

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044007**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.18

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(21) Номер заявки
202090278

(22) Дата подачи заявки
2018.07.17

(54) **АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ОБЛАСТИ ПРОТИВ ДОМЕНОВ ФИБРОНЕКТИНА ТИПА III И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/533,341; 62/625,576**

(32) **2017.07.17; 2018.02.02**

(33) **US**

(43) **2020.08.18**

(86) **PCT/US2018/042495**

(87) **WO 2019/018402 2019.01.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Хуан Чичи, Ли Джон, Муни Джилл,
Насо Майкл (US)**

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

(56) VANTERPOOL et al. "A material-based platform to modulate fibronectin activity and focal adhesion assembly." BioResearch open access, 1 December 2014, Vol 3, No 6, pages 286-296. entire document, especially abstract; p. 288, col 1, para 2; p. 290, col 1, para 3; p. 294, col 1, para 3; Figure 3.

US-A1-20150038684

UniProtKB Accession No. D8SB13
"Uncharacterized conserved protein" 05 October 2010 [online]. [Retrieved on 18 December 2018]. Retrieved from the internet: <URL: <https://www.uniprot.org/uni-prot/D8SB13>> Entire document

UniProtKB Accession No. A0A168DVB3
"Pre-mRNA-splicing factor 38A" 06 July 2016)

[online]. [Retrieved on 18 December 2018]. Retrieved from the internet: <URL: <https://www.uniprot.org/uni-prot/A0A168DVB3>> Entire document

UniProtKB Accession No. A0A1V6DWF0

"Uncharacterized conserved protein" 07 June 2017) [online]. [Retrieved on 18 December 2018]. Retrieved from the internet: <URL: <https://www.uniprot.org/uni-prot/A0A1V6DWF0>> Entire document

WO-A1-2017118307

US-A1-20060121049

WO-A1-2017089447

US-A1-20170051071

US-A1-20100317539

US-A1-20160376365

WO-A1-2017002919

US-A1-20130287748

US-A1-20160053017

WO-A1-2017049296

US-A1-20160244521

US-A1-20110256154

US-A1-20070294782

US-A1-20120148607

US-A1-20050208048

UniProtKB Accession No. E1F8D8

"Uncharacterized protein", 30 November 2010 [online]. [Retrieved on 18 December 2018]. Retrieved from the internet: <URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/E1F8D8>> Entire document; sequence residues 181-188

US-A1-20120177664

US-A1-20140037638

US-A1-20140193427

US-A1-20130230516

(57) Предложен химерный антигенный рецептор (CAR), включающий внеклеточный домен, содержащий scFv, который специфически связывается с нерандомизированной областью домена FN3.

044007
B1

044007
B1

Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 29 июня 2018 г., называется JBI5032WOPCTSL.txt и имеет размер 88120 байт.

Область техники

Данное изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с доменами фибронектина типа III (домены FN3), а также к способам получения и применения описанных антител.

Предпосылки создания изобретения

Каркасы на основе фибронектина представляют собой семейство белков, способных к изменению для связывания с любым представляющим интерес соединением. Данные белки, которые, как правило, используют каркас, полученный из домена фибронектина типа III (FN3) или FN3-подобного, функционируют способом, характерным для природных или сконструированных антител (т. е. поликлональных, моноклональных или одноцепочечных антител), и, кроме того, обладают структурными преимуществами. В частности, структура таких имитаторов антител была разработана для оптимального фолдинга, стабильности и растворимости даже в условиях, которые обычно приводят к потере структуры и функции антител. Примером каркасных белков на основе фибронектина является Centyrin™ (Jacobs et al., Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012; US 2010/0216708).

Домены фибронектина типа III (Fn3) содержат от N-конца до C-конца бета или бета-подобную нить A; петлю AB; бета или бета-подобную нить B; петлю BC; бета или бета-подобную нить C; петлю CD; бета или бета-подобную нить D; петлю DE; бета или бета-подобную нить E; петлю EF; бета или бета-подобную нить F; петлю FG; и бета или бета-подобную нить G. Любая или все из петель AB, BC, CD, DE, EF и FG могут участвовать в связывании мишени. Петли BC, DE и FG структурно и функционально аналогичны определяющим комплементарность областям (CDR) из иммуноглобулинов.

Учитывая небольшой размер, отсутствие дисульфидных связей, высокую стабильность и способность экспрессироваться в прокариотических хозяевах, домены FN3 представили собой биофармацевтический интерес. Домены FN3 могут быть легко конъюгированы с лекарственными средствами/токсинами, эффективно проникают в ткани и могут быть легко составлены в мультиспецифические связывающие вещества и слитые белки, включая химерные антигенные рецепторы (CAR).

Несмотря на универсальность, в настоящее время нет доступных антител, которые бы специфически связывались с доменами FN3 для обнаружения, анализа или биофармацевтических целей.

Краткое описание изобретения

Данное изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с нерандомизированной областью домена фибронектина типа III (FN3). Также описаны родственные полинуклеотиды, способные кодировать предложенные антитела к домену FN3 и антигенсвязывающие фрагменты, клетки, экспрессирующие предложенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, а также соответствующие векторы и меченые с возможностью обнаружения антитела к домену FN3 и антигенсвязывающие фрагменты. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент селективно не связывается с рандомизированной областью домена FN3 по результатам ИФА в условиях, приведенных в примере 3.

Более того, описаны способы применения предложенных антител к домену FN3 и антигенсвязывающих фрагментов. Описанные антитела к домену FN3 и антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для обнаружения экспрессии химерных антигенных рецепторов (CAR), содержащих домены FN3, на поверхности Т-клеток. В другом варианте осуществления описанные антитела к домену FN3 и антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для активации Т-клеток, экспрессирующих CAR, содержащих домены FN3. В еще одном варианте осуществления описанные антитела к домену FN3 или антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для получения CAR, содержащих описанные антигенсвязывающие фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение включает выделенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с нерандомизированной областью домена FN3. Экспрессия химерных антигенных рецепторов (CAR), содержащих домены FN3, на поверхности Т-клеток может быть обнаружена при помощи данных антител к домену FN3 или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления антитела к домену FN3 или антигенсвязывающие фрагменты активируют Т-клетки, экспрессирующие CAR, содержащие домены FN3. В некоторых вариантах осуществления антитела к домену FN3 и антигенсвязывающие фрагменты связываются с доменом FN3, который модифицирован в петлевых областях. В табл. 1 представлены последовательности CDR антитела, специфического к домену FN3, описанного в данном документе.

Таблица 1

Последовательности CDR антител, специфических к домену FN3 (SEQ ID NO:)

Определе ние границ	HC- CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
IMGT	GIDLSTSV (1)	IYTNVNT (4)	ARAVYAGAMD (7)	ERIYSN (9)	KAS (11)	QYTSYSGS GYVGT (13)
Кабат	TSVMG (2)	FIYTNVNTYY ASWAKG (5)	AVYAGAMD L (8)	QASERIYSN LA (10)	KASTLAS (12)	QYTSYSGS GYVGT (13)
Чотия	GIDLSTSV (3)	YTNVN (6)	AVYAGAMD L (8)	QASERIYSN LA (10)	KASTLAS (12)	QYTSYSGS GYVGT (13)

Определе ние границ	HC- CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
IMGT	GFSLNT SGTG (35)	IWWDDDK (41)	VRIGRMDY (44)	QSVLFGSK QKNY (46)	WAS (48)	HQYLSLFT (50)
Кабат	TSGTGV G (36)	HIWWDDDKG YNPALKS (42)	IKGRMDY (45)	KSSQSVLFG SKQKNYLA (47)	WASTRES (49)	HQYLSLFT (50)
Чотия	GFSLNT SGT (37)	WWDDD (43)	IKGRMDY (45)	KSSQSVLFG SKQKNYLA (47)	WASTRES (49)	HQYLSLFT (50)

Определе ние границ	HC- CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
IMGT	GIDFSS VAY (38)	IYAGSSSSI (51)	ARGLFTSGS GYYIDM (54)	QSIGSD (56)	SAS (58)	QCTYSSST GYNA (60)
Кабат	SVAYM C (39)	CIYAGSSSIY YASWAKG (52)	GLFTSGSGY YIDM (55)	QASQSIGSN LA (57)	GASNLAA (59)	QRGYISSA VDFEV (61)
Чотия	GIDFSS VA (40)	YAGSSSS (53)	GLFTSGSGY YIDM (55)	QASQSIGSN LA (57)	GASNLAA (59)	QRGYISSA VDFEV (61)

В некоторых вариантах осуществления антитело к FN3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любой из аминокислотных последовательностей, описанных в табл. 1, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любой из аминокислотных последовательностей, описанных в табл. 1. Антитела к домену FN3 согласно изобретению могут содержать последовательность переменных областей тяжелой цепи SEQ ID NO: 14 и могут содержать переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 15. В других вариантах осуществления антитела к домену FN3 согласно изобретению могут содержать последовательность переменных областей тяжелой цепи SEQ ID NO: 74 и могут содержать переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 75. В других вариантах осуществления антитела к домену FN3 согласно изобретению могут содержать последовательность переменных областей тяжелой цепи SEQ ID NO: 78 и могут содержать переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 79.

Описанные в данном документе антитела к домену FN3 включают антитела с описанными свойствами CDR и переменных доменов в комбинации с любым из изотипов IgG, включая модифицированные версии, в которых последовательность Fc была модифицирована с целью влияния на различные эффекторные функции.

Помимо описанных антител к домену FN3 и антигенсвязывающих фрагментов, также предложены полинуклеотидные последовательности, способные кодировать антитела к домену FN3 и антигенсвязывающие фрагменты. Также предложены векторы, содержащие описанные полинуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие антитела к домену FN3 или антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в данном документе. Кроме того, описаны клетки, способные экспрессировать описанные векторы. Эти клетки могут представлять собой клетки млекопитающих (например, клетки 293F, клетки CHO), клетки насекомых (например, клетки Sf9), клетки дрожжей, клетки растений или бактериальные клетки (например, E. coli). Также предложен способ получения антител к домену FN3 или антигенсвязывающих фрагментов.

Данное изобретение также включает CAR согласно изобретению, содержащий выделенный полипептид, содержащий:

(а) внеклеточный домен, имеющий scFv, который специфически связывается с нерандомизирован-

ной областью домена FN3;

- (b) трансмембранный домен; и
- (c) внутриклеточный сигнальный домен.

CAR может дополнительно содержать шарнирную область, соединяющую внеклеточный домен и трансмембранный домен.

В некоторых вариантах осуществления полипептид, выделенный из CAR, содержит:

(a) внеклеточный домен, содержащий домен FN3 согласно изобретению, такой как домен FN3, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична одной из SEQ ID NO: 68-73, предпочтительно одной из SEQ ID NO: 68-73;

(b) шарнирную область, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 24, предпочтительно SEQ ID NO:24;

(c) трансмембранный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 25, предпочтительно SEQ ID NO:25; и

(d) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий костимулирующий домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 26, предпочтительно SEQ ID NO:26, и первичный сигнальный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 27, предпочтительно SEQ ID NO:27.

Данное изобретение также включает выделенный полинуклеотид, кодирующий CAR согласно изобретению, содержащий:

(a) внеклеточный домен, имеющий scFv, который специфически связывается с нерандомизированной областью домена FN3;

- (b) трансмембранный домен; и
- (c) внутриклеточный сигнальный домен.

CAR может дополнительно содержать шарнирную область, соединяющую внеклеточный домен и трансмембранный домен.

В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид, кодирующий CAR, содержит:

(a) внеклеточный домен, содержащий домен FN3 согласно изобретению, такой как домен FN3, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична одной из SEQ ID NO: 68-73, предпочтительно одной из SEQ ID NO: 68-73;

(b) шарнирную область, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 24, предпочтительно SEQ ID NO:24;

(c) трансмембранный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 25, предпочтительно SEQ ID NO:25; и

(d) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий костимулирующий домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 26, предпочтительно SEQ ID NO: 26, и первичный сигнальный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 27, предпочтительно SEQ ID NO: 27.

В еще одном общем аспекте данное изобретение относится к CAR согласно изобретению, к вектору, содержащему полинуклеотид, кодирующий CAR согласно изобретению, и к клетке-хозяину, содержащей вектор или выделенный полинуклеотид, кодирующий CAR согласно изобретению. Изобретение также относится к способу получения CAR согласно изобретению, включающему культивирование клетки-хозяина, содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую CAR, в условиях получения CAR, и выделение CAR. CAR может быть связан с клеткой-хозяином или выделенной клеточной мембраной из клетки-хозяина.

Согласно еще одному общему аспекту изобретение относится к сконструированным иммунным клеткам, содержащим CAR согласно изобретению. Предпочтительно сконструированные иммунные клетки представляют собой иммунные клетки с нокаутом Т-клеточного рецептора. Предпочтительно сконструированные иммунные клетки представляют собой иммунные клетки с нокаутом HLA-I/бета-2-микроглобулина. Необязательно, иммунные клетки с нокаутом HLA-I/бета-2-микроглобулина дополнительно являются иммунными клетками с нокаутом HLA-II, которые лишены аллогенных иммунных ответов от пациента-хозяина. Сконструированные иммунные клетки могут содержать второй CAR, имеющий внеклеточный домен, который специфически связывается с мишенью, отличной от домена FN3. Сконструированные иммунные клетки также могут быть резистентными по меньшей мере к одной противораковой химиотерапии.

В еще одном общем аспекте изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим сконструированные иммунные клетки согласно изобретению.

В еще одном общем аспекте изобретение относится к способу лечения патологического состояния, связанного с В-клетками, у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции согласно изобретению. В предпочтительном варианте осуществления патологическое состояние, связанное с В-клетками, представляет собой множественную миелому.

В еще одном общем аспекте изобретение относится к способу конструирования иммунной клетки

согласно изобретению, включающему обеспечение иммунной клетки и введение в клетку полипептида, кодирующего CAR согласно изобретению.

В еще одном общем аспекте изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, включающему объединение сконструированной иммунной клетки согласно изобретению с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

В рамках настоящего изобретения представлены наборы, в том числе раскрытые антитела к домену FN3 или их антигенсвязывающие фрагменты. Описанные наборы можно использовать для осуществления способов применения антител к домену FN3 или антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в данном документе, или других способов, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления описанные наборы могут содержать антитела к домену FN3 или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, и реагенты для применения в обнаружении наличия доменов FN3 в биологическом образце и, необязательно, сосуд для хранения антитела к домену FN3 или фрагмента, когда они не используются, инструкции по применению антитела к домену FN3 или фрагмента, антитело к домену FN3 или фрагмент, прикрепленные к твердой подложке, и/или меченые с возможностью обнаружения формы антитела к домену FN3 или фрагмента.

Краткое описание фигур

На фиг. 1А-С показано тестирование связывания рекомбинантных AS7B90 и AS7B91 с иммобилизованными доменами FN3 или белками отрицательного контроля и сравнение каждого из них с исходным антителом CEN25-105-5, полученным из кроличьей гибридомы. На фиг. 1А показаны данные связывания для tencon25, который не имеет специфичности к мишени. На фиг. 1В показаны данные связывания для А3, который представляет собой домен FN3, специфический к человеческому cMET. На фиг. 1С показаны данные связывания для 83v2-ABD, который представляет собой домен FN3, специфический к человеческому EGFR, с альбуминсвязывающим доменом.

На фиг. 2А-М показано, что AS7B91 был способен обнаруживать все CARTygin (центририны в формате CAR), экспрессируемые на поверхности Т-клеток.

На фиг. 3 показано обнаружение экспрессии AS7B91 scFv CAR на поверхности первичных Т-клеток с использованием меченого tencon 25.

На фиг. 4А-С показана специфическая к домену FN3 AS7B91 scFv CAR-BCMA дегрануляция в ответ на клетки-мишени, экспрессирующие BCMA. На фиг. 4А показаны клетки H929 (клетки с высокой экспрессией BCMA). На фиг. 4В показаны ARH77 (клетки с низкой экспрессией BCMA). На фиг. 4С показаны K562 (BCMA-отрицательные клетки). Различные домены FN3 инкубировали в концентрации 50 нМ с Т-клетками с AS7B91 scFv CAR, промывали и затем добавляли к клеткам - мишеням в соотношении 1:1. Вариант 1 BAR-T=AS7B91 scFv L-H CAR; Вариант 2 BAR-T= AS7B91 scFv H-L CAR.

На фиг. 5 показано AS7B91 scFv CAR-BCMA уничтожение клеток-мишеней, экспрессирующих BCMA. Клетки с высокой экспрессией BCMA, H929; Клетки с низкой экспрессией BCMA, ARH77; BCMA-отрицательные клетки, K562. Различные домены FN3 инкубировали в концентрации 25 нМ с Т-клетками с AS7B91 scFv CAR, промывали и затем добавляли к клеткам - мишеням в соотношении 1:1. Вариант 1 BAR-T=AS7B91 scFv L-H CAR; Вариант 2 BAR-T=AS7B91 scFv H-L CAR.

На фиг. 6 показано связывание меченого Tencon-25 с конструктами AS7B16 scFv CAR на Т-клетках. L2H, ориентация легкая цепь-тяжелая цепь AS7B16. H2L, ориентация тяжелая цепь-легкая цепь AS7B16.

На фиг. 7 показано связывание меченого 83v2 к EGFR с конструктами AS7B16 scFv CAR на Т-клетках. L2H, ориентация легкая цепь-тяжелая цепь AS7B16. H2L, ориентация тяжелая цепь-легкая цепь AS7B16.

На фиг. 8 показано связывание меченого Tencon-25 с конструктами AS7B82 scFv CAR на Т-клетках. L2H, ориентация легкая цепь-тяжелая цепь AS7B82. H2L, ориентация тяжелая цепь-легкая цепь AS7B16.

На фиг. 9 показано связывание меченого 83v2 к EGFR с конструктами AS7B82 scFv CAR на Т-клетках. L2H, ориентация легкая цепь-тяжелая цепь AS7B16. H2L, ориентация тяжелая цепь-легкая цепь AS7B16.

На фиг. 10 показано получение FcgR-экспрессирующих клеточных линий. Очищенные лентивирусные плазмиды экспрессии, кодирующие человеческие FcgR (CD16a, CD32 и CD64), упаковывали для трансфекции клеток 293Т с использованием Lenti-Pac HIV Expression Packaging System.

Фиг. 11А, В. Конъюгирование циклических цитруллинированных пептидов с центрином Tencon25 проводили в соотношении 1: 5 (центририн к пептиду) посредством химии сортазы. Конъюгаты очищали вручную на колонке с Ni-сефарозой (GE) для удаления свободной сортазы и пептида. После очистки проводили замену буфера на PBS и концентрировали конъюгаты. Конъюгаты проверяли на качество с помощью (а) масс-спектрометрии (ЖХ-МС) и (б) эксклюзионной хроматографии (Superdex 75) и подвергали стерильной фильтрации.

Фиг. 12. Обнаружение связывания антицитруллинированных антител с конъюгатами центрин-ССР1-пептид. Клетки НЕК293, экспрессирующие FcgR, инкубировали с 200 мкг/мл человеческого антитела против цитруллинированного фибриногена или изотипического контроля IgG1 человека. Связывание оценивали при помощи проточной цитометрии.

Фиг. 13. Опосредованное Т-клетками с AS7B91 scFv CAR уничтожение клеток, экспрессирующих

FcR, связанный с антицитруллинированным мкАт.

