеточным рецептором, когда она связывается с человеческой Vγ9Vδ2 Т-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 Vγ9Vδ2 Т-клетками, она может вызвать иммунный ответ, направленный против человеческих Vγ9Vδ2 Т-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 Vγ9Vδ2 Т-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 таблицу 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 Vγ9Vδ2 Т-клеточным рецептором, где молекула иммуноглобулина представляет собой молекулу иммуноглобулина, которая блокирует активацию человеческих Vγ9Vδ2 Т-клеток. Блокирование активации человеческих Vγ9Vδ2 Т-клеток является предпочтительным при заболеваниях и/или терапиях, при которых нецелесообразна активация человеческих Vγ9Vδ2 Т-клеток.

Vγ9Vδ2 Т-клетки могут сильно и специфически активироваться с помощью низкомолекулярных непептидных фосфорилированных промежуточных продуктов, называемых фосфоантигенами (pAg), из пути мевалоната у млекопитающих или микробных дезоксиксилулоза-фосфатных путей. Фосфоантигены могут затем специфически распознаваться (что приводит к активации) с помощью Vγ9Vδ2 Т-клеток через взаимодействие между pAg и мембраносвязанными молекулами бутирофилин3A1/CD277. Молекулы иммуноглобулинов,

связывающиеся с Vγ9Vδ2 Т-клеточным рецептором, как показано в примерах, могут блокировать активацию Vγ9Vδ2 Т-клеток, индуцированную фосфоантигенами.

Предпочтительно, молекула иммуноглобулина, связывающаяся с человеческим Vγ9Vδ2 Т-клеточным рецептором, представляет собой молекулу иммуноглобулина, которая блокирует активацию человеческих Vγ9Vδ2 Т-клеток, представляет собой молекулу иммуноглобулина, связывающуюся с человеческим Vγ9Vδ2 Т-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 AISWSGGSTYYADSVKG; 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 Vγ9Vδ2 Т-клеточным рецептором, которая блокирует активацию человеческих Vγ9Vδ2 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 аминобисфосфонаты, такие как памидронат, алендронат, ризедронат, ибандроната и золедронат. Другой класс соединений включает в себя алкиламины, такие как изобутиламин, изоамиламина и n-бутиламина. Такие соединения могут быть использованы для лечения болезни Паджета, остеопороза, гиперкальциемии и профилактики костных осложнений в случае злокачественных костных метастазов. Это приводит к внутриклеточному аккумулированию эндогенных pAg изопентенилпирофосфата (I ПП) и последующей селективной активации и наработке Vγ9Vδ2 Т-клеток.Введение аминобифосфоната часто сопровождается острой лихорадочной реакцией, обусловленной этой селективной активацией Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 Т-клеточным рецептором, которые блокируют активацию человеческих Vγ9Vδ2 Т-клеток, могут предотвращать острую фазу реакции, вызванную например введением аминобисфосфоната 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 Vγ9Vδ2 Т-клеток *in*

vivo, которые могут происходить, например, во время инфекции, где Vγ9Vδ2 Т-клетки сверхстимулиированы или хронически стимулированы, или при некоторых злокачественных заболеванияях, когда хроническая сверхактивность пути мевалоната в опухолевых клетках может привести к истощению Vγ9Vδ2 Т-клеток. Такое (сверх) стимулирование может быть измерено у пациентов, например, путем измерения увеличения Vγ9Vδ2 Т-клеток по сравнению с исходным уровнем, или путем измерения избыточного уровня Vγ9Vδ2 Т-клеток, например, более чем 5% Т-клеток представляют собой Vγ9Vδ2 Т-клетки в сочетании с положительной регуляцией поверхностных маркеров, таких как CD69 (ранний маркер активации) или CD25 (поздний маркер активации) на Vγ9Vδ2 Т-клетках. Понятно, что из-за миграции Vγ9Vδ2 Т-клеток из крови в ткани, измерение избыточного уровня Vγ9Vδ2 Т-клеток не является обязательным требованием. С другой стороны, при хроническом сверхстимулировании, Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 Т-клеточным рецептором, которая блокирует активацию человеческих Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 Т-клеточным рецептором, которая блокирует активацию человеческих Vγ9Vδ2 Т-клеток, используется для блокирования активации человеческих Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 Т-клетки, то есть молекула иммуноглобулина, связывающаяся с человеческим Vγ9Vδ2 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 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 T в положении 9, A в положении 12, и V 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 Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 Т-клеток, зависят от их системной активации (например, путем

аминобисфосфонатов или синтетических фосфоантигенов, таких как BrHPP) или, например, от адоптивного переноса Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 Т-клетки, и которые предпочтительно связаны с агентом, может быть использована для активации Vγ9Vδ2 Т-клеток в клинических условиях.

Предпочтительно, указанная молекула иммуноглобулина, которая активирует человеческие Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 Т-клетки в место, где требуется действие человеческих Vγ9Vδ2 Т-клеток, в отличие от системной активации. Например, молекула иммуноглобулина, которая активирует человеческие Vγ9Vδ2 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 фигуре 9B), 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 Vγ9Vδ2 T-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 Vγ9Vδ2 T-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 Vγ9Vδ2 T-клетки, для активации человечески Vγ9Vδ2 T-клеток. Такое применение полезно, например, в анализах, таких как описанные в примерах.

В следующем воплощении указанная молекула иммуноглобулина, которая активирует человеческие Vγ9Vδ2 T-клетки, содержит метку. Эти молекулы иммуноглобулина особенно полезны для проточной цитометрии клеток, экспрессирующих человеческий Vγ9Vδ2 T-клеточный рецептор. Молекула иммуноглобулина может содержать метку, например, метку myc, как описано в примерах, или his-метку 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. Поскольку это иммуноглобулины, которые активируют человеческие Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 Т-клеток.

В следующем аспекте изобретения, предлагается молекула иммуноглобулина, которая не блокирует активацию человеческих Vγ9Vδ2 Т-клеток; и не активирует человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки, и где она представляет собой молекулу иммуноглобулина, связывающуюся с человеческим Vγ9Vδ2 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 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 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 Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 Т-клеток, содержит метку.

Эти молекулы иммуноглобулина особенно полезны для проточной цитометрии или иммуногистохимического детектирования клеток, экспрессирующих человеческий Vγ9Vδ2 Т-клеточный рецептор. Молекула иммуноглобулина может содержать метку, например, метку myc, 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 Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 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 T в положении 9, A 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 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.

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 Vγ9Vδ2 *Т-клеток донорского происхождения*

Vγ9Vδ2 Т-клетки, полученные от здорового донора (человека),

получали и культивировали, как описано (Schneiders FL, et al.Clin Immunol 2012; 142:194-200).