Фиг. 14А-С. Оценка потенциальных комбинаций пептид/антитело при множественных аутоиммунных заболеваниях для расширения платформы VAR-T. Пептиды, специфические для а) миастении гравис (МГ), b) рассеянного склероза (РС) и c) системной красной волчанки (СКВ), тестировали на их способность связываться с антителами против AChR, против MOG или против дцДНК, соответственно. На фиг. 14А раскрыты SEQ ID NO 85-87, соответственно, по порядку. На фиг. 14В раскрыты SEQ ID NO 88-90, соответственно, по порядку. На фиг. 14С раскрыты SEQ ID NO 91-93, соответственно, по порядку.

Подробное описание изобретения

Определения

В разделе "Предпосылки создания изобретения" и в тексте настоящей заявки приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; причем каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и т.п., которые были включены в настоящее описание, приведено в качестве контекста для настоящего изобретения. Такое обсуждение не является допущением того, что любой из таких источников или все такие источники являются частью предшествующего состояния знаний в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.

При использовании в этом описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают и множественное число, если содержание текста ясно не указывает на иное. Так, например, ссылка на "клетку" включает в себя комбинацию двух или более клеток и т.п.

В контексте настоящего документа термин "около" при указании измеримой величины, такой как количество, продолжительность во времени и т.п., считается охватывающим отклонения до $\pm 10\%$ от указанного значения, поскольку такие отклонения приемлемы для реализации описанных способов. Если не указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов, характеристик, таких как молекулярная масса, условий реакции и т.п., используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином "около". Соответственно, если не указано противоположное, числовые параметры, указанные в последующем описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приближенными значениями, которые могут варьироваться в зависимости от нужных свойств, которые требуется получить посредством настоящего изобретения. В самом крайнем случае, но не в качестве попытки ограничить применение теории эквивалентов к объему формулы изобретения, каждый числовой параметр должен по меньшей мере рассматриваться с учетом числа представленных значащих цифр и с использованием стандартных методик округления.

Хотя числовые диапазоны и параметры, устанавливающие широкий объем объекта изобретения, являются приблизительными, числовые значения, указанные в конкретных примерах, представлены настолько точно, насколько это возможно. Однако любое числовое значение по своей природе содержит определенные ошибки, неизбежно вытекающие из стандартного отклонения, обнаруживаемого при соответствующих тестовых измерениях.

Термин "выделенный" означает, что биологический компонент (например, нуклеиновая кислота, пептид или белок) был по существу отделен, получен отдельно от или очищен от других биологических компонентов организма, в котором компонент встречается в природе, т. е. от других хромосомных и внехромосомных ДНК, РНК и белков. Таким образом, нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, которые были "выделены", включают в себя нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными способами очистки. "Выделенные" нуклеиновые кислоты, пептиды и белки могут быть частью композиции и все еще считаться выделенными, если такая композиция не является частью исходной среды нуклеиновой кислоты, пептида или белка. Термин также включает в себя нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, полученные путем рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты. Используемый в данном документе термин "выделенное" антитело или антигенсвязывающий фрагмент означает антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые, по существу не содержат других антител или антигенсвязывающих фрагментов, имеющих различные антигенные специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с доменом FN3, по существу не содержит антител, которые не специфичны к доменам FN3).

Используемый в данном документе термин "домен фибронектина типа III" или "домен FN3" относится к домену, часто встречающемуся в белках, включая фибронектины, тенасцин, белки внутриклеточного цитоскелета, цитокиновые рецепторы и прокариотические ферменты (Bork and Doolittle, PNAS USA 89:8990-8994, 1992; Meinke et al., J Bacteriol 175:1910-1918, 1993; Watanabe et al., J Biol Chem 265:15659-15665, 1990), или его производному. Примеры доменов FN3 представляют собой 15 разных доменов FN3, присутствующих в тенасцине С человека, 15 различных доменов FN3, присутствующих в фибронектине (FN) человека, и синтетические домены неприродного происхождения FN3, например, в US8278419. Отдельные домены FN3 обозначают по номеру домена и названию белка, например 3-й домен FN3 тенасцина (TN3) или 10-й домен FN3 фибронектина (FN10).

"Антителом" называются все изоформы иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD и IgY), включая различные мономерные, полимерные и химерные формы, если иное не указано особо. В частности, термин "антитело" охватывает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAb) и антителопо-

добные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела.

"Антигенсвязывающие фрагменты" представляют собой любую белковую структуру, способную проявлять аффинность связывания с конкретным антигеном. Антигенсвязывающие фрагменты включают в себя фрагменты, полученные любым известным методом, например ферментативным расщеплением, пептидным синтезом и рекомбинантными методами. Некоторые антигенсвязывающие фрагменты состоят из частей интактных антител, сохраняющих антигенсвязывающую специфичность исходной молекулы антитела. Например, антигенсвязывающие фрагменты могут содержать по меньшей мере одну переменную область (переменную область тяжелой цепи или легкой цепи) или одну или более областей CDR антитела с известным связыванием с конкретным антигеном. Примеры приемлемых антигенсвязывающих фрагментов включают в себя, без ограничений, диатела и одноцепочечные молекулы, а также молекулы Fab, F(ab')₂, Fc, Fabc и Fv, одноцепочечные (Sc) антитела, отдельные легкие цепи антител, отдельные тяжелые цепи антител, химерные слияния цепей антител или CDR с другими белками, белковые каркасы, мономеры или димеры тяжелых цепей, мономеры или димеры легких цепей, димеры, состоящие из одной тяжелой и одной легкой цепи, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, или одновалентное антитело, описанное в WO2007059782, двухвалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области, Fd-фрагмент, состоящий по существу из доменов V.sub.H и C.sub.H1; Fv-фрагмент, состоящий по существу из доменов VL и VH одного плеча антитела, dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), который состоит по существу из домена VH и также называется доменным антителом (Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov.; 21(11):484-90); антитело верблюжьего типа (камельид) или нанотела (Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan.; 5(1): 111-24); выделенные области, определяющие комплементарность (CDR), и т.п. Для получения антигенсвязывающих фрагментов можно использовать все изотипы антител. Кроме того, антигенсвязывающие фрагменты могут включать в себя неантительные белковые каркасы, в которые могут успешно встраиваться полипептидные сегменты в ориентации, придающей аффинность к данному интересующему антигену, такие как белковые каркасы. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены рекомбинантным способом или в результате ферментативного или химического расщепления интактных антител. Фраза "антитело или его антигенсвязывающий фрагмент" может использоваться для обозначения того, что данный антигенсвязывающий фрагмент включает в себя один или более аминокислотных сегментов антитела, относящегося к указанной фразе.

Термины "CDR" и множественное число для "CDR" относятся к определяющей комплементарности области (CDR), при этом три такие области определяют связывающий характер переменной области легкой цепи (CDRL1, CDRL2 и CDRL3), и три определяют связывающий характер переменной области тяжелой цепи (CDRH1, CDRH2 и CDRH3). CDR вносят вклад в функциональную активность молекулы антитела и разделены аминокислотными последовательностями, которые включают скелетные или каркасные области. Точное определение границ и протяженности CDR зависит от различных систем классификации и нумерации. Поэтому CDR можно различать с помощью нумераций по IMGT, Кабату, Чотиа или любым другим определениям границ. Несмотря на различные границы, каждая из таких систем отличается определенной степенью перекрытия в той части, которая составляет так называемую "гиперпеременную область" в пределах переменных последовательностей. Таким образом, определения CDR в соответствии с такими системами могут отличаться по длине и граничным областям относительно прилегающей каркасной области. См., например, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. NIH Publication No. 91-3242 (1991); Chothia et al., "Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901 (1987); and MacCallum et al., "Antibody-Antigen Interactions: Contact Analysis and Binding Site Topography," J. Mol. Biol. 262:732 (1996)), каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

Как правило, CDR образуют петлевую структуру, которая может классифицироваться как каноническая структура. Термин "каноническая структура" относится к конформации главной цепи, которую принимают антигенсвязывающие петли (CDR). В результате сравнительных структурных исследований было обнаружено, что пять из шести антигенсвязывающих петель обладают лишь ограниченным набором доступных конформаций. Каждую каноническую структуру можно охарактеризовать с помощью торсионных углов полипептидной основной цепи. Поэтому соответствующие петли между антителами могут иметь весьма сходные трехмерные структуры, несмотря на высокий уровень изменчивости аминокислотной последовательности в большинстве участков петель (Chothia et al., "Canonical Structures For the Hypervariable Regions of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Chothia et al., "Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions," I 342:877 (1989); Martin and Thornton, "Structural Families in Loops of Homologous Proteins: Automatic Classification, Modelling and Application to Antibodies," J. Mol. Biol. 263:800 (1996)), каждая из которых полностью включена путем ссылки. Более того, существует определенная взаимосвязь между сформированной петлевой структурой и окружающими ее аминокислотными последовательностями. Конформация определенного канонического класса определяется длиной цепи и аминокислотными остатками, находящимися в ключевых положениях в петле, а также в пределах консервативного каркаса (то есть вне петель). Поэтому отнесение к конкретному каноническому классу может производиться на основании наличия таких ключевых аминокислотных остатков.

Термины "специфически связывается", или "связывается специфически", или их производные при использовании применительно к антителам и фрагментам антител представляют связывание посредством доменов, кодируемых генами или фрагментами генов иммуноглобулинов, с одним или более эпитопами интересующего белка и, предпочтительно, отсутствие связывания с другими молекулами в пробе, содержащей смешанную популяцию молекул. Как правило, антитело связывается с родственным антигеном с K_d менее около 1×10^{-8} М, по результатам измерения в анализе по методу поверхностного плазмонного резонанса или анализа связывания с клетками. В предпочтительном варианте осуществления специфичность связывания измеряют с использованием интерферометрии биослоя. Такие фразы, как "[антиген]-специфическое" антитело означают, что упомянутое антитело специфически связывается с упомянутым антигеном.

Термин "полинуклеотид", который является синонимом термину "молекула нуклеиновой кислоты", "нуклеотиды" или "нуклеиновые кислоты", относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. "Полинуклеотиды" включают, без ограничений, одно- и двухцепочечные ДНК, ДНК, являющиеся смесью одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечные РНК, РНК, являющиеся смесью одно- и двухцепочечных областей, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, более типично, двухцепочечными, или представлять собой смесь одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, термин "полинуклеотид" относится к трехцепочечным областям, содержащим РНК или ДНК, либо как РНК, так и ДНК. Термин "полинуклеотид" также включает в себя ДНК или РНК, содержащую одно или более модифицированных оснований, и ДНК или РНК с основными цепями, модифицированными для стабильности или для других целей. "Модифицированные" основания включают в себя, например, тритилированные основания и нетипичные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; следовательно, термин "полинуклеотид" включает в себя химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, обычно встречающиеся в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. Термин "полинуклеотид" также включает в себя относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

"Вектор" представляет собой репликон, такой как плаزمид, фаг, космид или вирус, в который может быть функционально вставлен другой нуклеотидный сегмент так, чтобы происходила репликация или экспрессия указанного сегмента.

Используемый в настоящем документе термин "клетка-хозяин" может относиться к любому типу клетки, например к первичной клетке, клетке в культуре или клетке из клеточной линии. В конкретных вариантах осуществления термин "клетка-хозяин" относится к клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, и к потомкам или к потенциальным потомкам такой клетки. Потомки такой клетки могут не быть идентичными родительской клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, например по причине мутаций или воздействия окружающей среды, которые могут проявляться в последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина. Термины "экспрессия" и "продукция" используются в настоящем документе как синонимы и обозначают биосинтез продукта гена. Эти термины охватывают транскрипцию гена в РНК. Эти термины также охватывают трансляцию РНК в один или более полипептидов и дополнительно охватывают все посттранскрипционные и посттрансляционные модификации природного происхождения. Экспрессия или продукция антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может происходить внутри цитоплазмы клетки или во внеклеточной среде, например в ростовой среде для культивирования клеток. Значение термина "по существу такой же" может отличаться в зависимости от контекста, в котором он используется. Вследствие того, что в природной последовательности легких и тяжелых цепей и кодирующих их генов возможны вариации, как ожидается, можно встретить определенный уровень вариаций в пределах аминокислотных последовательностей или генов, кодирующих антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, которые практически не влияют на их уникальные свойства связывания (например, специфичность и аффинность). Такое ожидание отчасти обусловлено вырожденностью генетического кода, а также эволюционной успешностью консервативных вариантов аминокислотных последовательностей, которые ощутимо не меняют природу кодируемого белка. Соответственно, в контексте нуклеотидных последовательностей "по существу такой же" означает по меньшей мере 65% идентичность между двумя или более последовательностями. Предпочтительно термин относится к по меньшей мере 70% идентичности между двумя или более последовательностями, более предпочтительно по меньшей мере 75% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 80% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 85% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 90% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 91% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 92% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 93% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 94% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 96% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 97% идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 98% идентичности и более предпочтительно по меньшей мере 99% или более идентичности. Процентная идентичность между двумя

последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т. е. % гомологии=кол-во идентичных положений/общее кол-во положений x 100), принимая во внимание количество гэпов и длину каждого гэпа, вводимого для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процентную идентичность между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями можно определить, например, с помощью алгоритма, описанного в публикации E. Meyers and W. Miller, *Comput. Zayavk. Biosci* 4, 11-17 (1988), который встроен в программу ALIGN (версия 2.0), используя весовую таблицу остатков PAM120 со штрафом за длину гэпа 12 и штрафом за гэп 4. Кроме этого, процентную идентичность двух аминокислотных последовательностей можно определить, используя алгоритм, описанный в публикации Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 444-453 (1970).

Степень вариации, возможная в пределах аминокислотной последовательности белка без существенного влияния на функцию белка, намного ниже, чем в нуклеотидной последовательности, поскольку принципы вырожденности не применимы к аминокислотным последовательностям. Соответственно, в контексте антитела или антигенсвязывающего фрагмента "по существу такой же" относится к антителу или антигенсвязывающим фрагментам, имеющим 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность описанным антителам или антигенсвязывающим фрагментам. Другие варианты осуществления включают антитела к домену FN3 или антигенсвязывающие фрагменты, которые имеют каркас, остов или другие несвязывающиеся области, которые не обладают существенной идентичностью с антителами к домену FN3 и антигенсвязывающими фрагментами, описанными в данном документе, но обязательно включают в себя одну или более CDR или других последовательностей, необходимых для осуществления связывания, которые обладают 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью с последовательностями, описанными в данном документе.

Используемый в данном документе термин "химерный антигенный рецептор" (CAR) относится к рекомбинантному полипептиду, содержащему по меньшей мере внеклеточный домен, который специфически связывается с антигеном или мишенью, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, активирующий внутриклеточный T-клеточный рецептор. Взаимодействие внеклеточного домена CAR с антигеном-мишенью на поверхности клетки-мишени приводит к кластеризации CAR и доставляет активационный стимул в CAR-содержащую клетку. CAR перенаправляют специфичность иммунных эффекторных клеток и запускают пролиферацию, продукцию цитокинов, фагоцитоз и/или продукцию молекул, которые могут опосредовать гибель клеток целевой антигенэкспрессирующей клетки в зависимости независимо от главного комплекса гистосовместимости (ГКГС).

Используемый в данном документе термин "внеклеточный антигенсвязывающий домен", "внеклеточный домен" или "внеклеточный лигандсвязывающий домен" относится к части CAR, которая расположена вне клеточной мембраны и способна связываться с антигеном, мишенью или лигандом.

Используемый в данном документе термин "шарнирная область" относится к части CAR, которая соединяет два смежных домена белка CAR, например, внеклеточный домен и трансмембранный домен.

Используемый в данном документе термин "трансмембранный домен" относится к части CAR, которая проходит через клеточную мембрану и прикрепляет CAR к клеточной мембране.

Используемый в данном документе термин "внутриклеточный сигнальный домен, активирующий T-клеточный рецептор", "цитоплазматический сигнальный домен" или "внутриклеточный сигнальный домен" относится к части CAR, которая расположена внутри клеточной мембраны и способна к трансдукции эффекторного сигнала.

Используемый в данном документе термин "стимулирующая молекула" относится к молекуле, экспрессируемой T-клеткой, которая обеспечивает первичную(ые) цитоплазматическую(ие) сигнальную(ые) последовательность(и), которая регулирует первичную активацию комплекса T-клеточного рецептора (TCR) стимулирующим путем для по меньшей мере какого-нибудь аспекта сигнального пути T-клетки. Стимулирующие молекулы включают два различных класса цитоплазматической сигнальной последовательности: те, которые инициируют антигензависимую первичную активацию (называемые "первичными сигнальными доменами"), и те, которые действуют антигеннезависимым образом, чтобы обеспечить вторичный костимулирующий сигнал (называемые "костимулирующими сигнальными доменами").

Используемый в данном документе термин "экспрессия" относится к биосинтезу генного продукта. Данный термин охватывает транскрипцию гена в РНК. Данный термин также охватывает трансляцию РНК в один или более полипептидов и, кроме того, охватывает все встречающиеся в природе посттранскрипционные и посттрансляционные модификации. Экспрессированный домен FN3 или CAR может находиться в цитоплазме клетки-хозяина, во внеклеточной среде, такой как питательная среда для клеточной культуры, или прикрепляться к клеточной мембране.

Используемый в данном документе термин "иммунная клетка" или "иммунная эффекторная клетка" относится к клетке, которая участвует в иммунном ответе, например, в стимуляции иммунного эффекторного ответа. Примеры иммунных клеток включают T-клетки, В-клетки, натуральные киллеры (NK), тучные клетки и фагоциты миелоидного происхождения. Согласно конкретным вариантам осуществления сконструированные иммунные клетки представляют собой T-клетки и называются CAR-T-клетками, поскольку они сконструированы для экспрессии CAR согласно изобретению.

Используемый в данном документе термин "сконструированная иммунная клетка" относится к им-

мунной клетке, также называемой иммунной эффекторной клеткой, которая была генетически модифицирована путем добавления дополнительного генетического материала в форме ДНК или РНК к общему генетическому материалу клетки. Согласно вариантам осуществления данного изобретения сконструированные иммунные клетки были генетически модифицированы для экспрессии CAR, нацеленного на домен FN3, в соответствии с изобретением.

В контексте настоящего документа термин "носитель" относится к любому эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферному раствору, стабилизатору, солнобилизатору, маслу, липиду, везикуле, содержащей липид, микросфере, липосомальной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники, для применения в фармацевтических составах. Следует понимать, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от способа введения для конкретного применения. Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксичному материалу, который не оказывает негативное влияние на эффективность композиции в соответствии с настоящим изобретением или биологической активности композиции в соответствии с настоящим изобретением.

Используемый в данном документе термин "субъект" относится к животному, предпочтительно к млекопитающему. В соответствии с конкретными вариантами осуществления субъект представляет собой млекопитающее, включая млекопитающих, отличных от приматов (например, верблюда, осла, зебру, корову, свинью, лошадь, козу, овцу, кошку, собаку, крысу, кролика, морскую свинку или мышь) или приматов (например, обезьяну, шимпанзе или человека). В конкретных вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

Используемый в данном документе термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству активного ингредиента или компонента, которые вызывают желаемый биологический или медицинский ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели.

Используемые в данном документе термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к облегчению или возврату в исходное состояние по меньшей мере одного измеряемого физического параметра, связанного с раком или аутоиммунностью, который не обязательно очевиден у пациента, но может быть явным у пациента. Термины "лечить", "лечащий" и "лечение" могут также относиться к провоцированию регрессии, профилактике прогрессирования или по меньшей мере замедлению прогрессирования заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к облегчению, профилактике развития или появления или уменьшения продолжительности одного или более симптомов, связанных с заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, таким как опухоль или более предпочтительно рак. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к профилактике рецидива заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к повышению выживаемости пациента, имеющего заболевание, расстройство или состояние. В конкретном варианте осуществления термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к устранению заболевания, расстройства или состояния у пациента.

Библиотеки доменов FN3

Tencon представляет собой домен FN3 неприродного происхождения, разработанный на основе консенсусной последовательности из пятнадцати доменов FN3 тенасцина-С человека (Jacobs et al., Protein Engineering, Design, and Selection, 25:107-117, 2012; US2010/0216708). Кристаллическая структура Tencon демонстрирует шесть открытых на поверхности петель, соединяющих семь бета-тяжей, характерных для доменов FN3, причем бета-тяжи обозначены как A, B, C, D, E, F и G, а петли обозначены как AB, BC, CD, DE, EF и FG (Bork and Doolittle, PNAS USA 89:8990-8992, 1992; US6673901). Данные петли или выбранные остатки в пределах каждой петли можно подвергать рандомизации с созданием библиотеки доменов FN3, которые можно использовать для выбора новых молекул, которые связывают конкретный антиген. Следовательно, как описано в данном документе, "нерандомизированная" область домена FN3 относится к области в домене FN3, которая является консервативной для всех доменов FN3. В таблице 2 показаны положения и последовательности каждой петли и бета-тяжа в Tencon (SEQ ID NO: 33).

Таблица 2

Домен FN3	Tencon (SEQ ID NO: 33)
Тяж А	1-12
Петля АВ	13-16
Тяж В	17-21
Петля ВС	22-28
Тяж С	29-37
Петля CD	38-43
Тяж D	44-50
Петля DE	51-54
Тяж E	55-59
Петля EF	60-64
Тяж F	65-74
Петля FG	75-81
Тяж G	82-89

Таким образом, библиотеки, созданные на основе последовательности Tencon, могут иметь рандомизированную последовательность в одной или более петлях или тяжах. Например, библиотеки на основе Tencon могут иметь рандомизированную последовательность в одной или более из петли АВ, петли ВС, петли CD, DE, петли EF и петли FG. Например, петля ВС Tencon имеет длину 7 аминокислот, таким образом в библиотеке на основе последовательности Tencon с диверсификацией по петле ВС можно рандомизировать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот. Петля CD Tencon имеет длину 6 аминокислот, таким образом в библиотеке на основе последовательности Tencon с диверсификацией по петле CD можно рандомизировать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот. Петля EF Tencon имеет длину 5 аминокислот, таким образом, в библиотеке на основе последовательности Tencon с диверсификацией по петле EF можно рандомизировать 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот. Петля FG Tencon имеет длину 7 аминокислот, таким образом, в библиотеке на основе последовательности Tencon с диверсификацией по петле FG можно рандомизировать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислот. Дополнительного разнообразия петель в библиотеках Tencon можно достичь путем вставки и/или удаления остатков в петлях. Например, петли ВС, CD, EF и/или FG можно удлинить на 1-22 аминокислоты или уменьшить на 1-3 аминокислоты. Петля FG Tencon имеет длину 7 аминокислот, тогда как соответствующая петля в тяжелых цепях антител находится в диапазоне от 4 до 28 остатков. Для обеспечения максимального разнообразия петлю FG можно диверсифицировать в последовательности, а также по длине для соответствия диапазону длины CDR3 антитела в 4-28 остатков. Например, петлю FG можно дополнительно диверсифицировать по длине, удлив петлю на дополнительные 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот.

Библиотеки, разработанные на основе последовательности Tencon, также могут иметь альтернативные рандомизированные поверхности, образованные сбоку от домена FN3 и содержащие два или более бета-тяжа и по меньшей мере одну петлю. Одна такая альтернативная поверхность образована аминокислотами в бета-тяжах С и F и в петлях CD и FG (поверхность C-CD-F-FG). Конфигурация библиотеки, основанной на альтернативной поверхности C-CD-F-FG Tencon, описана в US2013/0226834. Библиотеки, разработанные на основе последовательности Tencon, также включают библиотеки, разработанные на основе вариантов Tencon, таких как варианты Tencon, имеющие замены в положениях остатков 11, 17, 46 и/или 86 (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 33), и такие варианты демонстрируют повышенную термостабильность. Иллюстративные варианты Tencon описаны в US 2011/0274623 и включают Tencon27 (SEQ ID NO: 34), имеющий замены E11R, L17A, N46V и E86I по сравнению с Tencon с SEQ ID NO: 33.

Библиотеки на основе Tencon и библиотеки на основе другой последовательности FN3 могут быть рандомизированы по выбранному положению остатков с использованием случайного или определенного набора аминокислот. Например, варианты в библиотеке, имеющей случайные замены, можно создать с использованием кодонов NNK, которые кодируют все 20 аминокислот, встречающихся в естественных условиях. В других схемах диверсификации можно применять кодоны DVK для кодирования аминокислот Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly и Cys. Альтернативно для получения всех 20 аминокислотных остатков при одновременном снижении частоты стоп-кодонов можно применять кодоны NNS. Библиотеки доменов FN3 со смещенным распределением аминокислот в диверсифицируемых положениях можно синтезировать, например, с использованием технологии Slonomics® (http://www_sloning_com). В данной технологии применяют библиотеку предварительно полученных двухцепочечных триплетов, которые служат в качестве универсальных строительных блоков, достаточных для процессов синтеза тысяч генов. В библиотеке триплетов представлены все возможные комбинации

ции последовательностей, необходимые для построения любой желаемой молекулы ДНК. Для обозначения кодонов используется хорошо известный код IUB.

Антитела к домену FN3 и антигенсвязывающие фрагменты

В данном документе описаны выделенные моноклональные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с нерандомизированной областью доменов FN3. Общая структура молекулы антитела содержит антигенсвязывающий домен, включающий в себя тяжелую и легкую цепи, и Fc-домен, который выполняет различные функции, включая фиксацию комплемента и связывание с рецепторами антител.

Описанные специфические к домену FN3 антитела или антигенсвязывающие фрагменты включают все изотипы, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и синтетические мультимеры четырехцепочечной структуры иммуноглобулина. Описанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты также включают изотип IgY, по существу обнаруживаемый в сыворотке курицы или индейки и в желтке яйца курицы или индейки.

Специфические к домену FN3 антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно получать из любого вида, используя рекомбинантные методы. Например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой их мышинные, крысиные, козы, лошадиные, свиные, коровьи, куриные, кроличьи, верблюжьи, ослиные, человеческие или химерные варианты. В целях введения человеку антитела или антигенсвязывающие фрагменты, полученных не от человека, можно подвергнуть генетическому или структурному изменению, чтобы они были менее антигенны при введении пациенту-человеку.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты являются химерными. В настоящем документе термин "химерный" означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий по меньшей мере некоторую часть по меньшей мере одного варибельного домена, полученного из аминокислотной последовательности антитела не относящегося к человеку млекопитающего, грызуна или рептилии, в то время как оставшиеся части антитела или его антигенсвязывающего фрагмента имеют человеческое происхождение.

В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой гуманизированные антитела. Гуманизированные антитела могут представлять собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (например, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие субпоследовательности антител), содержащие минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина не относящегося к человеку животного. По большей части гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из области, определяющей комплементарность (CDR), реципиента заменены остатками из области, определяющей комплементарность, не относящегося к человеку вида (антитело-донор), например мыши, крысы или кролика, обладающей желаемой специфичностью, аффинностью и способностью. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из, по меньшей мере одного, а обычно двух варибельных доменов, в которых все или по существу все CDR-области соответствуют таковым в иммуноглобулине от не относящегося к человеку животного, а все или по существу все каркасные области соответствуют таковым последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут иметь различные формы, но будут включать в себя одну или более CDR антитела, как показано в табл. 1.

В данном документе описаны выделенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с доменами FN3. В некоторых вариантах осуществления специфические к домену FN3 антитела или антигенсвязывающие фрагменты получают от кроликов. Хотя специфические к домену FN3 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примеров в данном документе, получены от кролика, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примера, можно подвергнуть химеризации.

В некоторых вариантах осуществления предложено специфическое к домену FN3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из антител, описанных в табл. 1, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого из антител, описанных в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления специфические к домену FN3 антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 4, CDR3 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, CDR1 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 9, CDR2 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 11, и CDR3 легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 13. Это специфическое к домену FN3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать не являющиеся кроличьими каркасные последовательности. Это специфическое к домену FN3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с нерандомизированными областями домена FN3, могут обнаруживать экспрессию химерных антигенных рецепторов (CAR), содержащих домены FN3, на поверхности Т-клеток, и могут активировать Т-клетку, экспрессирующую CAR, содержащие домены FN3. В некоторых вариантах осуществления специфические к домену FN3 антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат варибельную область тяжелой цепи, по существу такую же

ское к домену FN3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с нерандомизированными областями домена FN3, могут обнаруживать экспрессию химерных антигенных рецепторов (CAR), содержащих домены FN3, на поверхности Т-клеток, и могут активировать Т-клетку, экспрессирующую CAR, содержащие домены FN3. В некоторых вариантах осуществления специфические к домену FN3 антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат варибельную область тяжелой цепи, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 78, и варибельную область легкую цепь, по существу такую же или идентичную SEQ ID NO: 79. Описанные антитела к домену FN3 или антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для получения CAR, содержащих описанные антигенсвязывающие фрагменты.

Также описываются выделенные полинуклеотиды, кодирующие антитела или антигенсвязывающие фрагменты, специфически связывающиеся с доменом FN3. Выделенные полинуклеотиды, способные кодировать сегменты варибельных доменов, предлагаемые в настоящем документе, можно включать в одни и те же или разные векторы для продукции антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Полинуклеотиды, кодирующие рекомбинантные антигенсвязывающие белки, также входят в объем описания. В некоторых вариантах осуществления описанные полинуклеотиды (и пептиды, которые они кодируют) включают в себя лидерную последовательность. Можно использовать любую лидерную последовательность, известную в данной области. Лидерная последовательность может включать в себя, без ограничений, сайт рестрикции или сайт инициации трансляции.

Специфические к домену FN3 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, включают варианты, имеющие одиночные или множественные аминокислотные замены, делеции или присоединения, сохраняющие биологические свойства (например, аффинность связывания или иммунную эффекторную активность) описанных специфических к домену FN3 антител или антигенсвязывающих фрагментов. Такие варианты могут включать в себя: (a) варианты, в которых один или более аминокислотных остатков заменяются консервативными или неконсервативными аминокислотами, (b) варианты, в которых одна или более аминокислот присоединяются к полипептиду или удаляются из него, (c) варианты, в которых одна или более аминокислот включают в себя группу-заместитель, и (d) варианты, в которых полипептид сливают с другим пептидом или полипептидом, таким как партнер слияния, белковая метка или другая химическая функциональная группа, способная придавать полипептиду полезные свойства, например, эпитоп для антитела, полигистидиновая последовательность, остаток биотина и т.п. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут включать в себя варианты, в которых аминокислотные остатки одного вида заменены соответствующими остатками другого вида (в консервативных или неконсервативных положениях). В других вариантах осуществления аминокислотные остатки в неконсервативных положениях замещены консервативными или неконсервативными остатками. Методики получения таких вариантов, включая генетические (делеции, мутации и т.п.), химические и ферментативные, известны специалистам в данной области.

Специфические к домену FN3 антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, могут относиться к нескольким изотипам антител, таким как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В некоторых вариантах осуществления изотипом антитела является IgG. Специфичность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по большей части определяется аминокислотной последовательностью и расположением CDR. Следовательно, CDR одного изотипа можно переносить на другой изотип без изменения антигенной специфичности. В альтернативном варианте осуществления были установлены методики, вызывающие переключение гибридом с выработки одного изотипа антител на другой (переключение изотипа) без изменения антигенной специфичности. Соответственно такие изотипы антител входят в объем описанных антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Аффинность описанных специфических к домену FN3 антител или антигенсвязывающих фрагментов может быть определена множеством способов, известных в данной области техники, таких как метод поверхностного плазмонного резонанса или способы, основанные на твердофазном ИФА. Анализы по измерению аффинности методом ППП включают анализы, выполненные с использованием прибора ВΙΑсоре 3000, причем анализ проводят при комнатной температуре (например, при температуре, составляющей или близкой к 25°C), при этом антитела, способные связываться с доменами FN3, захватывают на сенсорном чипе ВΙΑсоре при помощи антитела к Fc (например, козьего антитела, специфического к человеческому IgG Fc, производства Jackson ImmunoResearch laboratories, продукт № 109-005-098) в количестве около 75 ОЕ с последующим сбором данных об ассоциации и диссоциации при скорости потока 40 мкл/мин.

Способы обнаружения доменов FN3

В данном документе предложены способы обнаружения доменов FN3 в биологическом образце путем приведения образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанным в данном документе. Как описано в настоящем документе, пробу можно получать из мочи, крови, сыворотки, плазмы, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток, циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т. е. свободных клеток), тканей (например, хирургически иссеченной ткани опухоли, материалов биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т.п. В некоторых вариантах осуществления описанные спо-

собы включают в обнаружение доменов FN3 в биологическом образце путем приведения образца в контакт с любым из специфических к домену FN3 антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления образец можно привести в контакт с более чем одним из специфических к домену FN3 антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе. Например, образец можно привести в контакт с первым специфическим к домену FN3 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, а затем привести в контакт со вторым специфическим к домену FN3 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, причем первое антитело или антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или антигенсвязывающий фрагмент не являются одним и тем же антителом или антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления перед приведением в контакт с пробой первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть прикреплено к поверхности, например поверхности многолуночного планшета, чипа, либо к сходному субстрату. В других вариантах осуществления перед приведением в контакт с пробой первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть ни к чему не прикреплены или не зафиксированы.

Описанные специфические к домену FN3 антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут быть помечены с возможностью обнаружения. В некоторых вариантах осуществления меченые антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут облегчать обнаружение доменов FN3 посредством способов, описанных в данном документе. Специалисту в данной области хорошо известны многие подобные метки. Например, приемлемые метки включают в себя, без ограничений, радиоактивные метки, флуоресцентные метки, эпитопные метки, биотин, хромофорные метки, ECL-метки или ферменты. Более конкретно, описанные метки включают в себя рутений, ¹¹¹In-DOTA, In- диэтилентриаминпентауксусную кислоту (DTPA), пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и бета-галактозидазу, полигистидин (HIS-метку), акридиновые красители, цианиновые красители, флуороновые красители, оксазиновые красители, фенантридиновые красители, родаминовые красители, красители Alexa Fluor® и т.п.

Описанные специфические к домену FN3 антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно использовать в разных анализах для обнаружения доменов FN3 в биологическом образце. Некоторые приемлемые анализы включают без ограничений вестерн-блот, радиоиммунологический анализ, метод поверхностного плазмонного резонанса, иммунофлуориметрию, иммунопреципитацию, равновесный диализ, иммунодиффузию, электрохемилюминесцентный (ECL) иммунологический анализ, иммуногистохимию, цитометрию посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) или твердофазный ИФА.

Наборы для обнаружения доменов FN3

В данном документе предлагаются наборы для обнаружения доменов FN3 в биологическом образце. Эти наборы включают одно или более специфических к домену FN3 антител, описанных в данном документе, или их антигенсвязывающих фрагментов и инструкции по применению набора.

Предлагаемое специфическое к домену FN3 антитело или антигенсвязывающий фрагмент может находиться в растворе; быть лиофилизированными; прикрепленными к субстрату, носителю или планшету; или могут быть мечеными с возможностью обнаружения.

Описанные наборы также могут включать в себя дополнительные компоненты, используемые для осуществления способов, описанных в настоящем документе. В качестве примера наборы могут содержать средства для получения пробы от субъекта, контрольной или эталонной пробы, например пробы от субъекта с медленно прогрессирующим раком и/или субъекта без рака, одно или более отделений для проб и/или материалы инструкций, в которых описано осуществление способов изобретения, и тканеспецифические контроли или стандарты.

Средства для определения уровня доменов FN3 могут дополнительно включать, например, буферы и другие реагенты, предназначенные для применения в анализе для определения уровня доменов FN3. Инструкции могут представлять собой, например, печатные инструкции по выполнению анализа и/или инструкции по оценке уровня экспрессии доменов FN3.

Описанные наборы также могут включать в себя средства для выделения пробы от субъекта. Эти средства могут содержать один или более элементов оборудования или реагентов, которые можно использовать для получения текучей среды или ткани от субъекта. Средства для получения пробы от субъекта также могут представлять собой средства для выделения компонентов крови, таких как сыворотка, из пробы крови. Предпочтительно набор предназначен для применения у человеческого индивида.

Нацеленные на домен FN3 химерные антигенные рецепторы (CAR)

В других общих аспектах изобретение относится к нацеленному на домен FN3 CAR, содержащему scFv, специфический для домена FN3.

В одном аспекте изобретение относится к CAR, содержащему

- a) внеклеточный домен, имеющий scFv, который специфически связывается с нерандомизированной областью домена FN3;
- b) трансмембранный домен; и
- c) внутриклеточный сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления в образующемся CAR внеклеточному домену предшествует

сигнальный пептид на N-конце. В данном изобретении можно использовать любой приемлемый сигнальный пептид. Сигнальный пептид может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения внеклеточный домен CAR содержит scFv, который специфически связывается с нерандомизированной областью домена FN3. Во внеклеточном домене CAR может быть использован любой scFv, который специфически связывается с доменом FN3 в соответствии с вариантами осуществления изобретения, включая, но не ограничиваясь описанными в данном документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения CAR может дополнительно содержать шарнирную область, соединяющую внеклеточный домен и трансмембранный домен. Шарнирная область выполняет функцию перемещения внеклеточного домена от поверхности сконструированной иммунной клетки, чтобы обеспечить надлежащий контакт клетка/клетка, связывание с мишенью или антигеном и активацию (Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). В CAR согласно изобретению может быть использована любая подходящая шарнирная область. Она может быть получена из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления шарнирная область CAR представляет собой пептид 6x GS (SEQ ID NO: 84), или его фрагмент, или шарнирную область из белка CD8, или его производное. В конкретных вариантах осуществления шарнирная область имеет аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 24, предпочтительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24.

В CAR согласно изобретению может быть использован любой подходящий трансмембранный домен. Трансмембранный пептид может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен из таких молекул, как CD8, CD28, CD4, CD2, GMCSFR и тому подобное. В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен имеет аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 25, предпочтительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25.

В CAR согласно изобретению может быть использован любой внутриклеточный сигнальный домен. В конкретных вариантах осуществления используется весь внутриклеточный сигнальный домен. В других конкретных вариантах осуществления используется усеченная часть сигнального домена, который трансдуцирует эффекторный сигнал. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который стимулирует иммунную эффекторную функцию клетки, содержащей CAR, например, CAR-T клетки, включая, без ограничений, пролиферацию, активацию и/или дифференцировку. В конкретных вариантах осуществления сигнал стимулирует, например, цитолитическую активность, активность хелперов и/или секрецию цитокинов CAR-T клеткой. В других вариантах осуществления в CAR согласно изобретению не используется внутриклеточный сигнальный домен, и CAR, содержащий scFv, который специфически связывается с доменом FN3 согласно изобретению, используется вместе с доменом FN3 для нацеливания эффекторной клетки на клетки-мишени.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит функциональный сигнальный домен, полученный из CD3-дзета, TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD16, CD22, CD27, CD28, CD30, CD79a, CD79b, CD134 (также известного как TNFRSF4 или OX-40), 4-1BB (CD137), CD278 (также известного как ICOS), FcсRI, DAP10, DAP12, доменов ITAM или CD66d и тому подобного.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный сигнальный домен и один или более костимулирующих сигнальных доменов.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен, имеющий функциональный сигнальный домен, полученный из человеческого CD3-дзета. В конкретных вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен имеет аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 27, предпочтительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 27.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления внутриклеточный сигнальный домен дополнительно содержит костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен, полученный из человеческого 4-1BB. В конкретных вариантах осуществления костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен имеет аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 26, предпочтительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26.