Получение Vγ9Vδ2 *Т-клеточных линий Jurkat и* Vγ9Vδ2 *Т-клеточных линий Jurma*

Клеточные линии Jurkat и JurMa, экспрессирующие Vγ9Vδ2 TCR, были синтезированы согласно ранее описанным методикам (Scholten KB, et al.Clin Immunol 2006; 119:135-45). Вкратце, белковые последовательности Vγ9- и Vδ2-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- Vγ9Vδ2 *TCR VHH*

2 Llama glamas иммунизировали четыре раза каждую с использованием 1×10^8 человеческих Vγ9Vδ2 Т-клеток донорского происхождения в стерильном PBS в течение шести недель. Фаговые библиотеки конструировали из экстрагированной РНК, выделенной из PBMC лам, как описано ранее (Roovers RC et al. Cancer Immunol Immunother. 2007; 56: 303-17) и лигировали в фагмидный вектор pUR8100. VHH, специфичные к Vγ9Vδ2 Т-клеточному рецептору (TCR), генерировалис помощью двух раундов селекций фагового дисплея. В 1-м раунде, фаги из обеих библиотек инкубировали в течение 2 часов при 4°C с клетками Jurkat, трансдуцированными для стабильной экспрессии Vγ9Vδ2 TCR (Jurkat Vγ9Vδ2). После инкубации клетки отмывали и фаги элюировали с помощью 100 мМ HCl. Через 7 минут 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 2x в течение 1 часа при 4°C с клетками Jurkat, после чего несвязанные фаги инкубировали в течение 1 часа с Jurkat Vγ9Vδ2. 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 гидролизовали с помощью Sfi1/BstEII и клонировали в плазмиду pMEK219, производное от pHen1 (Hoogenboom et al. Nucleic Acids Res 1991) с добавлением кассеты HC-V для возможности клонирования по Sfi1/BstEII, добавляли С-концевую Myc-метку и делецию 6x His-меткой последовательности genIII. PMEK219-VHH трансформировали в бактерии TG1. Ночную культуру использовали для инокуляции среды 2xTY, содержащей 0,1% глюкозу и 100 мкг/мл ампициллина. Когда OD_{600} достигало 0,5, добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Продуцирование белка обеспечивали в течение 2-5 часов. 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 часа. Бактериальную суспензию оттаивали, слегка встряхивали в течение 1 часа при 4°C и центрифугировали при 4500 об./мин. в течение 30 минут. Надосадочную жидкость инкубировали с промытой смолой Talon (Clontech, 1290 Terra Bella Ave. Mountain View, CA, USA) в течение 1 часа 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 Vγ9Vδ2 *Т-клетками донорского происхождения или с* Vγ9Vδ2 *Т-клетками Jurkat.*

5×10^4 Vγ9Vδ2 Т-клеток донорского происхождения промывали буфером FACS.Все инкубации проводили в буфере FACS в течение 30 минут при 4°C. Клетки инкубировали с 25 мкл 500 нМ VHH. После промывания клетки инкубировали с 10 мкл 1:500 клона 4A6 антитела

против Myc (Merck Millipore, 290 Cocord роуд Billerica, MA, USA).После промывки клетки инкубировали вместе с 10 мкл 1: 200 козьего анти-мышиного F(ab)2 APC (Beckman Coulter, Фуллертон, Калифорния, США) в течение 30 минут при 4°C. После заключительного этапа промывки измеряли связывание VHH с клетками с помощью проточной цитометрии (FACSCalibur, BD Biosciences).

Активация Vγ9Vδ2 *Т-клеток донорского происхождения с помощью VHH*

На плоскодонные 96-луночные культуральные планшеты (Costar) наносили покрытие в течение ночи с помощью 50 мкл 4 мкг/мл клона 9E10 мышиного антитела к Myc (собственного производства) при 4°C. Лунки промывали PBS и блокировали 200 мкл 4% BSA/PBS, при комнатной температуре в течение 30 минут. Блокирующий раствор отбрасывали и лунки инкубировали с 30 мкл 500 нМ VHH в PBS в течение 2-х часов при комнатной температуре. Лунки промывали и добавляли 1×10^4 Vγ9Vδ2 Т 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 CO_2 инкубаторе с увлажненной атмосфере 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 Vγ9Vδ2 *Т-клеток донорского происхождения с помощью VHH*

Клетки HeLa инкубировали с указанными количествами аминобисфосфонатов (NBP; АВР Памидронат-динатрий, PHARMACHEMIE, Харлем, Нидерланды) в течение 2 часов при температуре 37°C в CO_2 инкубаторе с увлажненной атмосфере. 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-х часов при температуре 37°C в CO_2-инкубаторе в увлажненной атмосфере. Клетки промывали PBS и культивировали в 100 мкл IMDM+. Vγ9Vδ2 Т-клетки донорского происхождения инкубировали с указанной концентрацией VHH в течение 1 ч при 4°C. 75×10^3 VHH-инкубированные Vγ9Vδ2 Т-клетки добавляли в лунки, покрытые NBP-обработанными клетками HeLa и инкубировали при 37°C в CO_2-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

Vγ9Vδ2 Т-клеточную линию донорского происхождения окрашивали мышиным антителом к человеческому Vδ2-FITC и мышиным антителом к человеческому Vγ9-PE (оба BD Biosciences) и сортировали с использованием FACS Aria (BD Biosciences) для популяций: γδ Т-клетки, положительные по одиночной цепи Vδ2, γδ Т-клетки, положительные по одиночной цепи Vγ9, γδ Т-клетки, дважды положительные по Vγ9Vδ2, и γδ Т-клетки, дважды отрицательные по Vγ9Vδ2. Отсортированные клетки культивировали таким же образом, как Vγ9Vδ2 Т-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 Vγ9Vδ2 Т-клетками донорского происхождения с той корректировкой, что использовали 10 мкл 1:80 козьих антител к мышиному F(ab)2 RPE (# R0480 из Dako, Glostrup, Дания) для детектирования антитела к Myc.

Результаты

Отобранные VHH тестировали на специфичность, как описано выше, и все 20 VHH (таблица 2) продемонстрировали связывание с

клетками Jurkat, экспрессирующими Vγ9Vδ2 Т-клеточный рецептор, а также с первичными Vγ9Vδ2 Т-клетками, в то время как они не связывались с клетками Jurkat, не экспрессирующими Vγ9Vδ2 Т-клеточный рецептор.