В одном варианте осуществления CAR согласно изобретению связан с клеткой-хозяином, экспрессирующей CAR.

В другом варианте осуществления CAR согласно изобретению присутствует в выделенной клеточной мембране клетки-хозяина, экспрессирующей CAR.

В еще одном варианте осуществления CAR согласно изобретению очищают или выделяют из других компонентов клетки-хозяина, экспрессирующей CAR.

Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева

В других общих аспектах изобретение относится к выделенным полинуклеотидам и векторам, кодирующим антитела к домену FN3 или CAR согласно изобретению, и к рекомбинантным клеткам, содержащим векторы.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из различных белков или полипептидов, раскрытых в данном документе, могут быть синтезированы химически или с использованием других способов в данной области техники относящихся к данному описанию. Предпочтение кодонов может быть выбрано так, чтобы улучшить экспрессию в клетке. Такое предпочтение кодонов будет зависеть от выбранного типа клетки. Специализированные паттерны предпочтения кодонов были разработаны для *E. coli* и других бактерий, а также клеток млекопитающих, растительных клеток, клеток дрожжей и клеток насекомых. См., например: Mayfield et al., PNAS USA. 2003 100(2):438-42; Sinclair et al. Protein Expr Purif. 2002 (1):96-105; Cornell, Curr Opin Biotechnol. 2001 (5):446-9; Makrides et al. Microbiol Rev. 1996 60(3):512-38; and Sharp et al. Yeast. 1991 7(7):657-78.

Общие методики манипуляции с нуклеиновыми кислотами находятся в компетенции специалиста в данной области техники и описаны, например, в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 ed., 1989, или Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, и периодические обновления, включенные в данный документ посредством ссылки. ДНК, кодирующая белок, функционально связана с подходящими транскрипционными или трансляционными регуляторными элементами, полученными из генов млекопитающих, вирусов или насекомых. Такие регуляторные элементы включают промотор транскрипции, необязательную последовательность оператора для контроля транскрипции, последовательность, кодирующую подходящие мРНК-сайты связывания рибосомы, и последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции. Точка начала репликации, как правило, обеспечивающая способность к репликации в хозяине, и селекционный ген, облегчающий распознавание трансформантов, включены дополнительно. Подходящие регуляторные элементы хорошо известны в данной области техники.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что кодирующая последовательность белка может быть изменена без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалистам в данной области техники будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие антитела к домену FN3 или CAR согласно изобретению, можно изменять без изменения аминокислотных последовательностей белков.

В одном варианте осуществления изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к домену FN3 или CAR согласно изобретению. Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области техники с учетом данного раскрытия, такой как плаزمид, космида, фаговый вектор или вирусный вектор. В одном варианте осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую домен FN3 или CAR согласно изобретению, функционально связанную с последовательностью промотора, необязательно одной или более другими регуляторными последовательностями.

В другом варианте осуществления изобретение относится к транзientной экспрессии CAR согласно изобретению с помощью мРНК, кодирующей CAR. В одном аспекте мРНК, кодирующая CAR, вводится в иммунную эффекторную клетку как форма временной трансфекции, причем экспрессия неинтегрированного трансгена происходит в течение периода времени, выраженного в часах, днях или неделях, при этом период времени экспрессии меньше, чем период времени для экспрессии гена, интегрированного в геном или содержащегося в стабильном репликоне плазмиды в клетке-хозяине. В одном аспекте мРНК получают путем транскрипции *in vitro* с использованием сгенерированной ПЦР матрицы.

В другом общем аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к домену FN3 или CAR согласно изобретению. Клетка-хозяин может быть стабильно или транзientно трансфицирована молекулой нуклеиновой кислоты согласно изобретению.

Подходящие клетки-хозяева включают прокариоты, дрожжи, клетки млекопитающих или бактериальные клетки. Подходящие бактерии включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например, *E. coli* или *Bacillus spp.* Дрожжи, предпочтительно из видов *Saccharomyces*, таких как *S. cerevisiae*, также могут быть использованы для получения полипептидов. Для экспрессии рекомбинантных белков также можно использовать различные системы культивирования клеток млекопитающих или насекомых. Бакуловиральные системы для получения гетерологичных белков в клетках насекомых рассматриваются в Luckow and Summers, (Bio/Technology, 6:47, 1988). В некоторых случаях желательно продуцировать белки в клетках позвоночных, например, для гликозилирования, и размножение клеток позвоночных в культуре (культуре ткани) стало обычной процедурой. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают эндотелиальные клетки, клетки почки обезьяны COS-7, CV-1, клетки L, C127, 3T3, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки почки эмбриона человека, клетки HeLa, линии клеток 293, 293T и ВНК.

Клетка-хозяин согласно изобретению может представлять собой сконструированную иммунную клетку, нацеленную на домен FN3, которая подробно описана ниже.

Получение белка

В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения антитела к домену FN3 согласно изобретению, включающему культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело к домену FN3, в условиях получения антитела к домену FN3 согласно изобретению, и выделение антитела к домену FN3 из клетки или культуры клеток (например, из супернатанта). Экспрессированные антитела к домену FN3 можно собирать из клеток или культуры клеток и очищать в соответствии с общепринятыми методиками, известными в данной области техники с учетом настоящего описания.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения CAR согласно изобретению, включающему культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, в условиях получения CAR согласно изобретению, и выделение CAR. Экспрессированные CAR можно собирать из клеток и очищать в соответствии с общепринятыми методиками, известными в данной области техники и описанными в данном документе.

Клетки-хозяева трансформируют векторами экспрессии или клонирования для продукции белка и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных соответствующим образом, например, для индукции промоторов, выбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

Клетки-хозяева, используемые для продукции белков согласно данному изобретению, можно культивировать в различных средах. Для культивирования клеток-хозяев подходят коммерчески доступные среды, такие как F10 Хэма (Sigma), минимальная питательная среда ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и среда Игла в модификации Дульбекко ((DMEM), Sigma). В дополнение к этому, любую из сред, описанных в Ham et al, Meth. Enz. 58:44 (1979); Barnes et al, Anal. Biochem. 102:255 (1980); US 4767704; US 4657866; US 4927762; US 4560655; US 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195 или US RE30985, можно использовать в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любая из этих сред может при необходимости дополняться гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния и фосфатом), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как препарат GENTAMYCIN™), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие необходимые добавки также могут быть включены в подходящих концентрациях, которые известны специалистам в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и тому подобное, являются такими, которые ранее использовались для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и будут очевидны для специалиста в данной области техники.

Раскрываемые в данном документе белки также могут быть получены с использованием клеточных систем трансляции *in vitro*. Для таких целей нуклеиновые кислоты, кодирующие белки, должны быть модифицированы, чтобы позволить транскрипции *in vitro* продуцировать мРНК и обеспечить бесклеточную трансляцию мРНК в конкретной используемой бесклеточной системе. Иллюстративные бесклеточные эукариотические системы трансляции эукариотических клеток включают, например, бесклеточные системы трансляции на основе клеток млекопитающих или дрожжей, и иллюстративные бесклеточные прокариотические системы трансляции включают, например, бесклеточные системы трансляции на основе бактериальных клеток.

Раскрытые в данном документе белки также могут быть получены при помощи химического синтеза (например, при помощи способов, описанных в Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Модификации белка также могут быть произведены путем химического синтеза.

Раскрытые в данном документе белки могут быть очищены при помощи способов выделения/очистки для белков, как правило, известных в области химии белка. Неограничивающие примеры включают экстракцию, перекристаллизацию, высаливание (например, сульфатом аммония или сульфатом натрия), центрифугирование, диализ, ультрафильтрацию, адсорбционную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, нормально-фазовую хроматографию, обращенно-фазовую хроматографию, гель-фильтрацию, гель-проникающую хроматографию, аффинную хроматографию, электрофорез, противоточное распределение или любые их комбинации. После очистки для белков буферы могут быть заменены на различные буферы и/или сконцентрированы любым из множества способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь, фильтрацию и диализ.

Очищенные белки являются предпочтительно по меньшей мере на 85% чистыми, более предпочтительно по меньшей мере на 95% чистыми и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 98% чистыми.

Сконструированные Т-клетки с CAR, нацеленными на домен FN3, композиции и способы их применения

В другом общем аспекте изобретение относится к сконструированным иммунным клеткам, нацеленным на домен FN3, содержащим CAR, нацеленный на домен FN3, согласно изобретению, способам получения сконструированных иммунных клеток, композициям, содержащим сконструированные иммунные клетки, и способам использования сконструированных иммунных клеток, для лечения таких заболеваний, как множественная миелома.

В одном общем аспекте изобретение относится к сконструированным иммунным клеткам, содержащим CAR, нацеленным на домен FN3, согласно изобретению.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления иммунная клетка может быть сделана менее аллогенной, например, путем инактивации по меньшей мере одного гена, экспрессирующего один или более компонентов Т-клеточного рецептора (TCR), как описано в WO 2013/176915, которые можно комбинировать с инактивацией гена, кодирующего или регулирующего экспрессию белка HLA-I/бета-2-микроглобулина (B2M). Соответственно, риск реакции "трансплантат против хозяина" и отторжения трансплантата значительно снижается. Т-клетка, в которой отсутствует функциональный TCR, называемая клеткой с "нокаутом TCR" или "TCR-KO", может быть сконструирована таким образом, чтобы она не экспрессировала какой-либо функциональный TCR на своей поверхности, сконструирована таким образом, чтобы она не экспрессировала одну или более субъединиц, которые содержат функциональный TCR (например, сконструирована таким образом, что она не экспрессирует (или демонстрирует пониженную экспрессию) TCR-альфа, TCR-бета, TCR-гамма, TCR-дельта, TCR-эпсилон и/или TCR-дзета) или сконструирована так, что она продуцирует очень мало функционального TCR на ее поверхности. Альтернативно, Т-клетка может экспрессировать существенно нарушенный TCR (то есть TCR, который не будет вызывать неблагоприятную иммунную реакцию у хозяина), например, путем экспрессии мутированных или усеченных форм одной или более субъединиц TCR. Модифицированные Т-клетки, которых не экспрессируют функциональный TCR и/или B2M, могут быть получены любым подходящим способом, включая нокаут или нокдаун одной или более субъединиц TCR и/или B2M. Например, с использованием киРНК, кшРНК, коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами, (CRISPR), эффекторной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции, (TALEN), megaTAL, мегануклеазы или цинк-пальцевой эндонуклеазы (ZFN) в Т-клетке может быть обеспечен нокдаун TCR и/или B2M.

В конкретных вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка, содержащая CAR, нацеленный на домен FN3, согласно изобретению, представляет собой Т-клетку, NKT-клетку или NK-клетку, предпочтительно, Т-клетку человека или NK-клетку человека, более предпочтительно, клетку с нокаутом TCR, наиболее предпочтительно человеческую клетку с нокаутом TCR и/или клетку с нокаутом HLA-I/B2M. В других вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка, содержащая CAR, нацеленный на домен FN3, согласно изобретению, представляет собой линию сконструированных Т-клеток, такую как Т-клеточная линия TALL-104 (то есть ИЛ-2-зависимую человеческую нерестриктированную цитотоксическую Т-клеточную линию, которая экспрессирует CD8 и CD3, но не CD16).

Иммунные эффекторные клетки по изобретению могут быть аутологичными (то есть "своими", например, аутогенными) или неаутологичными и (то есть "не своими", например, аллогенными, сингенными, ксеногенными). Аутологичный относится к любому материалу, полученному от того же индивидуума, которому впоследствии он будет вводиться. Неаутологичный относится к любому материалу, полученному от другого индивидуума того же вида, что и индивид, которому впоследствии этот материал будет вводиться.

В еще одном общем аспекте изобретение относится к способам получения сконструированных иммунных клеток, нацеленных на домен FN3, содержащих CAR, нацеленные на домен FN3, согласно изобретению. Вектор, кодирующий CAR, может быть непосредственно трансдуцирован в иммунную клетку. Альтернативно, *in vitro* транскрибированная РНК или синтетическая РНК, кодирующая CAR, может быть введена в иммунную клетку.

В соответствии конкретным вариантам осуществления способ получения сконструированных иммунных клеток, нацеленных на домен FN3, включает трансфекцию или трансдукцию иммунных эффекторных клеток, выделенных от индивидуума, так что иммунные эффекторные клетки экспрессируют один или более CAR в соответствии с вариантами осуществления изобретения. Способы приготовления иммунных клеток для иммунотерапии описаны, например, в WO 2014/130635, WO 2013/176916 и WO 2013/176915, которые включены в данный документ посредством ссылки. Отдельные стадии, которые можно использовать для получения сконструированных иммунных клеток, раскрыты, например, в WO 2014/039523, WO 2014/184741, WO 2014/191128, WO 2014/184744 и WO 2014/184143, которые включены в данный документ посредством ссылки.

В конкретном варианте осуществления иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, генетически модифицируют CAR согласно изобретению (например, трансдуцируют вирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR), а затем активируют и размножают *in vitro*. В различных вариантах осуществления Т-клетки можно активировать и размножить до или после генетической модификации для экспрессии CAR, используя способы, как описано, например, в US 6352694, US 6534055, US 6905680, US 6692964, US 5858358, US 6887466, US 6905681, US 7144575, US 7067318, US 7172869, US 7232566, US 7175843, US 5883223, US 6905874, US 6797514, US 6867041, US 2006/121005, которые включены в данный документ посредством ссылки. Т-клетки можно размножить *in vitro* или *in vivo*. Как правило, Т-клетки согласно изобретению можно размножить путем приведения в контакт с поверхностью, содержащей прикрепленное к ней вещество, которое стимулирует ассоциированный с комплексом CD3/TCR сигнал, и лиганд, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности

Т-клеток. В качестве неограничивающих примеров, популяции Т-клеток можно стимулировать, как описано в данном документе, например, путем приведения в контакт с антителом к CD3, или его антигенсвязывающим фрагментом, или антителом к CD2, иммобилизованным на поверхности, или путем приведения в контакт с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в комбинации с кальциевым ионофором, путем активации самого CAR. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток используют лиганд, который связывает вспомогательную молекулу. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с антителом к CD3 и антителом к CD28 в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток. Условия, подходящие для культуры Т-клеток, включают, например, подходящие среды (например, минимальную питательную среду или среду RPMI 1640 или X-vivo 5 (Lonza)), которые могут содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, фетальную бычью или человеческую сыворотку), цитокины, такие как ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15 и/или ИЛ-21, инсулин, ИФН-гамма, ГМ-КСФ, ТФР-бета и/или любые другие добавки для роста клеток, известные специалисту в данной области техники. В других вариантах осуществления Т-клетки можно активировать и стимулировать для пролиферации с помощью питающих клеток и соответствующих антител и цитокинов с использованием способов, таких как способы, описанные в US 6040177, US 5827642 и WO 2012129514, которые включены в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, согласно изобретению может дополнительно содержать второй CAR, имеющий внеклеточный домен, который специфически связывается с той же мишенью или другой мишенью. Предпочтительно, иммунная клетка экспрессирует два CAR, которые специфически связываются с двумя разными мишенями, или иммунная клетка экспрессирует биспецифический рецептор, такой как CAR, содержащий два домена FN3, которые специфически связываются с двумя разными мишенями, то есть доменом FN3 и другой мишенью, связанной с представляющей интерес болезнью. Например, другая мишень также может быть связана с типом рака. Более предпочтительно, два CAR также имеют разные внутриклеточные сигнальные домены, например, первый CAR имеет костимулирующий сигнальный домен, но не первичный сигнальный домен, а второй CAR имеет первичный сигнальный домен, но не костимулирующий сигнальный домен, или наоборот. Путем размещения костимулирующего сигнального домена, например, домена из 4-1BB, CD28, CD27 ICOS, или OX-40 на одном CAR, и первичного сигнального домена, например, домена из CD3-дзета, на другом CAR, один может ограничивать активность CAR по отношению к клеткам, в которых экспрессируются обе мишени, например, для повышения специфичности.

В некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, согласно изобретению может дополнительно содержать ингибирующий CAR в качестве саморегулирующегося безопасного переключателя для ограничения терапии на основе Т-клеток и предотвращения токсичности вне опухоли. Например, ингибирующий CAR может содержать внеклеточный домен, который специфически связывается с мишенью, обнаруженной в нормальных клетках, но не на раковых клетках-мишенях. Ингибирующий CAR также содержит внутриклеточный домен, имеющий сигнальный домен ингибирующего рецептора, такой как внутриклеточный домен ингибирующей молекулы, включая, но не ограничиваясь этим, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, ГКГС класса I, ГКГС класса II, GAL9, аденозин, и рецептор ТФР-бета. Клетки, экспрессирующие CAR, нацеленный на домен FN3, и ингибирующий CAR, подавляются при встрече с нормальной клеткой, но активируются при столкновении с опухолевой клеткой, не экспрессирующей мишень нормальной клетки.

В некоторых других вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CAR, согласно изобретению может дополнительно содержать агент, который усиливает активность клетки, экспрессирующей CAR. Например, в клетке-хозяине агент может ингибировать активность ингибирующей молекулы, такой, как те, которые описаны в данном документе.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления сконструированные иммунные клетки, экспрессирующие CAR, дополнительно генетически сконструированы так, чтобы быть химиорезистентными. Такая химиорезистентность может позволить сконструированным иммунным клеткам выжить в присутствии лекарственных средств, одновременно селективно нацеливаясь на представляющий интерес домен FN3.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления резистентность к лекарственным средствам может быть обеспечена клеткам, экспрессирующим CAR, при помощи генетической инженерии, чтобы они экспрессировали по меньшей мере один ген лекарственной устойчивости. Ген лекарственной устойчивости согласно изобретению может кодировать устойчивость к антиметаболитам, метотрексату, винбластину, цисплатину, алкилирующим агентам, антрациклинам, цитотоксическим антибиотикам, антииммунофилинам, их аналогам или производным и т.д. Было выявлено несколько генов лекарственной устойчивости, которые могут быть использованы для придания лекарственной устойчивости сконструированным иммунным клеткам, экспрессирующим CAR, согласно изобретению. См., например, Takebe et al., *Mol Ther.* 2001 Jan;3(1):88-96.; Sugimoto et al., *J Gene Med.* 2003 May;5(5):366-76; Zielske et al., *J Clin Invest.* 2003 Nov;112(10):1561-70; Nivens et al., *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004 Feb;53(2): 107-15;

Bardenheuer et al., *Leukemia*. 2005 Dec;19(12):2281-8; Kushman et al., *Carcinogenesis*. 2007 Jan;28(1):207-14. Примеры генов лекарственной устойчивости, которые могут быть экспрессированы в клетках, включают мутантную или модифицированную форму дигидрофолатредуктазы (DHFR), мутантную или модифицированную форму ионизин-5'-монофосфатдегидрогеназы II (IMPDH2), белок множественной лекарственной устойчивости -1 (MDR1) кальциневрин, метилгуанинтрансферазу (MGMT), микроРНК-21, гены устойчивости к антибиотикам *ble* и *mcgA* и т.д. В соответствии с конкретными вариантами осуществления указанные гены лекарственной устойчивости могут экспрессироваться в клетке любым подходящим способом, включая, например, введение трансгена, кодируемого по меньшей мере одним вектором, в клетку.

Устойчивость к противораковой химиотерапии также может быть достигнута, например, путем инактивации генов, которые отвечают за чувствительность клеток к лекарственному средству. Примеры генов, которые можно инактивировать для придания клеткам лекарственной устойчивости, включают, например, CD52, глюкокортикоидные рецепторы, CD3, человеческую гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу (HPRT), дезоксицитидинкиназу человека (dCK) и т.д. Гены, ответственные за чувствительность клетки к противораковым лекарственным средствам могут быть инактивированы любым подходящим способом, включая нокаут или нокаун гена, например, с использованием киРНК, кшРНК, CRISPR, TALEN или ZFN.

В еще одном общем аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей сконструированную иммунную клетку, нацеленную на домен FN3, согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В свете данного описания в данном изобретении можно использовать любой фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для применения в фармацевтической композиции на основе CAR-T.

В еще одном общем аспекте изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции согласно изобретению.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции стимулирует иммунный ответ у субъекта, нуждающегося в этом, предпочтительно приводит к лечению заболевания, расстройства или патологического состояния; предотвращению или замедлению прогрессирования заболевания, расстройства или состояния; или уменьшения или полного облегчения симптомов, связанных с иммунным заболеванием, расстройством или состоянием.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления заболевание, расстройство или патологическое состояние, подлежащее лечению, представляет собой гиперпролиферативное заболевание. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления заболевание, расстройство или патологическое состояние, подлежащее лечению, представляет собой рак, или опухоль, или злокачественное гиперпролиферативное заболевание, предпочтительно рак, выбранный из группы, состоящей из солидной опухоли, гемобластоза, рака мочевого пузыря, рака желчных путей, рака мозга, рака молочной железы, рака толстой кишки, рака пищевода, рака желудка, глиомы, рака головы, лейкоза, рака печени, рака легкого, лимфомы, множественной миеломы, рака шеи, рака яичников, меланомы, рака поджелудочной железы, рака почки, рака слюнных желез, рака желудка, эпителиального рака вилочковой железы и рака щитовидной железы.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления терапевтически эффективное количество композиции иммунных клеток, нацеленных на домен FN3, является достаточным для достижения одного, двух, трех, четырех или более следующих эффектов у субъекта, нуждающегося в этом: (i) снижение или облегчение серьезности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ii) сокращение продолжительности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iii) профилактика прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iv) провоцирование регрессии заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (v) профилактика развития или появления заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vi) профилактика повторения заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vii) уменьшение вероятности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (viii) снижение продолжительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (ix) повышение выживаемости субъекта с заболеванием, расстройством или состоянием, подлежащим лечению, или связанным с ним симптомом; (x) торможение или подавление заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического(их) или терапевтического(их) эффекта(ов) другой терапии. В конкретных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество относится к количеству препарата, которое является достаточным для обеспечения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) уменьшения объема опухоли; (ii) уменьшения количества опухолевых клеток; (iii) уменьшения количества метастазов; (iv) увеличения ожидаемой продолжительности жизни; (v) снижения

пролиферации опухолевых клеток; (vi) снижения выживаемости опухолевых клеток; (vii) облегчения физиологических симптомов, связанных с раковым заболеванием; и/или (viii) предотвращения возникновения опухоли.

Терапевтически эффективное количество или дозировка может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, средства введения, участка-мишени, физиологического состояния субъекта (включая, например, возраст, массу тела, здоровье), является ли субъект человеком или животным, других введенных лекарственных средств и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозировки лечения подбирали оптимальным образом для оптимизации безопасности и эффективности. Точная доза может быть установлена специалистом в данной области техники с использованием известных методик. Как правило, иммунные клетки, нацеленные на домен FN3, вводят в дозе от около 10 до 10 клеток/кг массы тела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления общую дозу клеток можно вводить субъекту посредством фракционирования дозы, например, одного, двух, трех или более отдельных введений частичной дозы.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления композиции, описанные в данном документе, составлены так, чтобы они подходили для предполагаемого пути введения субъекту. Например, композиции, описанные в данном документе, могут быть составлены так, чтобы быть приемлемыми для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления композицию, применяемую при лечении рака, можно применять в комбинации с другим лечением, включая, без ограничений, химиотерапию, истощающую лимфоциты терапию, лучевую терапию, другое иммуноонкологическое лекарственное средство, таргетную терапию, противораковую вакцину или другие противораковые лекарственные средства.

Используемый в настоящем документе термин "в комбинации" в контексте введения субъекту двух или более лекарственных средств относится к применению более одной терапии. Использование термина "в комбинации" не ограничивает порядок введения лекарственных средств субъекту. Например, первое терапевтическое средство (например, описанную в настоящем документе композицию) можно вводить перед (например, за 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 16 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), после (например, через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 16 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения второго терапевтического средства пациенту или одновременно с таким введением.

В еще одном общем аспекте изобретение относится к способу перенаправления иммунных клеток для уничтожения ими клеток, связывающих домен FN3, у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту фармацевтической композиции согласно изобретению.

В еще одном общем аспекте изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей иммунные клетки, нацеленные на домен FN3, согласно изобретению, включающему объединение иммунных клеток, нацеленных на домен FN3, с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

В настоящем изобретении также предложены следующие не имеющие ограничительного характера варианты осуществления.

Варианты осуществления

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с нерандомизированной областью домена фибронектина типа III (FN3).

2. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, содержащие

a) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

b) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

c) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

d) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, CDR3 тяжелой цепи, имеющую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50;

е) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:42, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50;

ф) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50;

г) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:51, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60;

h) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:52, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; или

i) CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:53, CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, причем

а) вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и вариабельная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15;

б) вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74, и вариабельная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75; или

с) вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78, и вариабельная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, причем

а) тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

б) тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21;

с) тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; или

д) тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, и легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65.

5. Антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-4, который представляет собой Fab-фрагмент, Fab2-фрагмент или одноцепочечное антитело.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-5, которые представляют собой IgG.

7. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-6.

8. Вектор, содержащий полинуклеотид по варианту осуществления 7.

9. Клетка-хозяин, содержащая выделенный полинуклеотид по варианту осуществления 7.

10. Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 8.

11. Выделенный полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:

(а) внеклеточный домен, содержащий scFv, который специфически связывается с нерандомизированной областью домена FN3;

(б) трансмембранный домен; и

(с) внутриклеточный сигнальный домен,

причем CAR необязательно дополнительно содержит шарнирную область, соединяющую внеклеточный домен и трансмембранный домен.

12. Выделенный полинуклеотид по варианту осуществления 11, в котором CAR содержит

(a) внеклеточный домен, содержащий scFv, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична одной из SEQ ID NO: 68-73;

(b) шарнирную область, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 24;

(c) трансмембранный домен, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 25; и

(d) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий костимулирующий домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 26, и первичный сигнальный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 27.

13. Выделенный полинуклеотид по варианту осуществления 12, в котором

(a) внеклеточный домен содержит аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO:68-73;

(b) шарнирная область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;

(c) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25; и

(d) внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

14. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 11-13.

15. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 11-13.

16. Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 14.

17. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий

(a) внеклеточный домен, содержащий scFv, который специфически связывается с нерандомизированной областью домена FN3;

(b) трансмембранный домен; и

(c) внутриклеточный сигнальный домен,

причем CAR необязательно дополнительно содержит шарнирную область, соединяющую внеклеточный домен и трансмембранный домен.

18. CAR по варианту осуществления 16, содержащий

(a) внеклеточный домен, содержащий scFv, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична одной из SEQ ID NO: 68-73;

(b) шарнирную область, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 24;

(c) трансмембранный домен, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 25; и

(d) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий костимулирующий домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 26, и первичный сигнальный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 27. 19. CAR по варианту осуществления 17, в котором

(a) внеклеточный домен содержит аминокислотную последовательность одной из SEQ ID NO:68-73;

(b) шарнирная область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;

(c) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25; и

(d) внутриклеточный сигнальный домен содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27.

Примеры

Представленные ниже примеры приводятся в качестве дополнения к приведенному выше описанию и в целях лучшего понимания объекта изобретения, описанного в настоящем документе. Эти примеры не следует считать ограничивающими описанный объект изобретения. Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем документе, предназначены только для иллюстративных целей, и в свете этого специалистам в данной области будут очевидны различные модификации и изменения, которые следует включать в объем изобретения и которые можно вносить без выхода за рамки объема изобретения.

Пример 1. Иммунизация кроликов для генерации антител против домена FN3.

Генерацию кроличьих моноклональных антител выполняли с использованием антигена Tencon25 (SEQ ID NO: 28).

LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVGAEIVLTVPGSERS

YDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAIFTT

Животные: 3-месячные новозеландские белые кролики с идентификаторами E4831 и E4832 и иммунизацией.

Протокол иммунизации.

Кроликов иммунизировали с использованием стандартного протокола пяти инъекций и двух тестовых заборов крови на кролика. Во время каждой инъекции аликвоту антигена оттаивали и объединяли с полным адъювантом Фрейнда (CFA) (для первой инъекции) или с неполным адъювантом Фрейнда (IFA) для последующих инъекций. Путь введения представлял собой подкожную инъекцию (п/к). Сведения об иммунизации приведены в табл. 3.

Таблица 3

ID антигена	ID кролика	Подробное описание иммунизации кроликов			Примечание		
		Тип	номер	количество			
Tencon25	E4831	Забор крови	0	5 мл			
		Инъекция	1	0,4			
		Инъекция	2	0,2			
		Инъекция	3	0,2			
		Забор крови	1	5 мл			
		Инъекция	4	0,2			
		Забор крови	2	5 мл			
		Tencon25	E4832	Забор крови	0	5 мл	
				Инъекция	1	0,4	
				Инъекция	2	0,2	
	Инъекция	3		0,2			
	Забор крови	1		5 мл			
	Инъекция	4		0,2			
	Забор крови	2		5 мл			
	Инъекция	5	0,4				

Определение титра при помощи ИФА.

Сывороточный титр сыворотки против Tencon25, а также селективность и специфичность антигенов Tencon28 (SEQ ID NO: 29) и P114-83 (SEQ ID NO: 30) оценивали с использованием тестовых заборов крови 1 и 2 с применением стандартных протоколов Eritomics, Inc. В заключение оба кролика имели хороший иммунный ответ на иммуноген и соответствовали стандартному пороговому значению для спленэктомии (ОП >0,3 при разведении 1: 64 тыс). Кролик E4832 был выбран в качестве кандидата для спленэктомии и моноклонального слияния.

Спленэктомия.

Кролику E4832 делали внутривенную бустер-инъекцию с последующей спленэктомией.

Селезенку получали, и спленциты выделяли в соответствии со стандартной процедурой Eritomics (табл. 3).

Таблица 4

Подробное описание выделения спленцитов

ID антигена	ID кролика	Тип ткани	Вес (г)	Размер (см)	Жизнеспособность (%)	Общее число клеток в мл
Tencon25	E4832	Селезенка	2,14	6	80	1300

Слияние.

Двести миллионов клеток лимфоцитов были слиты со 100 миллионами клеток-партнеров по слиянию и высеяны в 20X 96-луночные планшеты соответственно (табл. 4). Планшеты хранили в инкубаторах для тканевых культур в стандартных условиях.

Таблица 5

Информация о слиянии				
ID антигена	Код слияния	Данные о слиянии	Количество планшетов	Эффективность слияния (%)
CEN-11	F1	10.08.2011	20	46
CEN-11	F2	11.08.2011	20	59

Рост клеток исследовали через 2-3 недели после слияния, и эффективность слияния вычисляли, используя количество лунок с ростом, деленное на общее количество исследованных лунок. Для каждого слияния было исследовано не менее двух планшетов.

Процесс скрининга кратко описан ниже.

Предварительный скрининг: планшеты № 5 и № 25.

Первичный скрининг: остальные 38 планшетов.

Метод скрининга: стандартный ИФА, планшеты, покрытые 50 нг Tencon25/лунка.

Положительный контроль: забор крови 2 из E4832 при разведении 1:10 тыс.

Результаты: 158 клонов с ОП более 0,5 считались предположительно положительными и были дополнительно расширены до 24-луночного планшета.

Подтверждающий скрининг: планшеты, покрытые 50 нг Tencon25/лунка или покрытые 50 нг Tencon28 или P114-83.

Результаты.

Положительными по отношению к Tencon25 был подтвержден 151 клон. Среди них 78 были специфическими для Tencon25, поскольку они являются отрицательными по отношению к Tencon28.

Пример 2. Селекция антител против домена FN3.

Производство.

Супернатант клона оценивали на связывание со всеми центринами и на отсутствие связывания с белком отрицательного контроля. На основании этой оценки для продукции выбрали один клон CEN-25-105-5. Клетки гибридомы культивировали и адаптировали к бессывороточной среде и инокулировали в колбы Integra объемом 1 л. После сбора антитела очищали с помощью смол с белком A и Qced. Выход составил 20 мг для CEN-25-105-5.

Таблица 6

Аминокислотные последовательности CDR CEN-25-105-5 (SEQ ID NO:)

Определе ние границ	HC- CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC- CDR2	LC-CDR3
IMGT	GIDLSTS V (1)	IYTNVNT (4)	ARAVYAGA MDL (7)	ERIYSN (9)	KAS (11)	QYTSYGSGY VGT (13)
Кабат	TSVMG (2)	FIYTNVNTYYAS WAKG (5)	AVYAGAMD L (8)	QASERIYS NLA (10)	KASTL AS (12)	QYTSYGSGY VGT (13)
Чотия	GIDLSTS (3)	YTNVN (6)	AVYAGAMD L (8)	QASERIYS NLA (10)	KASTL AS (12)	QYTSYGSGY VGT (13)

VH и VL CEN-25-105-5 показаны ниже в табл. 7.

Таблица 7

Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей CEN-25-105-5

Тип последовательности	Последовательность VH	SEQ ID NO:	Последовательность VL	SEQ ID NO:
Аминокислота	QSLEESGGRLVTPGTP LTLTCTVSGIDLSTSV MGWVRQAPGKGLSEI GFIYTNVNTYYASWA KGRFTISRTSTTVDLKI TSPPTGDTATYFCAR AVYAGAMDLDWGQGT LTVVSS	14	DVVMTQTPASVSGPV GGTVTIKCQASERIYS NLAWYQQKPGQPPK LLIYKASTLASGVSSR FKGSGSGTEFTLTIRD LECADAATYSCQYTS YGSYVGTGGGTEV VVEG	15
ДНК	Ctggaggagtccgggggtcgc tggtcacgcctgggacaccctg acactcacctgcacagtctctgga atcgacctcagctctctcatgg gtgggtccgccagctccagg aaggggtggaatccatcggttc attatactaatgtaacacatacta cgcgagctgggcaaaaggccga ttaccatctccagaacctcgacc acgggtgatctgaaaatcaccagt ccgacaaccggggacacggcca cctattctgtgccagagctgtttat gctggtgctatggacttggtgggc caaggcacctgtgaccgtctcc tca	16	gatgttgatgaccagactcca gcctccgtgtctggacctgtggga ggcacagtcacatcaagtcca ggccagtgagagaattatagca atttagcctggtatcagagaaac cagggcagcctccaaactctg atctacaaggcatcactctggca tctgggtctcatcgcggtcaaa ggcagtgatctggacagagtt cactctaccatcaggacactga gtgtccgatgctccacttactc ctgcaatatactcttatgacagt gttatgtgtacttcggcgagg gaccgaggtggtgctgaaggt tca	17

Переменные области тяжелых цепей и легких цепей для CEN-25-105-5 клонировали в векторы экспрессии IgG-каппа крысы и мыши для экспрессии и определения характеристик. CEN-25-105-5 в настоящее время называется AS7B91 в виде антитела к каппа IgG2a мыши, и AS7B90 в виде антитела к каппа IgG1 крысы. AS7B16 и AS7B82 также были получены, соответственно, из мышиных и кроличьих V-областей. В табл. 8 и 9 показаны последовательности CDR и последовательности V-областей AS7B16 и AS7B82. Последовательности тяжелой и легкой цепей для всех антител приведены ниже в табл. 10.

Таблица 8

Аминокислотные последовательности CDR AS7B16 и AS7B82 AS7B16

Определе ние границ	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC- CDR2	LC- CDR3
IMGT	GFSLN TS GTG (35)	IWWDDDK (41)	VRIKGR MDY (44)	QSVLFGSKQKNY (46)	WAS (48)	HQYLSL FT (50)
Кабат	TSGTG VVG (36)	HIWWDDDKGYN PALKS (42)	IKGRMD Y (45)	KSSQSVLFGSKQ KNYLA (47)	WASTR ES (49)	HQYLSL FT (50)
Чотия	GFSLN TS GT (37)	WWDDD (43)	IKGRMD Y (45)	KSSQSVLFGSKQ KNYLA (47)	WASTR ES (49)	HQYLSL FT (50)

AS7B82

Определе ние границ	HC- CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC- CDR2	LC-CDR3
IMGT	GIDFSSV AY (38)	IYAGSSSSI (51)	ARGLFTSGS GYYIDM (54)	QSIGSD (56)	SAS (58)	QCTYSSSTG YNA (60)
Кабат	SVAYM C (39)	CIYAGSSSIYYAS WAKG (52)	GLFTSGSGY YIDM (55)	QASQSIGS NLA (57)	GASNL AA (59)	QRGYISSAV DFV (61)
Чотия	GIDFSSV A (40)	YAGSSSS (53)	GLFTSGSGY YIDM (55)	QASQSIGS NLA (57)	GASNL AA (59)	QRGYISSAV DFV (61)