Молекулы иммуноглобулинов, которые блокируют фосфоантиген-индуцированную активацию

Клоны 6F6 и 5E7 были охарактеризованы как нанотела, которые блокируют фосфоантиген-индуцированную стимуляцию Vγ9Vδ2 Т-клеток. Оба клона 6F6 и 5E7 являются нанотелами, которые связываются с Vδ2 цепью Vγ9Vδ2 Т-клеточного рецептора. Экспрессия GrB, CD25 и IFN-гамма была аналогична нестимулированным контролям, в то время как положительный контроль продемонстрировал относительные высокие уровни экспрессии (смотри фигуру 2). В кривой доза-ответ, при экспонировании с фосфоантигеном представлена дозозависимая нетрализация фосфоантиген-индуцированной Vγ9Vδ2 Т-клеточной активации (см. фигуру 3). Далее было показано, что нанотело VHH 5E7 ингибирует активацию Vγ9Vδ2 Т-клеток с помощью аминобисфосфонатов (ABP) дозозависимым образом, то есть 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 Vγ9Vδ2 Т-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 Vγ9Vδ2 Т-клеток, что приводило к повышенному лизису клеток Daudi. Опять же, нанотело 5E7 уменьшало лизис клеток Дауди в дозозависимым образом. Это указывает на то, что любая нежелательная активация Vγ9Vδ2 Т-клеток может быть уменьшена с помощью нанотела, которое блокирует активацию Vγ9Vδ2 Т-клеток. Такое антитело, которое блокирует активацию Vγ9Vδ2 Т-клеток, может представлять собой антитело, которое связывается с цепью Vδ2 Vγ9Vδ2 Т-клеточного рецептора.

Молекулы иммуноглобулина, которые вызывают активацию

Было продемонстрировано, что различные VHH активируют Vγ9Vδ2 Т-клетки, как это показано с помощью увеличения экспрессии CD25 и увеличения экспрессии IFN-гамма (см. фигуру 4). Кроме того, такие VHH продемонстрировали типичный дозовый ответ, то есть увеличение дозы VHH также приводило к увеличению экспрессии CD25 (см. фигуру 5, правая панель). Такой VHH был также связан с молекулой иммуноглобулина и изучали влияние на апоптоз опухолевых клеток (см. фигуру 6). Биспецифичный VHH (связывание противораковой клеткой и связывание Vγ9Vδ2 Т-клеток и активация) продемонстрировал высокую активность по отношению к гибели опухолевых клеток. Биспецифичный VHH получали путем связывания нанотела 6H4 к Vγ9Vδ2 с нанотелом против опухоли. Как и биспецифичные контроли, нанотело к Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 Т-клетки, так и опухолевые клетки, индуцировали примерно 85% лизиса опухолевых клеток, опосредованного Vγ9Vδ2 Т-клетками. В кривой дозового ответа, процент лизиса с помощью Vγ9Vδ2 Т-клеток уменьшался при более низкой дозе (1 нМ, примеро 80%, 100пМ примерно 78%, 10пМ 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 Vγ9Vδ2 Т-клеток может быть повышен с помощью биспецифичных VHH (или нанотел), в которых и опухолевые, и Vγ9Vδ2 Т-клетки являются мишенями, и где конкретное нацеливание на опухоль Vγ9Vδ2 Т-клеток вызывает также активацию Vγ9Vδ2 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 Vγ9Vδ2 Т-клеток, ни того, что они оказывают эффект на блокирование фосфоантигеном активации человеческих Vγ9Vδ2 Т-клеток (фигура 8 и фигура 5, левая панель). Такие VHH полезны, например, в FACS сортировке (см. фигуру 7).

Разделение с использованием магнитных шариков

Антитело к Vδ2 (например, 6H4) или нанотело Vγ9 (например, 6H1) биотинилировали и смешивали с PBMC. 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 магнитноой разделяющей колонки. PBMC анализировали на FACS в отношении экспрессии Vγ9 и Vδ2. Отличной очистки добивались как с использованием антитела к Vγ9, так и с нанотелами Vδ2. Например, с использованием нанотела 6H4 4,5% PBMC экспрессировали обе цепи, после разделения на магнитных шариках 97,4% клеток были положительными для обеих цепей Vγ9 и Vδ2. Фракция клеток, которые не связываются с магнитными шариками, были отрицательными для обеих цепей Vγ9 и Vδ2 (0%).

Таблица 2

Связывание VHH с γδ Т- клетками, экспрессирующими Vγ9Vδ2 или не экспрессирующими Vγ9Vδ2 или экспрессирующими одиночную цепь Vγ9 и Vδ2.

N	Обознач.	Vδ2+	Vγ9 +	Vγ9Vδ2 +	Vγ9Vδ2 -
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 (B=связывание, нет активации, нет блокирования активации фосфоантигеном (PA); A=активация; PA=блокирует активацию PA)

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	AISWSGGTTYYADSVKG
6	5E3	CDR3	A	SLDCSGPGCHTAEYDY
7	6H1	CDR1	A	GRTFSEYAMG
8	6H1	CDR2	A	AISWTGSKTYYADSVKG
9	6H1	CDR3	A	SSDCSGPGCHTEEYDY
4	5G3	CDR1	A	GRTFSSYAMG
10	5G3	CDR2	A	AVSWSGGSTYYADSVKG
11	5G3	CDR3	A	SQDCSGPGCYTNEYDS
12	5C1	CDR1	A	GSIFSNYAMA
13	5C1	CDR2	A	AVSWSGGRTYYADSVKG
14	5C1	CDR3	A	SLSCSGPGCSLEEYDY
15	5D3	CDR1	A	GRPFSNYAMG
16	5D3	CDR2	A	VISWSGGSTYYADSVKG
17	5D3	CDR3	A	QFSGASTVVAGTALDYDY
18	6E3	CDR1	A	GRPFSNYGMG
19	6E3	CDR2	A	GISWSGGSTDYADSVKG
20	6E3	CDR3	A	VFSGAETAYYPSDDYDY
18	6H4	CDR1	A	GRPFSNYGMG
19	6H4	CDR2	A	GISWSGGSTDYADSVKG
20	6H4	CDR3	A	VFSGAETAYYPSDDYDY

18	6C1	CDR1	A	GRPFSNYGMG
19	6C1	CDR2	A	GISWSGGSTDYADSVKG
20	6C1	CDR3	A	VFSGAETAYYPSDDYDY
18	6H3	CDR1	A	GRPFSNYGMG
21	6H3	CDR2	A	GITWSGGSTHYADLVKG
22	6H3	CDR3	A	VFSGAETAYYPSTEYDY
23	6G3	CDR1	A	GRPFNNYGMG
24	6G3	CDR2	A	GISWSGGSTYYADSVKG
25	6G3	CDR3	A	VFSGAETAQYPSYDYDY
15	6F6	CDR1	PA	GRPFSNYAMG
26	6F6	CDR2	PA	AVTWSGGSTYYADSVKG
27	6F6	CDR3	PA	QFNGAENIVPATTTPTSYDY
15	5C8	CDR1	A	GRPFSNYAMG
28	5C8	CDR2	A	AISWSGGSTSYADSVKG
29	5C8	CDR3	A	QFSGADYGFGRLGIRGYEYDY
15	5E7	CDR1	PA	GRPFSNYAMG
28	5E7	CDR2	PA	AISWSGGSTSYADSVKG
30	5E7	CDR3	PA	QFSGADYGFGRLGIQGYEYDY
31	5F5	CDR1	A	GRTFSNYAMG
32	5F5	CDR2	A	AISWSGGSTYYADSVKG
33	5F5	CDR3	A	MFSGSESQLVVVITNLYEYDY
31	6A1	CDR1	A	GRTFSNYAMG
34	6A1	CDR2	A	TISWSGGSTYYADSVKG
35	6A1	CDR3	A	AFSGSDYANTKKEVEYDY
31	5D7	CDR1	B	GRTFSNYAMG
36	5D7	CDR2	B	AISWSGGMTDHADSVKG
37	5D7	CDR3	B	AFAGDIPYGSSWYGDPTTYDY
38	5B11	CDR1	B	GRTSSTFSMA
39	5B11	CDR2	B	AINWSGGSTRYADSVSD
40	5B11	CDR3	B	RRGGIYYSTQNDYDY
41	6C4	CDR1	B	VRTFSDYRMG
42	6C4	CDR2	B	TISWSGGLTYYADSVKG
43	6C4	CDR3	B	GGGYAGGTYYHPEE
44	6E4	CDR1	A	GFTFDDYCIA
45	6E4	CDR2	A	CITTSDGSTYYADSVKG
46	6E4	CDR3	A	YFGYGCYGGAQDYRAMDY
47	5C7	VHH		EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTF SRYTMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGGRT NFAGSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCAADWLPVPGRESYDYWGQGT QVTVSS
48	5E3	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRTF SSYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGGTT YYADSVKGRFTISRDNAKNTVSLQMNSLK PEDTAVYFCAASLDCSGPGCHTAEYDYWG QGTQVTVSS

49	6H1	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAATGRTF SEYAMGWFRQAPGKEREFAAAISWTGSKT YYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCAASSDCSGPGCHTEEYDYWG QGTQVTVSS
50	5G3	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTF SSYAMGWFRQAPGKEREFVAAVSWSGGST YYADSVKGRFTISRDNARNTVYLQMNSLN PEDTAVYYCAASQDCSGPGCYTNEYDSWG QGTQVTVSS
51	5C1	VHH		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIF SNYAMAWFRQAPEKERDFLAAVSWSGGRT YYADSVKGRFTISRDNAKNTVNLQMNSLK PEDTAVYYCAASLSCSGPGCSLEEYDYWG QGTQVTVSS
52	5D3	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF SNYAMGWFRQAPGKEREFVTVISWSGGST YYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCAAQFSGASTVVAGTALDYDY WGQGTRVTVSS
53	6E3	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF SNYGMGWFRQAPGKKREFVAGISWSGGST DYADSVKGRLTISRDNAKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCAAVFSGAETAYYPSDDYDYW GQGTQVTVSS
54	6H4	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF SNYGMGWFRQAPGKKREFVAGISWSGGST DYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCAAVFSGAETAYYPSDDYDYW GQGTQVTVSS
55	6C1	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF SNYGMGWFRQAPGKKRESVAGISWSGGST DYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCAAVFSGAETAYYPSDDYDYW GQGTQVTVSS
56	6H3	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRPF SNYGMGWFRQAPGKEREFVAGITWSGGST HYADLVKGRFTISRDNAKNTVHLQMNSLK PEDTAVYYCAAVFSGAETAYYPSTEYDYW GQGTQVTVSS
57	6G3	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF NNYGMGWFRQAPGKEREFVAGISWSGGST YYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCAAVFSGAETAQYPSYDYDYW GQGTQVTVSS
58	6F6	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRPF SNYAMGWFRQAPGKEREFVAAVTWSGGST YYADSVKGRFAISRDNAKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCAAQFNGAENIVPATTTPTSY DYWGQGTQVTVSS

59	5C8	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF SNYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGGST SYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSPK PEDTAIYYCAAQFSGADYGFGRLGIRGYE YDYWGQGTQVTVSS
60	5E7	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF SNYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGGST SYADSVKGRFTISRDNAENTVYLQMNSPK PEDTAIYYCAAQFSGADYGFGRLGIQGYE YDYWGQGTQVTVSS
61	5F5	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTF SNYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGGST YYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCAAMFSGSESQLVVVITNLYE YDYWGQGTQVTVSS
62	6A1	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTF SNYAMGWFRQAPGKEREFVATISWSGGST YYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCAAAFSGSDYANTKKEVEYDY WGQGTQVTVSS
63	5D7	VHH		1EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCIASGRT FSNYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGGM TDHADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSL KPEDTAVYYCAAAFAGDIPYGSSWYGDPT TYDYWGQGTQVTVSS
64	B11	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTS STFSMAWFRQAPRKEREFVAAINWSGGST RYADSVSDRFAISRDNAKNTVYLQMNNLK PEDTAVYYCAARRGGIYYSTQNDYDYWGQ GTQVTVSS
65	6C4	VHH		3EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSVRT FSDYRMGWFRQAPGKEREFVSTISWSGGL TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL KPEDTAVYYCAAGGGYAGGTYYHPEEWGQ GTQVTVSS
66	6E4	VHH		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTF DDYCIAWFRQAPGKEREPVSCITTSDGST YYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNRLK PEDTAVYYCAAYFGYGCYGGAQDYRAMDY WGKGTLVTVSS
67	5C7	FRW1		EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAAS
68	5C7	FRW2		WFRQAPGKEREFVA
69	5C7	FRW3		RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYY CAA
70	5C7	FRW4		WGQGTQVTVSS

71	Человеческая цепь V гамма 9	TCR		MLSLLHASTLAVLGALCVYGAGHLEQPQI SSTKTLSKTARLECVVSGITISATSVYWY RERPGEVIQFLVSISYDGTVRKESGIPSG KFEVDRIPETSTSTLTIHNVEKQDIATYY CALWEAQQELGKKIKVFGPGTKLIITDKQ LDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLC LLEKFFPDVIKIHWEEKKSNTILGSQEGN TMKTNDTYMKFSWLTVPEKSLDKEHRCIV RHENNKNGVDQEIIFPPIKTDVITMDPKD NCSKDANDTLLLQLTNTSAYYMYLLLLLK SVVYFAIITCCLLRRTAFCCNGEKS
72	Человеческая цепь V дельта 2	TCR		MQRISSLIHLSLFWAGVMSAIELVPEHQT VPVSIGVPATLRCSMKGEAIGNYYINWYR KTQGNTMTFIYREKDIYGPGFKDNFQGDI DIAKNLAVLKILAPSERDEGSYYCACDTL GMGGEYTDKLIFGKGTRVTVEPRSQPHTK PSVFVMKNGTNVACLVKEFYPKDIRINLV SSKKITEFDPAIVISPSGKYNAVKLGKYE DSNSVTCSVQHDNKTVHSTDFEVKTDSTD HVKPKETENTKQPSKSCHKPKAIVHTEKV NMMSLTVLGLRMLFAKTVAVNFLLTAKLF FL

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическая молекула иммуноглобулина, содержащая антитело, которое активирует человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки, связанное со специфичным к опухолевому антигену антителом, где указанное антитело, которое активирует человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки, связывает цепь Vδ2 Vγ9Vδ2 Т-клеточного рецептора.