Таблица 9

Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей AS7B16 и AS7B82

Тип последовательности	Последовательность VH	SEQ ID NO:	Последовательность VL	SEQ ID NO:
Аминокислотная последовательность AS7B16	QVTLKESGPGILQPSQTL LTCSFSGFSLNLSGTGVG WIRQPSGKGLEWLAHIW WDDDKGYNPALKSRLTIS KNTSSNLVFLKIASVDTA DTATYYCVRIKGRMDYW GQGTSVTVSS	74	NIMMTQSPSSLAVSAGEK VTMNCSSQSVLFGSKQ KNYLAWYQQKPGQSPKL LIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFILTISNVQAEDL AVYYCHQYLSLFTFGSGT KLEIK	75
ДНК AS7B16	AGGTTACTCTGAAAGAG TCTGGCCCTGGGATATT GCAGCCCTCCAGACCC TCAGTCTGACTTGTCTT TCTCTGGGTTTTCACTGA ACACTTCTGGTACGGGT GTAGGCTGGATTCGTCA GCCTTCAGGGAAGGGTC TGGAGTGGCTGGCACAC ATTTGGTGGGATGATGA CAAGGGGTATAACCCAG CCCTGAAGAGCCGACTG ACAATCTCCAAAAACAC CTCCAGCAACCTGGTAT TCCTCAAGATCGCCAGT GTGGACACTGCAGATAC TGCCACATATTACTGTGT TCGAATCAAAGGCCGGA TGGACTACTGGGGTCAA GGAACCTCAGTCACCGT CTCCTCA	76	AACATTATGATGACACA GTCGCCATCCTCTCTGG CTGTGTCTGCAGGAGAA AAGGTCACTATGAACTG TAAGTCCAGTCAAAGTG TTTTATTCCGGTCAAAA CAGAAGAACTATTTGGC CTGGTACCAGCAGAAAC CAGGGCAGTCTCCTAAA TTGCTGATCTACTGGGC ATCCACTAGGGAATCTG GTGTCCCTGATCGCTTC ACAGGCAGTGGATCTGG GACAGATTTTATACTTA CCATCAGCAATGTACAA GCTGAAGACCTGGCAGT TTATTACTGTCATCAAT ACCTCTCCCTATTCACGT TCGGCTCGGGGACAAAG TTGAAATAAAA	77
Аминокислотная последовательность AS7B82	QEQQKESGGGLVKPGASL TLTCTASGIDFSSVAYMC WVRQAPGKGLEWIACIY AGSSSSIIYASWAKGRFT VSRTSSTTVTLQMTSLTA ADTATYFCARGLFTSGSG YYIDMWGPGTLVTVSS	78	DVVMQTQPSVVEVAVGG TVTIKQASQSIGSNLAW YQQKPGQRPKLLIYGASN LAAGVPSRFSGSGSGTQF TLTISDVECADAATYYCQ RGYISSAVDFVFGGGTE VVVKG	79
ДНК AS7B82	CAGGAGCAGCAGAAGG AGTCCGGGGGAGGCCTG GTCAAGCCTGGGGCATC CCTGACACTCACCTGCA CAGCTTCTGGAATCGAC TTCAGTAGTGTGCCTAC ATGTGTTGGGTCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGC TGGAGTGGATCGCATGC ATTTATGCTGGTAGTAGT AGTAGCATCTACTACGC GAGCTGGGCGAAAGGCC GATCACCGTCTCCAGA ACCTCGTCTACCACGGT GACTCTGCAAATGACCA GTCTGACAGCCGCGGAC ACGGCCACCTATTTCTGT GCGAGAGGTCTATTTAC TAGTGGTAGTGGATATT ATATAGACATGTGGGGC CCAGGCACCCTGGTCAC CGTCTCCTCA	80	GATGTCGTGATGACCCA GACTCCATCCTCTGTGG AGGTAGCTGTGGGAGGC ACAGTCACCATCAAGTG CCAGGCCAGTCAGAGCA TTGGTAGTAATTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACC AGGGCAGCGTCCCAAGC TCCTGATCTATGGTGCA TCCAATCTGGCCGCTGG GGTCCCATCGCGGTCA GTGGCAGTGGATCTGGG ACACAGTTCACTCTCAC CATCAGCGACGTGGAGT GTGCCGATGCTGCCACT TACTACTGTCAACGGGG TTATATTAGCAGTGCTG TTGATTTTTTTGTTTTCG GCGGAGGGACCGAGGT GGTGGTCAAAGGT	81

Последовательности тяжелой и легкой цепей AS7B91

Клон	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность легкой цепи	SEQ ID NO:
AS7B91	QSLEESGGRLVTPGTPLTLT CTVSGIDLSTSVMGWVRQA PGKGLSIGFIYTNVNTYYA SWAKGRFTISRTSTTVDLKI TSPTTGDATYFCARAVYA GAMDLWGQGLVTVSSAK TTAPSVYPLAPVCGDTTGSS VTLGCLVKGYFPEPVTLTW NSGSLSSGVHTFPAVLQSDL YTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDKIEPRGP TIKPCPPCKCPAPNLLGGPSV FIFPPKIKDVLMISSLPIVTCV VVDVSEDDPDVQISWVFN VEVHTAQTQTHREDYNSTL RVVSALPIQHQDWMGKEF KCKVNNKDLPAPIERTISKP KGSVRAPQVYVLPPEEEM TKKQVTLTCMVTDMPEDI YVEWTNNGKTELNYKNTEP VLSDGSYFMYSKLRVEKK NWVERNSYSCSVVHEGLHN HHTTKSFSRTPGK	18	DVVMTQTPASVSGPVGGTV TIKCQASERIYSNLAWYQQK PGQPPKLLIYKASTLASGVS SRFKGGSGGTEFTLTIRDLEC ADAATYSCQYTSYGGSGYVG TFGGGTEVVVEGRADAAPT VSIFPPSSEQLTSGGASVVCF LNNFYPKDINVKWKIDGSER QNGVLNSWTDQSKDSTYS MSSTLTLTKDEYERHNSYTC EATHKTSTSPIVKSFNRNEC	19

AS7B90	QSLEESGGRLVTPGTPLTLT CTVSGIDLSTSVMGWVRQA PGKGGLEISGFYTNVNTYYA SWAKGRFTISRTSTTVDLKI TSPTTGDATATYFCARAVYA GAMDLWGQGLVTVSSAET TAPSVYPLAPGTALKSNSM VTLGCLVKGYFPEPVTVTW NSGALSSGVHTFPAVLQSG YTLTSSVTVPSSTWPSQTVT CNVAHPASSTKVDKIVPR NCGGDCKPCICTGSEVSSVFI FPPKPKDVLITLTPKVTCV VVDISQDDPEVHFSWFVDD VEVHTAQTRPPEEQFNSTFR SVSELPILHQDWLNGRTFRC KVTSAAFPSPIEKTISKPEGR TQVPHVYTMSPKTEEMTON EVSITCMVKGFYPPDIYVEW QMNGQPQENYKNTPTMDT DGSYFLYSKLVKKEKWQQ GNTFTCSVLHEGLHNHTE KLSLHSPGK	20	DVVMTQTPASVSGPVGGTV TIKCQASERIYSNLAWYQQK PGQPPKLLIYKASTLASGVS SRFKGS GSGTEFTLTIRDLEC ADAATYSCQYTSYGSGYVG TFGGGTEVVVEGRADAAPT VSIFPPSSEQLASGGASVVC INKFYPKDISVKWKIDGSER QNDVLNSVTDQDSKDSTYS MSSTLTLTKADYERHNLTY CEVVHKTSASPVVKSFNRN EC	21
AS7B16	QVTLKESGPGILQPSQTLST CSFSGFSLNTSGTGVGWIRQ PSGKGLEWLAHIWDDDK GYNPALKSRLTISKNTSSNL VFLKIASVDTADTATYYCV RIKGRMDYWGQTSVTVSS KTTPPSVYPLAPGSAQTNS MVTLGCLVKGYFPEPVTVT WNSGSLSSGVHTFPAVLESD LYTLSSSVTVSSPRPSETVT CNVAHPASSTKVDKIVPR DCGCKPCICTVPEVSSVFI PKPKDVLITLTPKVTCVVV DISKDDPEVQFSWFVDDVE VHTAQTPREEQFNSTFRSV SELPIMHQDWLNGKEFKCR VNSAAFPAPIEKTISKTKGRP KAPQVYTIPPPKEQMAKDK VSLTCMITDFFPEDITVEWQ WNGQPAENYKNTQIMNTN GSYFVYSKLVQKSNWEAG NTFTCSVLHEGLHNHTEKS LSHSPGK	62	NIMMTQSPSSLA VSAGEKVT MNCKSSQSVLFGSKQKNYL AWYQQKPGQSPKLLIY WAS TRESGV PDRFTGSGSGTDFIL TISNVQAEDLA VYYCHQYL SLFTFGSGTKLEIKRADAAP TVSIFPPSSEQLTSGGASVVC FLNNFY PKDINVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKDSTY SMSSTLTLTKDEYERHNSYT CEATHKTSTSPIVKSFNRN C	63
AS7B82	QEQQKESGGGLVKPGASLT LTCTASGIDFSSVAYMCWV RQAPGKLEWIACIYAGSSS SIYYASWAKGRFTVSRSSST TVTLQMTSLTAADTATYFC ARGFLTSGSGYYIDMWGPG	64	DVVMTQTPSSVEVAVGGTV TIKCQASQSIGSNLAWYQQK PGQRPKLLIYGASNLAAGVP SRFSGSGGTQFTLTISDVEC ADAATYYCQRGYISSAVDF FVFGGGTEVVVKGRVAAP	65

TLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSP GK		SVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSDKST YLSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC	
---	--	---	--

Пример 3. Связывание рекомбинантных AS7B90 и AS7B91 с доменом FN3 по сравнению с исходным кроличьим антителом CEN-25-105-5.

Супернатанты для AS7B90 и AS7B91, которые являются крысиными и мышинными химерами, соответственно, CEN-25-105-5, оценивали на их способность связывать рекомбинантные домены FN3 с помощью ИФА. Три планшета были дозозависимым образом покрыты доменом FN3 A3, специфическим для человеческого cMET (SEQ ID NO: 31), 83v2-ABD, специфическим к человеческому EGFR с альбуминсвязывающим доменом (SEQ ID NO: 32), tencon 25, который не имеет специфичности (SEQ ID NO: 28), или белком отрицательного контроля, все по 50 мкл/лунка в 50 мМ PBS. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4°C. Супернатанты сбрасывали с планшетов и добавляли 200 мкл/лунку Superblock для блокирования планшетов в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты 3 раза промывали TBS-T. Супернатанты и CEN25-105-5 готовили в концентрации 1 мкг/мл в Superblock и добавляли в планшеты. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали TBS-T. Вторичные антитела (ПХ-козье антикроличье, крысиное или мышинное) готовили в Superblock в соотношении 1: 10000 и добавляли в планшеты. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали TBS-T. В планшеты добавляли 50 мкл/лунку реагента POD (приготовленного в соответствии с инструкциями производителя Sigma-Aldrich и инкубированного в темноте при комнатной температуре в течение по меньшей мере 30 мин перед использованием). После 3-5 мин инкубации в защищенном от света месте M5 использовали для считывания люминесценции. Результаты были нанесены на график в Prism (фиг. 1A-C) с использованием преобразования повторным логарифмированием, а затем аппроксимации кривой по четырем параметрам. Как показано на фиг. 1A-C, как AS7B90, так и AS7B91 продемонстрировали специфичность к трем различным доменам FN3, подтверждая, что эпитоп связывания этих антител против домена FN3 специфичен к консервативным карманным областям, а не варибельным петлям, которые обеспечивают специфичность домена FN3. Следует отметить, что не было обнаружено неспецифического связывания с антителом отрицательного контроля. Мышиная версия антитела AS7B91, по-видимому, имела характеристики связывания, более сходные с исходным кроличьим гибридомным антителом.

Пример 4. Тестирование AS7B91 для обнаружения экспрессируемых на поверхности первичных Т-клеток CARTYRIN против BCMA.

100 мкл на лунку высевали 1×10 Т-клеток с CARTyriп против BCMA/мл. Лунки промывали 2 раза PBS. Краситель eFlour 506 Fixable Viability Dye был добавлен к образцам в конечной концентрации 1: 2000 для окрашивания живых-мертвых клеток в образце и оставлен для инкубации в течение 30 мин при 4°C. Реакцию окрашивания гасили буфером для FACS, и образцы дважды промывали буфером для FACS. Fc Block добавляли (33 мкл Fc/мл FaCS) в течение 10 мин при комнатной температуре. Добавляли 100 мкл первичного AS7B91, буфера для FACS или изотипического контроля и инкубировали 20 мин на льду. Затем образцы промывали один раз с использованием буфера для FACS. Добавляли вторичное антитело и инкубировали в течение 20 мин на льду (антимышиный IgG-AF647 использовали в 1:50 для конечной концентрации 10 мкг/мл). После инкубации с вторичным антителом лунки промывали один раз с использованием буфера для FACS, а затем один раз с использованием PBS. После промывки образцы фиксировали в 2% PFA в течение 10 мин при комнатной температуре. Образцы промывали и повторно суспендировали в буфере для FACS.

Как показано на фиг. 2 рекомбинантное AS7B91 было способно обнаружить экспрессию CARTyriп на поверхности первичных Т-клеток и, таким образом, может использоваться в качестве общего реагента для обнаружения CARTyriп. В гомогенной популяции экспрессирующих CARTyriп Т-клеток антитело AS7B91 может быть использовано для количественного определения CARTyriп на поверхности клеток.

Пример 5. Применение AS7B91 для активации Т-клеток, экспрессирующих CARTYRIN.

Поскольку CARTyгin присоединяются к Т-клеточным сигнальным доменам, связывание и кластеризация этих CARTyгin антителом AS7B91 может привести к активации этих сигнальных доменов и активации экспрессирующих их Т-клеток. Чтобы проверить это, первичные Т-клетки, экспрессирующие CARTyгin, инкубировали с AS7B91 или антителом против CD3, которое, как известно, вызывает активацию. Вкратце, 12 различных клонов РНК, экспрессирующих CARTyгin к ВСМА, подвергали электропорации в первичные пан-Т-клетки, полученные из крови здорового человека (Центр службы крови - НИИ им. Скриппса (Normal Blood Donor Service - TSRI)), с использованием системы ECM 830 Square Wave Electroporation System (BTX). 5×10^6 пан-Т-клеток получало один электрический импульс (500 В, 750 мкс) в соответствии с протоколом производителя, или с 10 мкг мРНК CAR, нацеленного на ВСМА, или без нее. Поверхностную экспрессию CAR оценивали через 24 ч с использованием поликлонального Ат против домена FN3. AS7B91 или антитело против CD3 добавляли в концентрации 5 мкг/мл в присутствии растворимого антитела против CD28 (2 мкг/мл). Клетки окрашивали на маркеры субпопуляций Т-клеток (CD4, 8), маркеры активации (CD25, 69, 71, 137, HLA-DR) и красителем Fixable Viability Dye. Клетки гейтировали по жизнеспособности (отрицательный FVD) -> исключали парные клетки-> CD4 или CD8 одиночные положительные -> CD4 и CD8 оценивали на экспрессию маркера активации по отдельности. Напряжения LSR устанавливают на основе конъюгированных с антителом гранул и одноцветных контролей. Гейты были установлены на основе флуоресценции с комбинацией детектируемых меток без одной (FMO) и изотопических контролей.

Как видно из табл. 11, моноклональное антитело AS7B91 против домена FN3 способно стимулировать CARTyгin+первичные пан-Т-клетки при костимуляции через CD28 (аналогично процедурам с антителами против CD3/CD28). Эта активация зависит от экспрессии CARTyгin и не является такой же устойчивой или продолжительной, как с антителом против CD3. Кроме того, обработка AS7B91 и антителом против CD28 приводит к 11-кратному увеличению числа клеток по сравнению с нестимулированными клетками. Таким образом, антитело против домена FN3 может индуцировать пролиферацию Т-клеток и активацию клеток, экспрессирующих CARTyгin.

Табл. 11. Активация пан-Т-клеток, экспрессирующих CARTyгin, с использованием антитела против центрина AS7B91 в комбинации с костимулированием антителом против CD28. По сравнению с экспрессией нестимулированных контрольных клеток полож. = положительное окрашивание (отриц. в нестимулированных), выс.= высокий уровень окрашивания, низ.= низкий уровень окрашивания (отриц. в нестимулированных), отриц.= отсутствие окрашивания.

Таблица 11

		День 2					
CD8	CD25	DR	CD71	CD69	CD137		
	полож.	выс.	выс.	низ.	отриц.	а-центририн	
	полож.	выс.	выс.	полож.	полож.	а-CD3	

Пример 6. Конструирование AS7B91 В SCFV химерного антигенного рецептора.

Для создания конструкта CAR антител AS7B91, AS7B16 и AS7B82 переменные области конструировали в scFv. Для AS7B91 scFv создавали в двух различных ориентациях: HCv-LCv, или LCv-HCv.

AS7B91 H-L scFv (SEQ ID NO: 22)

METGLRWLLLVAVLKGVCQCSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSTVSMGW
VRQAPGKGLSIGFIYTNVNTYYASWAKGRFTISRTSTTVDLKITSPTTGDTATYFCARA
VYAGAMDLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMVTQTPASVSGPVGG

Аминокислотная последовательность двух различных конструкторов CAR AS7B91, AS7B16 и AS7B82 (ориентация H-L и ориентация L-H)

Домен	Последовательность
Внеклеточный AS7B91	<p>SEQ ID NO: 72 (ориентация H-L) QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSTSVMGWVRQAPGKG LESIGFIYTNVNTYYASWAKGRFTISRTSTTVDLKITSPTTGDTA TYFCARAVYAGAMDLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGS GGGSDVVMTQTPASVSGPVGGTVTIKQASERIYSNLAWYQ QKPGQPPKLLIYKASTLASGVSSRFKSGSGTEFTLTIRDLECA DAATYSCQYTSYSGSYVGTFFGGGTEVVVEG SEQ ID NO: 73 (ориентация L-H) DVVMTQTPASVSGPVGGTVTIKQASERIYSNLAWYQKPGQ PPKLLIYKASTLASGVSSRFKSGSGTEFTLTIRDLECADAAATY SCQYTSYSGSYVGTFFGGGTEVVVEGGGGSGGGGGSGGGGS GGGSLVESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSTSVMGWVRQAPG KGLESIGFIYTNVNTYYASWAKGRFTISRTSTTVDLKITSPTTG DTATYFCARAVYAGAMDLWGQGLVTVSS</p>
Внеклеточный AS7B16	<p>SEQ ID NO: 68 (ориентация H-L) QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLNTSGTGVGWIRQPSG KGLEWLAHIWDDDKGYNPALKSRLTISKNTSSNLVFLKIASV DTADTATYYCVRIKGRMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGGSG GGGSGGGSNIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMNCSSQSVLFGS KQKNYLAWYQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGT DFILTISNVQAEDLAVYYCHQYLSLFTFGSGTKLEIKTTTPAPRP PTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNL GRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEA YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA LPPR SEQ ID NO: 69 (ориентация L-H) NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMNCSSQSVLFGSKQKNYLAWY QKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFILTISNVQA EDLAVYYCHQYLSLFTFGSGTKLEIKGGGGSGGGGGSGGGGGSG GGGQVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLNTSGTGVGWIR QPSGKGLEWLAHIWDDDKGYNPALKSRLTISKNTSSNLVFL KIASVDTADTATYYCVRIKGRMDYWGQGTSTVTVSSSTTPAPR PPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEE DGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELN LGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEA YSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA ALPPR</p>
Внеклеточный AS7B82	<p>SEQ ID NO: 70 (ориентация H-L) QEQQKESGGGLVKPGASLTLTCTASGIDFSSVAYMCWVRQAP GKLEWIACIYAGSSSIYYASWAKGRFTVSRSTSTTVTLQMT SLTAADTATYFCARGLFTSGSGYYIDMWGPGTLVTVSSGGGG GSGGGGGSGGGGGSDVVMTQTPSSVEVAVGGTVTIKQQA SQSIGSNLAWYQKPGQRPKLLIYGASNLAAGVPSRFSGSGS TQFTLTISDVECADAAATYYCQRGYISSAVDFVFGGGTEVVVK GTTTPAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQN</p>

	QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR SEQ ID NO: 71 (ориентация L-H) DVTMTQTPSSVEVAVGGTVTIKQASQSIGSNLAWYQQKPGQ RPKLLIYGASNLAAGVPSRFSGSGSGTQFTLTISDVECADAATY YCQRGYISSAVDFVFGGGTEVVVKGSGGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSEQQKESGGGLVKPGASLTLTCTASGIDFSSVAYMCWV RQAPGKGLEWIACIYAGSSSSIIYASWAKGRFTVSRSTSSTVTL QMTSLTAADTATYFCARGLFTSGSGYYIDMWGPGTLVTVSST TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNL NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDA LHMQALPPR
шарнир человеческого CD8	SEQ ID NO: 24 TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIY
трансмембранный домен человеческого CD8	SEQ ID NO: 25 IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK
внутриклеточный домен человеческого 4- 1BB	SEQ ID NO: 26 RGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
внутриклеточный домен человеческого CD3-дзета	SEQ ID NO: 27 RVKFSRSADAPAYKQGQNLNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Пример 7. Создание и анализ сконструированных иммунных клеток, экспрессирующих CAR AS7B91, AS7B16 и AS7B82.