2. Биспецифическая молекула по п. 1, где указанное антитело, которое активирует человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки, представляет собой одноцепочечное или однодоменное антитело.

3. Биспецифическая молекула по п. 1, где указанное антитело, которое активирует человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки, представляет собой одноцепочечное антитело, и указанное специфичное к опухолевому антигену антителу представляет собой одноцепочечное антитело.

4. Биспецифическая молекула по п. 1, где указанное антитело, которое активирует человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки, представляет собой однодоменное антитело, и указанное специфичное к опухолевому антигену антителу представляет собой однодоменное антитело.

5. Биспецифическая молекула иммуноглобулина, содержащая однодоменное антитело, которое активирует человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки, связанное со специфичным к опухолевому антигену однодоменному антителу, где указанное однодоменное антитело, которое активирует человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки, связывает цепь Vδ2 Vγ9Vδ2 Т-клеточного рецептора.

6. Биспецифическая молекула иммуноглобулина, содержащая VHH, которое активирует человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки, связанное со специфичным к опухолевому антигену VHH, где указанное VHH, которое активирует человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки, связывает цепь Vδ2 Vγ9Vδ2 Т-клеточного рецептора.

7. Биспецифическая молекула иммуноглобулина, содержащая антитело, которое активирует человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки, связанное со специфичным к опухолевому антигену антителу, где указанное антитело, которое активирует человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки, связывает Vγ9d2 дважды позитивныеТ клетки и Vd2 единожды позитивные Т клетки, но не Vγ9 единожды позитивные Т клетки.

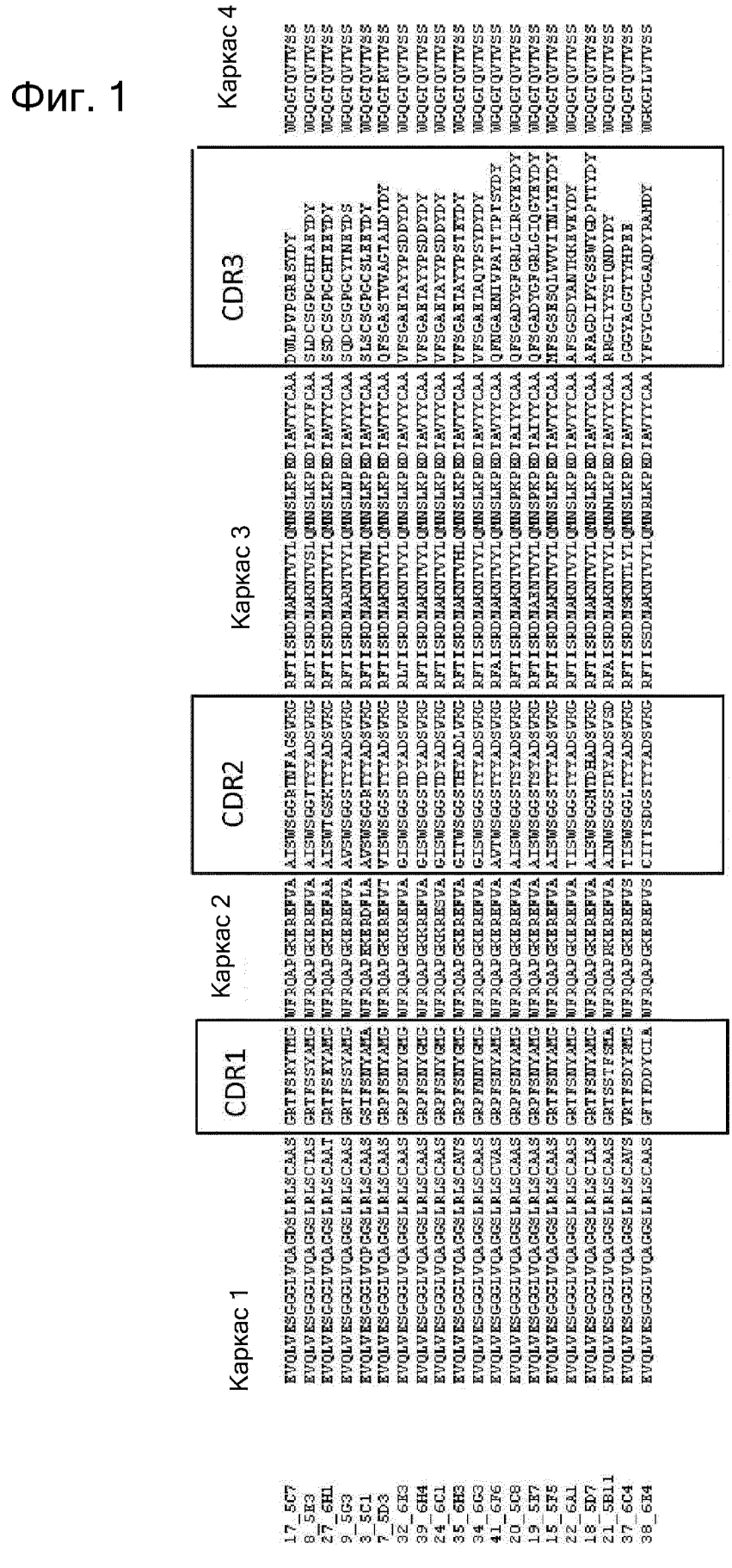
8. Биспецифическая молекула иммуноглобулина, содержащая антитело, которое активирует человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки, связанное со специфичным к опухолевому антигену антителу, где указанное антитело, которое активирует человеческие Vγ9Vδ2 Т-

клетки, связывает цепь Vδ2 Vγ9Vδ2 Т-клеточного рецептора, и где указанная биспецифическая молекула иммуноглобулина при концентрации 10 нМ способна индуцировать лизис А431 опухолевых клеток с более высоким процентом при инкубации в течение ночи, чем контрольные биспецифические молекулы иммуноглобулина, которые не имеют как антитела, которое активирует человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки, так и специфичного к опухолевому антигену антитела.

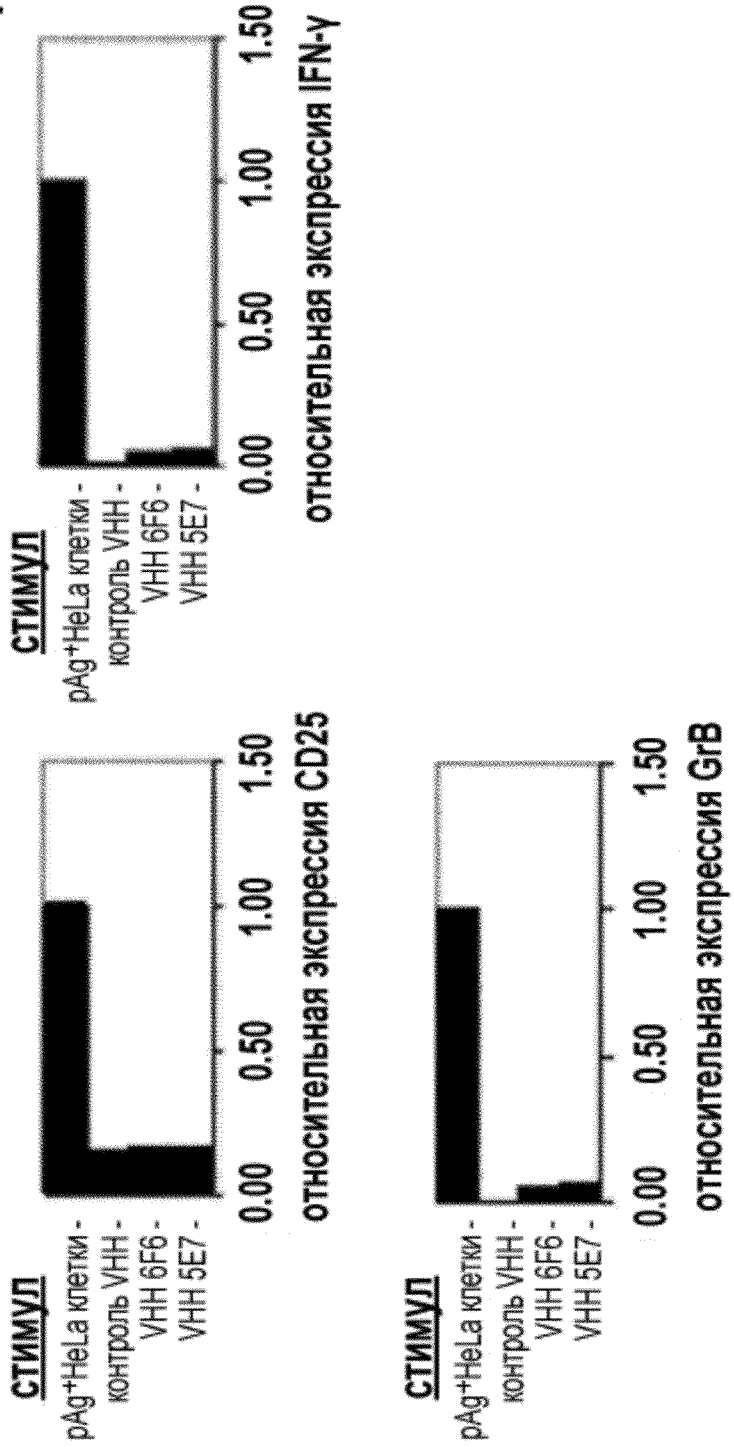
9. Способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, биспецифической молекулы иммуноглобулина, содержащей антитело, которое активирует человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки, связанное со специфичным к опухолевому антигену антителу, где указанное антитело, которое активирует человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки, связывает цепь Vδ2 Vγ9Vδ2 Т-клеточного рецептора.

По доверенности

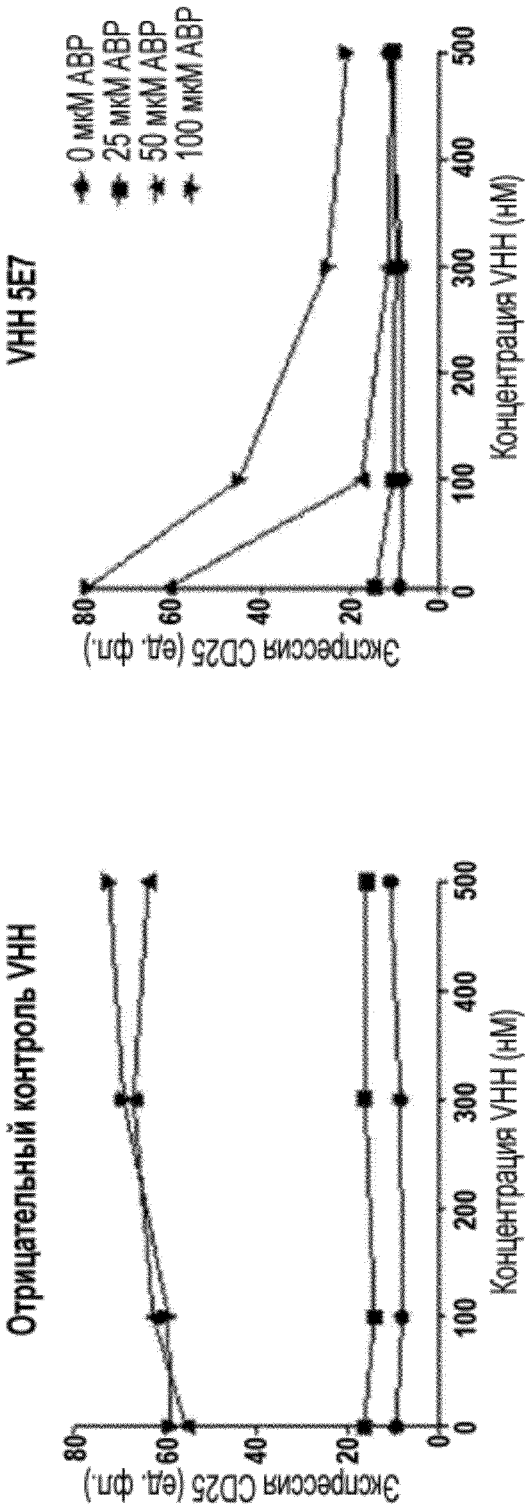
Фиг. 1


Каркас 1
CDR1
Каркас 2
CDR2
Каркас 3
CDR3
Каркас 4
17_5C7
8_5E3
27_6H1
9_5G3
3_5C1
7_5D3
32_6E3
39_6H4
24_6C1
35_6H3
34_6G3
41_6F6
20_5C8
19_5E7
15_5F5
22_6A1
18_5D7
21_5B11
37_6C4
38_6B4

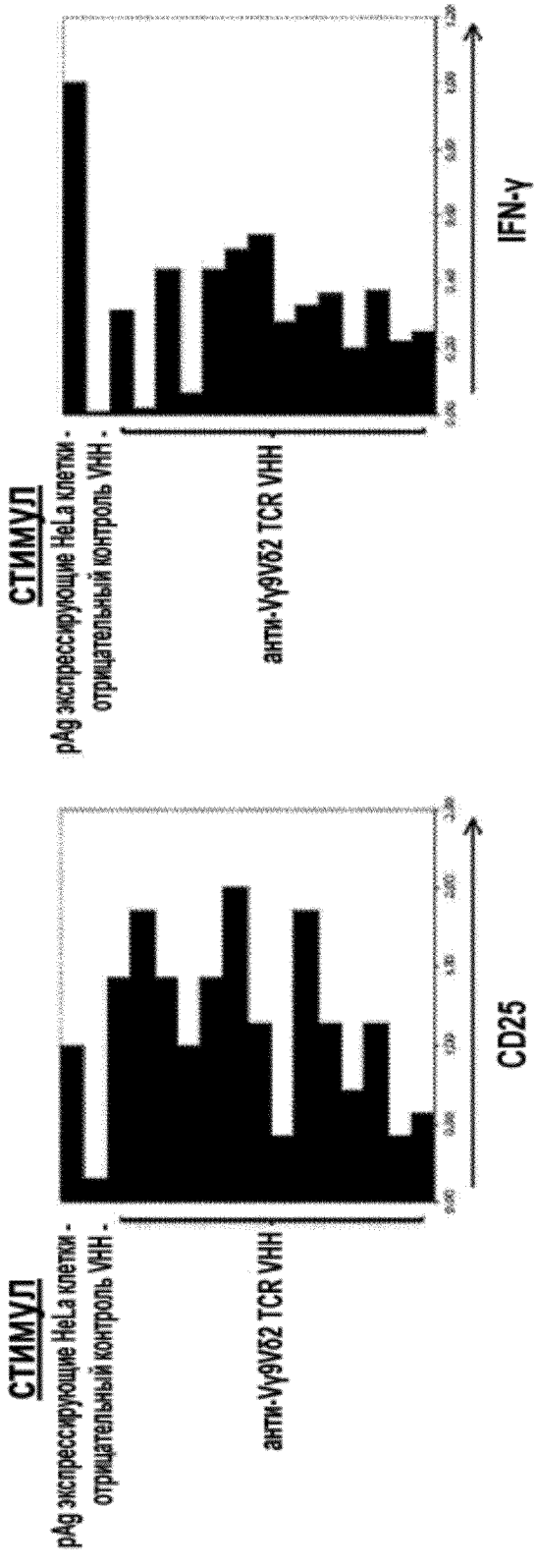
ФИГ.2


стимул
pAg+HeLa клетки -
контроль VHH -
VHH 6F6 -
VHH 5E7 -
0.00
0.50
1.00
1.50
относительная экспрессия IFN-γ
относительная экспрессия CD25
относительная экспрессия GrB

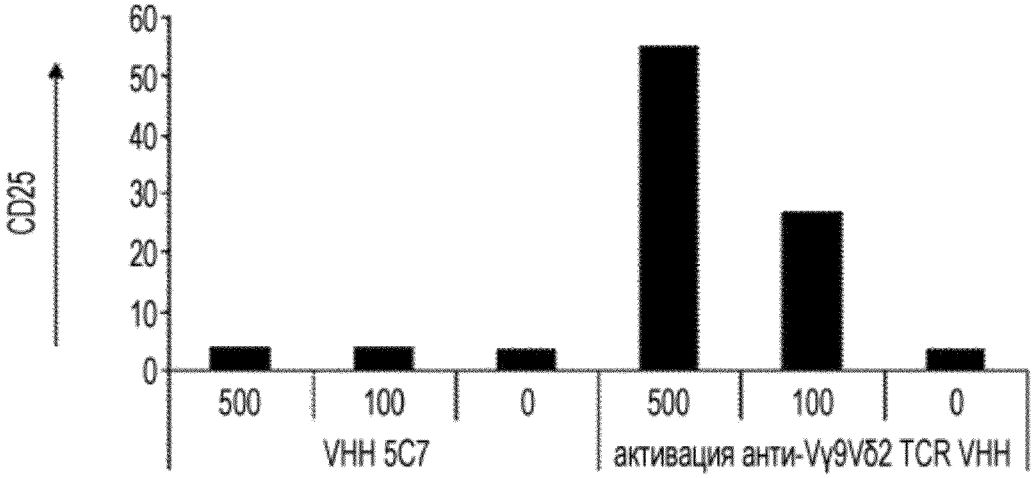
ФИГ.3


VHH 5E7
0 мкМ ABP
25 мкМ ABP
50 мкМ ABP
100 мкМ ABP
Экспрессия CD25 (ед. фл.)
Концентрация VHH (нМ)
Отрицательный контроль VHH
Экспрессия CD25 (ед. фл.)
Концентрация VHH (нМ)

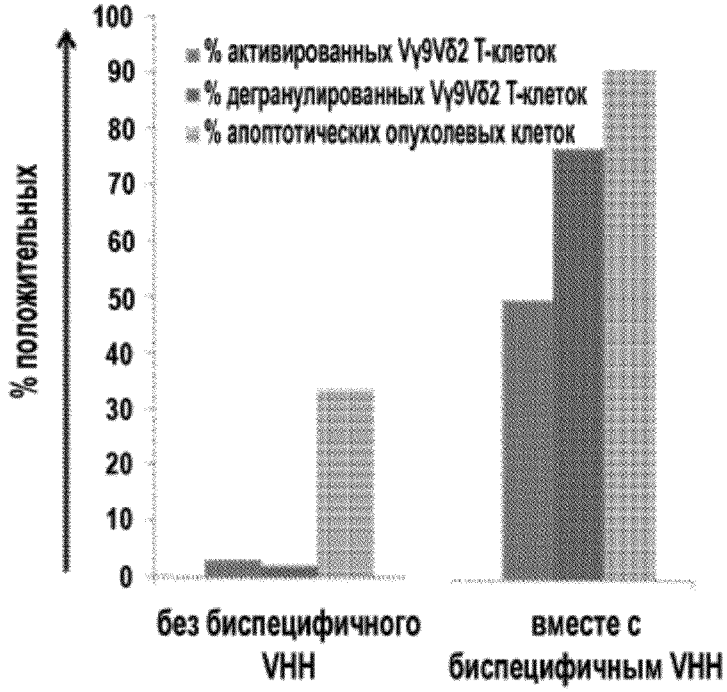
ФИГ.4


IFN-γ
CD25
СТИМУЛ
pAg экспрессирующие HeLa клетки -
отрицательный контроль VHH -
анти-Vγ9Vδ2 TCR VHH

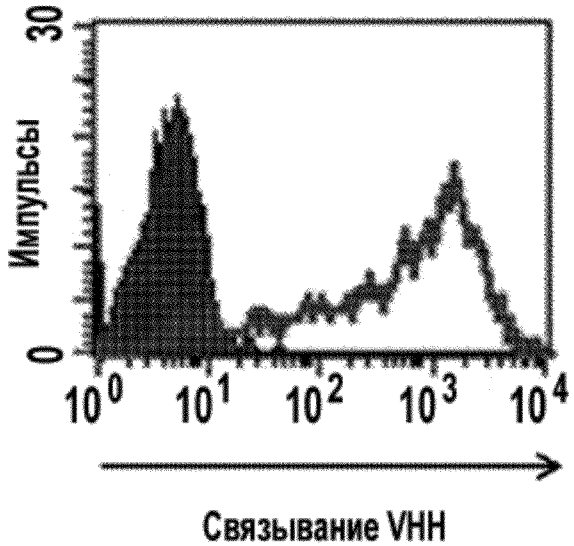
ФИГ.5


CD25
60
50
40
30
20
10
0
500
100
0
500
100
0
VHH 5C7
активация анти-Vγ9Vδ2 TCR VHH

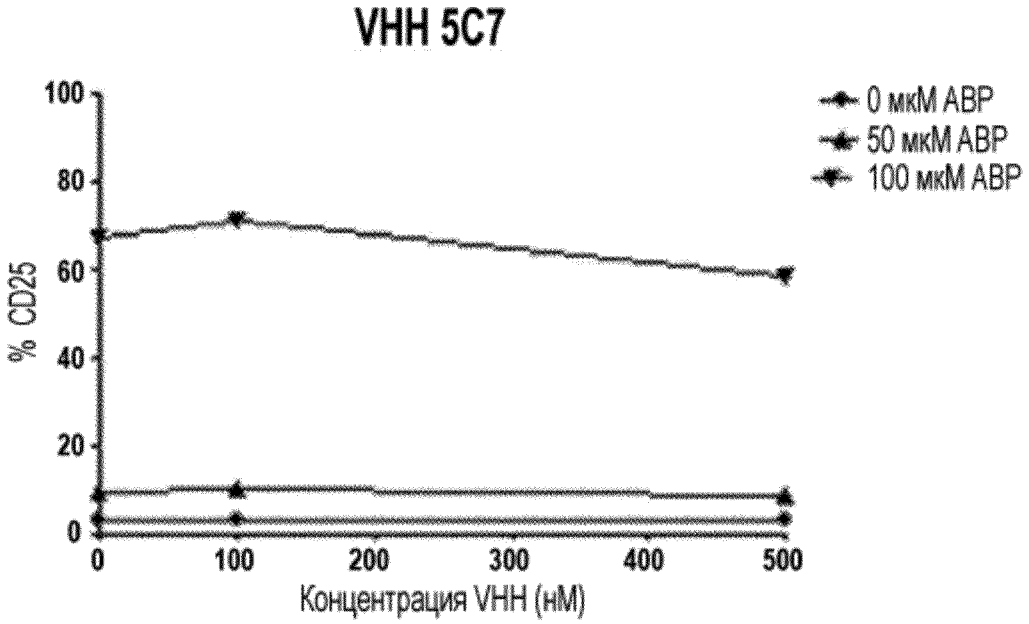
ФИГ.6


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% положительных
% активированных Vγ9Vδ2 Т-клеток
% дегранулированных Vγ9Vδ2 Т-клеток
% апоптотических опухолевых клеток
без биспецифичного VHH
вместе с биспецифичным VHH

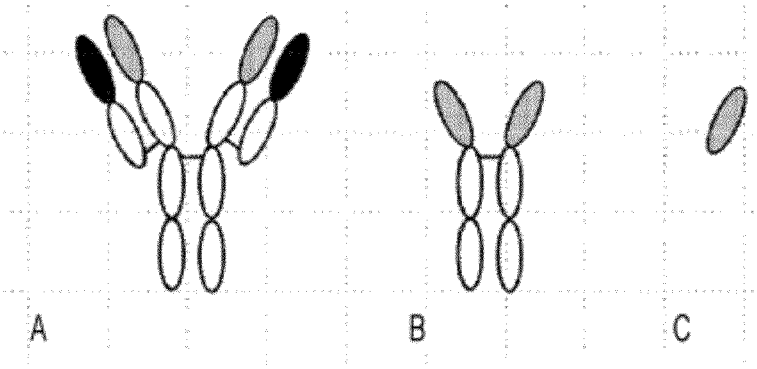
ФИГ.7


30
0
Импульсы
10 0
10 1
10 2
10 3
10 4
Связывание VHH

ФИГ.8


VHH 5C7
100
80
60
40
20
0
% CD25
0
100
200
300
400
500
Концентрация VHH (нМ)
0 мкМ ABP
50 мкМ ABP
100 мкМ ABP

ФИГ.9



ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202192165

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C07K 16/28 *(2006.01)*
C07K 16/30 *(2006.01)*
C07K 16/46 *(2006.01)*
C07K 14/725 *(2006.01)*
A61K 39/395 *(2006.01)*
A61P 35/00 *(2006.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C07K 16/28, 16/30, 16/46, 14/725, A61K 39/395, A61P 35/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y A	OBERG Hans-Heinrich et al. Novel bispecific antibodies increase γδ T-cell cytotoxicity against pancreatic cancer cells. Cancer research, 2014 Mar 1, V. 74, N. 5, p.1349-1360 , DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0675, c. 1354-1358	1-6, 9 7-8
Y A	ACCARDO-PALUMBO Antonina et al. Phenotype and functional changes of Vγ9/Vδ2 T lymphocytes in Behçet's disease and the effect of infliximab on Vγ9/Vδ2 T cell expansion, activation and cytotoxicity. Arthritis research and therapy, 2010, V. 12, N. 3, p.1-6, DOI: 10.1186/ar3043, c.2	1-6, 9 7-8
Y A	SMOLAREK D. et al. Variable Fragments of Heavy Chain ntibodies (VHHs): A New Magic Bullet Molecule of Medicine? Postepy Hig Med Dosw (online), 2012, V. 66, p.348-358, DOI: 10.5604/17322693.1000334, c.353-354	1-6, 9 7-8
A	WO 2012/156958 A2 (INSTITUTO DE MEDICINA MOLECULAR et al.) 22.11.2012, реферат, формула	1-9

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:
«A» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«T» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **19/11/2021**

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

Документ подписан электронной подписью
Сертификат: 1623340346878
Владелец: CN=Рогожин Д.Ю.
Действителен: 10.06.2021-09.06.2026

Д.Ю. Рогожин