мРНК подвергали электропорации в пан-Т-клетки, полученные из крови здорового человека (Центр службы крови - НИИ им. Скриппса), с использованием системы ECM 830 Square Wave Electroporation System (BTX). 5×10^6 пан-Т-клеток получало один электрический импульс (500 В, 750 мкс) в соответствии с протоколом производителя, или с 10 мкг мРНК CAR AS7B91 или без нее. Поверхностную экспрессию CAR оценивали через 24 ч с использованием поликлонального Ат против домена FN3. Результаты представлены на фиг. 3.

Функциональные свойства клеток с AS7B91 scFv CAR тестировали на их способность связываться с доменами FN3 и вызывать уничтожение Т-клеток в ответ на связывание домена FN3 с клетками-мишенями. Сначала это было определено в анализе на дегрануляцию с использованием ВСМА-специфических доменов FN3 вместе с ВСМА^{выс} (клетки H929), ВСМА^{низ} (клетки D0HH-2) ВСМА^{отриц} (клетки EXP1293) клетками-мишенями, а затем в анализе уничтожения.

В анализе на дегрануляцию (мобилизация CD107a) Т-клетки инкубировали в 96-луночных планшетах вместе с клетками, экспрессирующими или не экспрессирующими белок ВСМА, в соотношении 1:1 или 1:10. Совместные культуры поддерживали в конечном объеме "полной" среды OpTmizer, содержащей 1: 1500 Golgi Stop (BD) и 1: 1300 анти-CD107a APC (Biolegend) в течение 4 ч при 37°C. После 4-часового периода инкубации клетки окрашивали красителем Fixable Viability Dye (eFluor 780 от eBioscience) и конъюгированным флуорохромом анти-CD8 (PE-конъюгированным, Biologend) и анализировали при помощи проточной цитометрии. Активность дегрануляции определяли путем определения сигнала средней интенсивности флуоресценции (СИФ) в отношении окрашивания CD107a среди CD8+ клеток. Анализ дегрануляции проводили через 24 ч после трансфекции мРНК. Как видно на фиг. 4, после добавления домена FN3, специфического для анти-ВСМА, Т-клетки, экспрессирующие AS7B91 scFv CAR, подвергались дегрануляции специфическим для анти-ВСМА и AS7B91 способом. Эти данные демонстрируют, что AS7B91 scFv CAR является функциональным в своей способности связываться и сигнализировать в ответ на целевой специфический домен FN3, в котором мишень экспрессируется на поверхности других клеток.

AS7B91 scFv CAR-Т-клеточное уничтожение в ответ на специфичные для ВСМА домены FN3 вместе с мечеными CFSE ВСМА^{выс} (клетками U-2932), ВСМА^{низ} (клетками D0HH-2) ВСМА^{отриц} (клетками EXP1293). CAR-Т/контрольные (ложнотрансфицированные) Т-клетки предварительно инкубировали с ВСМА-специфическими доменами FN3 в течение 1 ч при 37 °C до 48-часовой инкубации с ВСМА клетками-мишенями при соотношениях Е: Т в диапазоне от 0 до 1. В конце эксперимента мертвые клетки метили CFSE-FL1, SYTOX-red-FL4. Процент гибели клеток анализировали с помощью проточного цитометра (FACSCalibur), а данные анализировали с помощью FlowJo v 10. Как видно на фиг. 5, после добавления ВСМА-специфического домена FN3 Т-клетки, экспрессирующие AS7B91 scFv CAR, уничто-

жали клетки-мишени, экспрессирующие ВСМА, специфическим для домена FN3 против ВСМА и AS7B91 scFv CAR. Эти данные демонстрируют, что AS7B91 scFv CAR является функциональным в своей способности связываться и сигнализировать в ответ на целевой специфический домен FN3, в котором мишень экспрессируется на поверхности других клеток.

Для AS7B16 и AS7B82 связывание оценивали с использованием проточной цитометрии. Вкратце, через 24 ч после электропорации клетки центрифугировали при $100 \times g$ в течение 10 мин и дважды промывали в буфере для окрашивания для FACS (BD Biosciences № по каталогу 554657). Клетки инкубировали с APC-мечеными анти-Tencon-25 или AF647-мечеными доменами FN3 83v2 против EGFR в конечной концентрации 50 нМ при 4°C в течение 1 ч. Меченые клетки дважды промывали в буфере для окрашивания для FACS и ресуспендировали в 200 мкл того же буфера. Данные собирали с помощью проточного цитометра BD LSRFortessa и проводили анализ с использованием программного обеспечения Flowjo. Данные показаны на фиг. 6-фиг. 9. Все протестированные CART AS7B16, AS7B82 и AS7B91 связываются с обоими протестированными доменами FN3, Tencon-T25 и EGFR 83v2. Связывание CART происходит следующим образом: ASS7B91>AS7B82>AS7B16.

Пример 8. *In vitro* уничтожение клеток, экспрессирующих антитело против цитруллинированного белка, опосредованное Т-клетками с AS7B91 SCFV CAR, предварительно связанными в комплекс с доменом FN3, конъюгированным с циклическими цитруллинированными пептидами.

Аутоиммунные заболевания характеризуются нарушением выработки антител к аутоантигенам (аутоантителам). Эти аутоантитела могут быть направлены против множества молекул, включая, но не ограничиваясь ими, белки и нуклеиновые кислоты. В случае белков эти аутоантитела часто распознают посттрансляционно модифицированные антигены. Ниже показано *in vitro* уничтожение клеток, экспрессирующих антитело против цитруллинированного белка (ACPA), опосредованное Т-клетками с AS7B91 scFv CAR (клетки "BAR-T"), предварительно связанными в комплекс с центрином, конъюгированным с циклическими цитруллинированными пептидами (CCP-1). Это открытие позволяет предположить, что аутоантигены могут быть конъюгированы с центрином Tencon25 для взаимодействия с BAR-T-клетками, что приводит к направленной элиминации антигенспецифических аутореактивных В-клеток.

Создание клеточных линий, экспрессирующих FcgR.

Очищенные лентивирусные плазмиды экспрессии, кодирующие человеческие FcgR (CD16a, CD32 и CD64), упаковывали для трансфекции клеток 293Т с использованием Lenti-Pac HIV Expression Packaging System (GeneSocoeia). Через 72 ч после трансфекции супернатант, содержащий лентивирус, собирали и использовали для трансдукции клеток HEK293. Среда была дополнена полибренем (конечная концентрация - 8 мкг/мл). На следующий день среды, содержащие полибрен, были заменены средой RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки. Через 72 ч после трансдукции клетки собирали и окрашивали на экспрессию FcgR. Затем клетки сортировали на основании экспрессии FcgR (SH800S Cell Sorter Sony Biotechnology). Клетки с высокой экспрессией культивировали и использовали в качестве клеток-мишеней для будущих исследований.

Конъюгация цитруллинированных циклических пептидов с центрином Tencon25.

Меченный глицином (GGG-) цитруллинированный циклический пептид-1 (CCP-1-Cit) и аргининовый контрольный пептид (CCP-1-Arg) были получены от Peptides International. Меченный сортозой-v5 Tencon25 (Tencon25_sort_v5) обессоливали в TBS и концентрировали перед конъюгацией. Каждый пептид конъюгировали в соотношении 1: 5 (домен FN3 к пептиду) посредством химии сортозы. Конъюгаты очищали вручную на колонке с Ni-сефарозой (GE) для удаления свободной сортозы и пептида. После очистки проводили замену буфера на PBS и концентрировали конъюгаты. Конъюгаты проверяли на качество с помощью (а) масс-спектрометрии (ЖХ-МС) и (b) эксклюзионной хроматографии (Superdex 75) и подвергали стерильной фильтрации.

Обнаружение связывания антицитруллинированных антител с конъюгатами центрин-ССP1-пептид

Клетки HEK293, экспрессирующие FcgR, инкубировали с 200 мкг/мл человеческого антитела против цитруллинированного фибриногена (клон 1F11-Modiquest) или изотипического контроля IgG1 человека (Abscam) в течение 30 мин на льду. Клетки дважды промывали буфером для FACS, затем инкубировали с конъюгатом центрин-ССP1-Cit (576 нМ) в течение 1 ч на льду. Клетки дважды промывали буфером для FACS, затем инкубировали с меченым PE (фикоэритрином) антителом против центрина (AS7B91) в течение 30 мин на льду. Связывание оценивали при помощи проточной цитометрии (BD FACSCanto II) и анализировали с помощью программного обеспечения BDFACSDiva 6.1.3.

Опосредованное Т-клетками с AS7B91 scFv CAR уничтожение клеток, экспрессирующих FcR, связанный с антицитруллинированным мкАт.

Ложноэлектропорированные Т-клетки (контроль) или Т-клетки с scFv CAR AS7B91 ("BAR-T") предварительно связывали в комплекс с центрин-конъюгированным CCP1 (cit-CCP). Клетки HEK293, экспрессирующие CD16a или CD64, метили красителем Cell Tracker Green (CTG) (ThermoFisher) и предварительно связывали или с изотипическим контролем IgG1 человека, или с антителом против цитруллинированного фибриногена (Ат против CCP). Затем клетки BAR-T и HEK293 высевали в соотношении 1:1 или 5:1 в течение ~18 ч. В конце эксперимента клетки окрашивали с использованием красителя Zom-

bie Dye Violet (Biolegend). Мертвые клетки рассматривали как клетки CTG +/-Zombie+ согласно оценке при помощи проточной цитометрии (BD FACSCanto II). Данные анализировали с помощью программного обеспечения BD FACSDiva 6.1.3 и Graphpad Prism 5. Наблюдали 2-кратное увеличение гибели клеток-мишеней, связанных с антицитруллинированным антителом, при инкубации с VAR-T-клетками, предварительно образовавшими комплекс с центирин-ССР-1-cit, по сравнению с инкубацией с контрольными T-клетками или изотипическими контрольными антителами.

Оценка потенциальных комбинаций пептид/антитело при множественных аутоиммунных заболеваниях для расширения платформы VAR-T.

Пептиды, специфические для а) миастении гравис (МГ), б) рассеянного склероза (РС) и в) системной красной волчанки (СКВ), тестировали на их способность связываться с антителами против AChR, против MOG или против дцДНК, соответственно. Три нейтравидиновых планшета с высокой аффинностью связывания были покрыты 10 мкг/мл указанных пептидов. Планшеты промывали 3 раза PBS-T и блокировали 2X буфером Assay Buffer A (eBioscience) в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза PBS-T и добавляли 100 мкг/мл указанного антитела в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза PBS-T и соответствующее вторичное антитело добавляли в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза PBS-T и субстрат TMB добавляли в течение 5-8 мин перед добавлением останавливающего раствора Stop Solution (ThermoFisher). Прибор SpectraMax340PC использовали для считывания оптической плотности, а данные анализировали с использованием программного обеспечения Graphpad Prism 5. Результаты связывания идентифицировали одну потенциальную комбинацию пептид/антитело для каждого показания к заболеванию для дальнейшей оценки.

Краткое описание списка последовательностей.

SEQ ID NO:	Тип	Вид	Описание	Последовательность
1	PRT	Кроличья	HCDR1 CEN-25-105-5 по IMGT	GIDLSTSV
2	PRT	Кроличья	HCDR1 CEN-25-105-5 по Кабату	TSVMG
3	PRT	Кроличья	HCDR1 CEN-25-105-5 по Чотиа	GIDLSTS
4	PRT	Кроличья	HCDR2 CEN-25-105-5 по IMGT	IYTNVNT
5	PRT	Кроличья	HCDR2 CEN-25-105-5 по Кабату	FIYTNVNTYYASWAKG
6	PRT	Кроличья	HCDR2 CEN-25-105-5 по Чотиа	YTNVN
7	PRT	Кроличья	HCDR3 CEN-25-105-5 по IMGT	ARAVYAGAMD
8	PRT	Кроличья	HCDR3 CEN-25-105-5 по Кабату и Чотиа	AVYAGAMD
9	PRT	Кроличья	LCDR1 CEN-25-105-5 по IMGT	ERIYSN
10	PRT	Кроличья	LCDR1 CEN-25-105-5 по Кабату и Чотиа	QASERIYSNLA
11	PRT	Кроличья	LCDR2 CEN-25-105-5 по IMGT	KAS
12	PRT	Кроличья	LCDR2 CEN-25-105-5 по Кабату и Чотиа	KASTLAS
13	PRT	Кроличья	LCDR3 CEN-25-105-5 по IMGT, Кабату и Чотиа	QYTSYGSGYVGT
14	PRT	Кроличья	VH CEN-25-105-5	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSTSVMG WVRQAPGKGLSIGFIYTNVNTYYASWAKGRF TISRTSTTVDLKITSPTTGDATYFCARAVYAGA

				MDLWGQGLVTVSS
15	PRT	Кролик	VL CEN-25-105-5	DVVMTQTPASVSGPVGGTVTIKCQASERIYSNL AWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASGVSSRFKGS SGTEFTLTIRDLECADAAATYSCQYTSYGSYVG TFGGGTEVVVEG
16	ДН К	Кролик	VH CEN-25-105-5	Ctggaggagtcgggggctgcctggtcacgctgggacaccctgacac tcactgcacagtcctggaatcgacctagctctgcatgggtgggc cgccaggctccaggaagggctggaatccatcgattattataactaat gttaacacatactacgcagctgggcaaaaggccgattaccatctcaga acctgaccacggtgatctgaaatcaccagtcgacaaccgggacac ggccacctattctgtccagagctgftatgctggtgctatggactgtggg gccaaggcaccctggtcaccgtctctca
17	ДН К	Кролик	VL CEN-25-105-5	gatgttggatgaccagactccagcctcctgctgacctgtggaggc acagtcaccatcaagtccaggccagtgagagaattatagcaattagcct ggtatcagcagaaccaggcagcctccaaactctgatctacaaggca tccactctgcatctgggtctcatcgcggtcaaaggcagtgatctggga cagagttcactctaccatcaggaccttgagtgccgatgctccactta ctctgctcaatatactcttatggcagtggtatggtactttcggcggagg gaccgagtggtggtcgaaggt
18	PRT	Искусствен ная	Тяжелая цепь AS7B91	QSLEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGIDLSTSMG WVRQAPGKGLESIGFIYTNVNTYYASWAKGRF TISRTSTTVDLKITSPTTGDATYFCARAVYAGA MDLWGQGLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDT TGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVH TFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQITCNVA HPASSTKVVDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLG GPSVFIFPPKIKDVLMLISLPIVTCVVVDVSEDDP DVQISWVFNNEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVV SALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPIERTI SKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCM VTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL HNHHTTKSFSRTPGK
19	PRT	Искусствен ная	Легкая цепь AS7B91	DVVMTQTPASVSGPVGGTVTIKCQASERIYSNL AWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASGVSSRFKGS SGTEFTLTIRDLECADAAATYSCQYTSYGSYVG TFGGGTEVVVEGRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGG ASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNS WTDQDSKDYMSSTLTLTKDEYERHNSYTCE ATHKTSTSPIVKSFRNEC
20	PRT	Искусствен ная	Тяжелая цепь AS7B90	QSLEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGIDLSTSMG WVRQAPGKGLESIGFIYTNVNTYYASWAKGRF TISRTSTTVDLKITSPTTGDATYFCARAVYAGA MDLWGQGLVTVSSAETTAPSVYPLAPGTALK SNSMVTGCLVKGYFPEPVTLTWNSGALSSGV HTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWPSQTVTCN VAHPASSTKVVDKIVPRNCGGDCKPCICTGSEV SSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISQDDPE VHFSWFVDDVEVHTAQTRPPEEQFNSTFRSVSE LPILHQDWLNGRTRFCKVTSAAFPSPIEKTISKPE GRTQVPHVYTMSPKTEEMTQNEVSITCMVKGF YPPDIYVEWQMNGQPQENYKNTPTMDTDGSY

				FLYSKLNVKKEKWQQGNTFTCSVLHEGLHNHH TEKSLSHSPGK
21	PRT	Искусствен ная	Легкая цепь AS7B90	DVVMTQTPASVSGPVGGTVTIKCQASERIYSNL AWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASGVSSRFKGS SGTEFTLTIRDLECAATAYSQYTSYGSGYV TFGGGTEVVVEGRADAAPTVSIFPPSSEQLASGG ASVVCFINKFYPKDISVKWKIDGSRQNDVLNS VTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKADYERHNLTYCE VVHKTSASPVVKSFRNEC
22	PRT	Искусствен ная	AS7B91 H-L scFv	METGLRWLLLVAVLKGVCQCSLEESGGRLVTP GTPLTLTCTVSGIDLSTSMGWVVRQAPGKGLS IGFIYTNVNTYYASWAKGRFTISRSTTVDLKIT SPTTGDATYFCARAVYAGAMDLDWGQGLVT VSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDVVMTQTPA SVSGPVGGTVTIKCQASERIYSNLAWYQQKPGQ PKLLIYKASTLASGVSSRFKGSQSGTEFTLTIRD LECAATAYSQYTSYGSGYVGTFGGGTEVVV EG
23	PRT	Искусствен ная	AS7B91 L-H scFv	MDTRAPTQLLGLLLWLPGARCDVVMTQTPAS VSGPVGGTVTIKCQASERIYSNLAWYQQKPGQP PKLLIYKASTLASGVSSRFKGSQSGTEFTLTIRD LECAATAYSQYTSYGSGYVGTFGGGTEVVVE GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLVESGGRLVTP GTPLTLTCTVSGIDLSTSMGWVVRQAPGKGLS IGFIYTNVNTYYASWAKGRFTISRSTTVDLKIT SPTTGDATYFCARAVYAGAMDLDWGQGLVT VSS
24	PRT	Человеческ ая	Шарнир CD8	TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIY
25	PRT	Человеческ ая	Трансмембранн ый домен CD8	IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCK
26	PRT	Человеческ ая	Внутриклеточн ый домен 4-1BB	RGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL
27	PRT	Человеческ ая	Внутриклеточн ый домен CD3- дзета	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTA TKDITYDALHMQUALPPR
28	PRT	Искусствен ная	Tencon25	LPAPKNLVVSEVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLI QYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTE YTVSIYGVKGGHRSNPLSAIFTT
29	PRT	Искусствен ная	Tencon28	MLPAPKNLVVSEVTHDSARLSWTAPDAAFDSFL IQYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKHHT YTVSIYGVKGGHRSNPLSAIFHTHHHHHH
30	PRT	Искусствен ная	P114-83	MLPAPKNLVVSRVTHDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKHHT EYVVNIMGVKGGKISPLSAIFTTHHHHHHH
31	PRT	Искусствен ная	A3	MLPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSF WIRYFEFLGSGEAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYVVNIMGVKGGKISPLSAIFTTGGHHHHHH
32	PRT	Искусствен ная	Последовательн ость 83v2-ABD	MLPAPKNLVVSEVTEDSARLSWDDPWAFYESF LIYQSEKVGAEIVLTVPGSERSYDLTGLKPGT EYTVSIYGVHNVYKDTNMRGLPLSAIFTTGGGG

				SGGGSLAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLIN NAKTVEGVKALIDEILAALPGGHHHHHH
33	PRT	Искусствен ная	Tencon	LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQ YQESEKVGAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEY TVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT
34	PRT	Искусствен ная	Tencon27	LPAPKNLVVSRVTEDSARLSWTAPDAAFDSFLI QYQESEKVGAIVLTVPGSERSYDLTGLKPGTE YTVSIYGVKGGHRSNPLSAIFTT
35	PRT	Мышиная	HCDR1 AS7B16 по IMGT	GFSLNTSGTG
36	PRT	Мышиная	HCDR1 AS7B16 по Кабату	TSGTGVG
37	PRT	Мышиная	HCDR1 AS7B16 по Чотиа	GFSLNTSGT
38	PRT	Кроличья	HCDR1 AS7B82 по IMGT	GIDFSSVAY
39	PRT	Кроличья	HCDR1 AS7B82 по Кабату	SVAYMC
40	PRT	Кроличья	HCDR1 AS7B82 по Чотиа	GIDFSSVA
41	PRT	Мышиная	HCDR2 AS7B16 по IMGT	IWWDDDK
42	PRT	Мышиная	HCDR2 AS7B16 по Кабату	HIWWDDDKGYNPALKS
43	PRT	Мышиная	HCDR2 AS7B16 по Чотиа	WWDDD
44	PRT	Мышиная	HCDR3 AS7B16 по IMGT	VRIKGRMDY
45	PRT	Мышиная	HCDR3 AS7B16 по Кабату и Чотиа	IKGRMDY
46	PRT	Мышиная	LCDR1 AS7B16 по IMGT	QSVLFGSKQKNY
47	PRT	Мышиная	LCDR1 AS7B16 по Кабату и Чотиа	KSSQSVLFGSKQKNYLA
48	PRT	Мышиная	LCDR2 AS7B16 по IMGT	WAS
49	PRT	Мышиная	LCDR2 AS7B16 по Кабату и Чотиа	WASTRES
50	PRT	Мышиная	LCDR2 AS7B16 по IMGT, Кабату и Чотиа	HQYLSLFT
51	PRT	Кроличья	HCDR2 AS7B82 по IMGT	IYAGSSSSI
52	PRT	Кроличья	HCDR2 AS7B82 по Кабату	CIYAGSSSIYYASWAKG
53	PRT	Кроличья	HCDR2 AS7B82 по Чотиа	YAGSSSS
54	PRT	Кроличья	HCDR3 AS7B82	ARGLFTSGSGYYIDM

			по IMGT	
55	PRT	Кроличья	HCDR3 AS7B82 по Кабату и Чотиа	GLFTSGSGYYIDM
56	PRT	Кроличья	LCDR1 AS7B82 по IMGT	QSIGSD
57	PRT	Кроличья	LCDR1 AS7B82 по Кабату и Чотиа	QASQSIGSNLA
58	PRT	Кроличья	LCDR2 AS7B82 по IMGT	SAS
59	PRT	Кроличья	LCDR2 AS7B82 по Кабату и Чотиа	GASNLAA
60	PRT	Кроличья	LCDR3 AS7B82 по IMGT	QCTYSSSTGYNA
61	PRT	Кроличья	LCDR3 AS7B82 по Кабату и Чотиа	QRGYISSAVDFV
62	PRT	Искусствен ная	Тяжелая цепь AS7B16	QVTLKESGPGILQPSQTLTLTCSFSGFSLNTSGTG VGWIRQPSGKGLEWLAHIWDDDDKGYNPALK SRLTISKNTSSNLVFLKIASVDTADTATYYCVRI KGRMDYWGGQTSVTVSSKTPPSVYPLAPGSA AQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSS GVHTFPAVLESDLYTLSSSVTPSSPRPSETVTC NVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSS VFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEV QFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSEL PIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISK KGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDF FPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSY FVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNH TEKSLSHSPGK
63	PRT	Искусствен ная	Легкая цепь AS7B16	NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMCKSSQSVLFGS KQKNYLAWYQKPGQSPKLLIYWASTRESGVP DRFTGSGSGTDFILTISNVQAEDLAVYYCHQYLS LFTFGSGTKLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQLTSGG ASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNS WTDQSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCE ATHKTSTSPIVKSFNRNEC
64	PRT	Искусствен ная	Тяжелая цепь AS7B82	QEQQKESGGGLVKPGASLTLTCTASGIDFSSVA YMCWVRQAPGKGLEWIACIYAGSSSIYYASW AKGRFTVSRTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCA RGLFTSGSGYYIDMWPGTLTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

				NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
65	PRT	Искусствен ная	Легкая AS7B82	цепь DVVMTQTPSSVEVAVGGTVTIKCQASQSIGSNL AWYQQKPGQRPKLLIYGASNLAAGVPSRFGSGS SGTQFTLTISDVECADEAATYYCQRGYISSAVDF VFGGGTEVVVKGRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
66	PRT	Искусствен ная	AS7B16 scFv	H-L QVTLKESGPGILQPSQTLTCSFSGFSLNTSGTG VGWIRQPSGKGLEWLAHIWDDDDKGYNPALK SRLTISKNTSSNLVFLKIASVDTADTATYYCVRI KGRMDYWGGQTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSNIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMNCSS QSVLFGSKQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAS TRESGVPDRFTGSGSGTDFILTISNVQAEDLAVY YCHQYLSLFTFGSGTKLEIK
67	PRT	Искусствен ная	AS7B82 scFv	H-L QEQQKESGGGLVKPGASLTLTCTASGIDFSSVA YMCWVRQAPGKGLEWIACIYAGSSSIYYASW AKGRFTVSRSTSTTVLQMTSLTAADTATYFCA RGLFTSGSGYYIDMWGPGTLTVSSGGGGSG GGSGGGGGGGSDVVMQTPSSVEVAVGGT VTIKCQASQSIGSNLAWYQQKPGQRPKLLIYGA SNLAAGVPSRFGSGSGTQFTLTISDVECADEA ATYYCQRGYISSAVDFVFGGGTEVVVKG
68	PRT	Искусствен ная	БКД AS7B16 H- L CAR	H-L QVTLKESGPGILQPSQTLTCSFSGFSLNTSGTG VGWIRQPSGKGLEWLAHIWDDDDKGYNPALK SRLTISKNTSSNLVFLKIASVDTADTATYYCVRI KGRMDYWGGQTSVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSNIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMNCSS QSVLFGSKQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAS TRESGVPDRFTGSGSGTDFILTISNVQAEDLAVY YCHQYLSLFTFGSGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK FSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR
69	PRT	Искусствен ная	БКД AS7B16 L- H CAR	H-L NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMNCSSQSVLFGS KQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVP DRFTGSGSGTDFILTISNVQAEDLAVYCHQYLS LFTFGSGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGG QVTLKESGPGILQPSQTLTCSFSGFSLNTSGTG VGWIRQPSGKGLEWLAHIWDDDDKGYNPALK SRLTISKNTSSNLVFLKIASVDTADTATYYCVRI KGRMDYWGGQTSVTVSSTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK

				RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR
70	PRT	Искусствен ная	БКД AS7B82 H- L CAR	QEQQKESGGGLVKPGASLTLTCTASGIDFSSVA YMCWVRQAPGKGLEWIAICIYAGSSSIYYASW AKGRFTVSRSTTVTLQMTSLTAADTATYFCA RGLFTSGSGYYIDMWGPGTLTVSSGGGGSG GGSGGGGGGGGGSDVVMQTTPSSVEVAVGGT VTIKCQASQSIGSNLAWYQQKPGQRPKLLIYGA SNLAAGVPSRFSGSGSGTQFTLTISDVECADAAT YYCQRGYISSAVDFVFGGGTEVVVKGTTTPAP RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGR KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQ GLSTATKDTYDALHMQALPPR
71	PRT	Искусствен ная	БКД AS7B82 L- H CAR	DVVMQTTPSSVEVAVGGTVTIKCQASQSIGSNL AWYQQKPGQRPKLLIYGASNLAAGVPSRFSGSG SGTQFTLTISDVECADAATYYCQRGYISSAVDF VFGGGTEVVVKGGGGGGGGGGSGGGGGSGGG GSEQQKESGGGLVKPGASLTLTCTASGIDFSSVA YMCWVRQAPGKGLEWIAICIYAGSSSIYYASW AKGRFTVSRSTTVTLQMTSLTAADTATYFCA RGLFTSGSGYYIDMWGPGTLTVSSSTTPAPRPP TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLL YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR
72	PRT	Искусствен ная	БКД AS7B91 H- L CAR	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSTSVMG WVRQAPGKGLSIGFIYTNVNTYYASWAKGRF TISRSTTVDLKITSPTTGDATYFCARAVYAGA MDLWGQGLTVTVSSGGGGGGGGGGSGGGGGSGG GGSDVVMQTTPASVSGPVGGTVTIKCQASERIY SNLAWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASGVSSRFK GSGSGTEFTLTIRDLECADAATYSCQYTSYSGS YVGTFFGGTEVVVEG
73	PRT	Искусствен ная	БКД AS7B91 L- H CAR	DVVMQTTPASVSGPVGGTVTIKCQASERIYSNL AWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASGVSSRFKSGS SGTEFTLTIRDLECADAATYSCQYTSYSGSYVG TFGGGTEVVVEGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG LEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSTSVMGW VRQAPGKGLSIGFIYTNVNTYYASWAKGRFTI SRTSTTVDLKITSPTTGDATYFCARAVYAGAM DLWGQGLTVTVSS
74	PRT	Искусствен ная	VH AS7B16	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLNTSGTG VGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKGYNPALK SRLTISKNTSSNLVFLKIASVDTADTATYYCVRI

				KGRMDYWGGTSTVTVSS
75	PRT	Искусствен ная	VL AS7B16	NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMNCSSQSVLFGS KQKNYLAWYQKPGQSPKLLIYWASTRESGVP DRFTGSGSGTDFILTISNVQAEDLAVYYCHQYLS LFTFGSGTKLEIK
76	ДН К	Искусствен ная	VH AS7B16	AGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATA TTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGACTTG TTCTTTCTCTGGGTTTTCTACTGAACACTTCTGG TACGGGTGTAGGCTGGATTTCGTCAGCCTTCAG GGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTG GTGGGATGATGACAAGGGGTATAACCCAGCC CTGAAGAGCCGACTGACAATCTCAAAAAACA CCTCCAGCAACCTGGTATTCCTCAAGATCGCC AGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATATTA CTGTGTTTGAATCAAAGGCCGGATGGACTACT GGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
77	ДН К	Искусствен ная	VL AS7B16	AACATTATGATGACACAGTCGCCATCCTCTCT GGCTGTGTCTGCAGGAGAAAAGTCACTATG AACTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTTTTATTCGG TTCAAAACAGAAGAATAATTTGGCCTGGTACC AGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAATTGCT GATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTG TCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGG ACAGATTTTACTTACCATCAGCAATGTACA AGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCATC AATACCTCTCCCTATTCACGTTTCGGCTCGGG ACAAAGTTGGAAATAAAA
78	PRT	Искусствен ная	VH AS7B82	QEQKESGGGLVKPGASLTLTCTASGIDFSSVA YMCWVRQAPGKGLEWIACIYAGSSSIYASW AKGRFTVSRSTSTVTLQMTSLAADTATYFCA RGLFTSGSGYYIDMWGPGLVTVSS
79	PRT	Искусствен ная	VL AS7B82	DVVMTQTPSSVEVAVGGTVTIKQASQSIGSNL AWYQKPGQRPKLLIYGASNLAAGVPSRFSGSG SGTQFTLTISDVECADAAATYYCQRGYISSAVDF VFGGGTEVVVKG
80	ДН К	Искусствен ная	VH AS7B16	CAGGAGCAGCAGAAGGAGTCCGGGGGAGGCC TGGTCAAGCCTGGGGCATCCCTGACACTCACC TGCACAGCTTCTGGAATCGACTTCAGTAGTGT CGCTACATGTGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAG GGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATGCATTTA TGCTGGTAGTAGTAGTAGCATCTACTACGCGA GCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCGTCTCCAG AACCTCGTCTACCACGGTGACTCTGCAAATGA CCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTA TTTCTGTGCGAGAGGTCTATTTACTAGTGGTA GTGGATATTATATAGACATGTGGGGCCAGG CACCTGGTCACCGTCTCCTCA
81	ДН К	Искусствен ная	VL AS7B16	GATGTCGTGATGACCCAGACTCCATCCTCTGT GGAGGTAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATC AAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTGGTAGTA ATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCA GCGTCCCAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCA
				ATCTGGCCGCTGGGGTCCCATCGCGGTTCACT GGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACCTCAC CATCAGCGACGTGGAGTGTGCCGATGCTGCC ACTTACTACTGTCAACGGGGTTATATTAGCAG TGCTGTTGATTTTTTTGTTTTTCGGCGGAGGGA CCGAGGTGGTGGTCAAAGGT

ССЫЛКИ.

- Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York
- Bardenheuer et al., *Leukemia*. 2005 Dec;19(12):2281-8
- Barnes et al, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980)
- Bork and Doolittle, *PNAS USA* 89:8990-8992, 1992
- Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987)
- Chothia et al., "Conformations of Immunoglobulin Hypervariable Regions," I 342:877 (1989)
- Connell, *Curr Opin Biotechnol.* 2001 (5):446-9
- Ham et al, *Meth. Enz.* 58:44 (1979)
- Holt et al; *Trends Biotechnol.* 2003 Nov.; 21(11):484-90
- Jacobs et al., *Protein Engineering, Design, and Selection*, 25:107-117, 2012
- Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed. NIH Publication No. 91-3242 (1991)
- Kushman et al., *Carcinogenesis*. 2007 Jan;28(1):207-14
- Luckow and Summers, *Bio/Technology*, 6:47, 1988
- Makrides et al. *Microbiol Rev.* 1996 60(3):512-38
- Mayfield et al., *PNAS USA*. 2003 100(2):438-42
- MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262:732 (1996)
- Martin and Thornton, *J. Mol. Biol.* 263:800 (1996)
- Meinke et al., *J Bacteriol* 175:1910-1918, 1993
- E. Meyers and W. Miller, *Comput. Заявк. Biosci* 4, 11-17 (1988)
- Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 444-453 (1970)
- Nivens et al, *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004 Feb;53(2):107-15
- Patel et al., *Gene Therapy*, 1999; 6: 412-419
- Reverts et al; *Expert Opin Biol Ther.* 2005 Jan.; 5(1):111-24
- Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 ed., 1989
- Sharp et al. *Yeast*. 1991 7(7):657-78.
- Sinclair et al. *Protein Expr Purif.* 2002 (1):96-105 *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL
- Sugimoto et al, *J Gene Med.* 2003 May;5(5):366-76
- Takebe et al., *Mol Ther.* 2001 Jan;3(1):88-96
- Ward et al., *Nature* 341, 544-546 (1989)),

Watanabe et al., J Biol Chem 265:15659-15665, 1990
Zielske et al., J Clin Invest. 2003 Nov;112(10):1561-70
US2010/0216708
US2013/0226834
US2011/0274623
US4767704
US4657866
US4927762
US4560655
US5122469
WO90/03430
WO87/00195
USRE30985
WO 2013/176915
WO2014/130635
WO2013/176916
WO2013/176915
WO2014/039523
WO2014/184741
WO2014/191128
WO2014/184744
WO2014/184143
US6352694
US6534055
US6905680
US6692964
US5858358
US6887466
US6905681
US7144575
US7067318
US7172869
US7232566
US7175843
US5883223
US6905874
US6797514
US6867041
US2006/121005
US6040177
US5827642
WO2012129514

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий

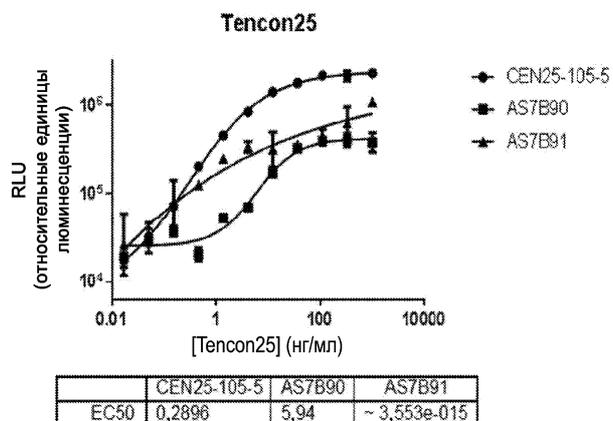
(а) внеклеточный домен, включающий scFv, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72 или 73; причем внеклеточный домен специфически связывается с нерандомизированной областью домена FN3;

(б) трансмембранный домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25;

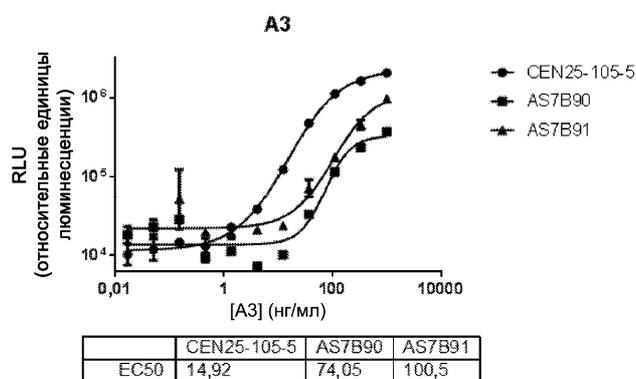
(в) внутриклеточный сигнальный домен, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и первичный сигнальный домен, который содержит аминокислотную последователь-

ность SEQ ID NO: 27,

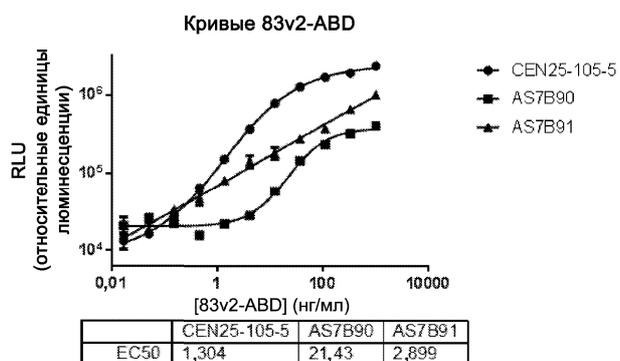
где CAR дополнительно включает шарнирную область, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, связывающую внеклеточный домен и трансмембранный домен.



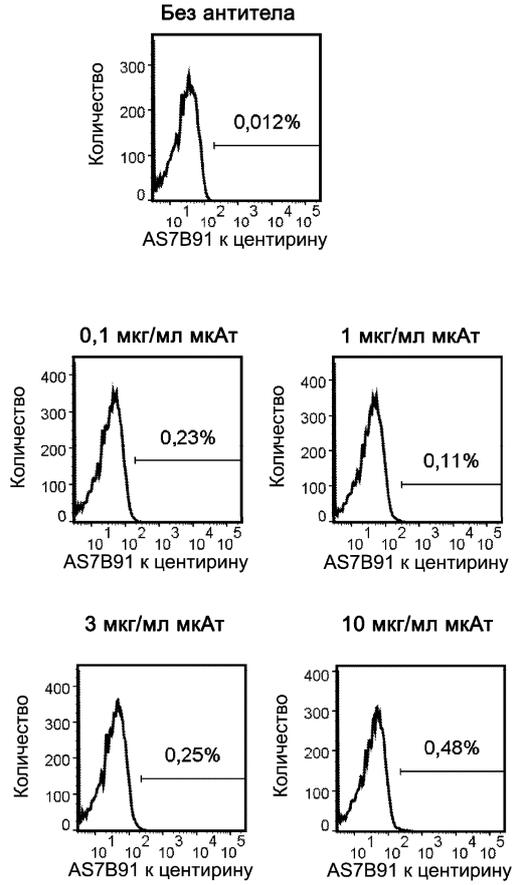
Фиг. 1А



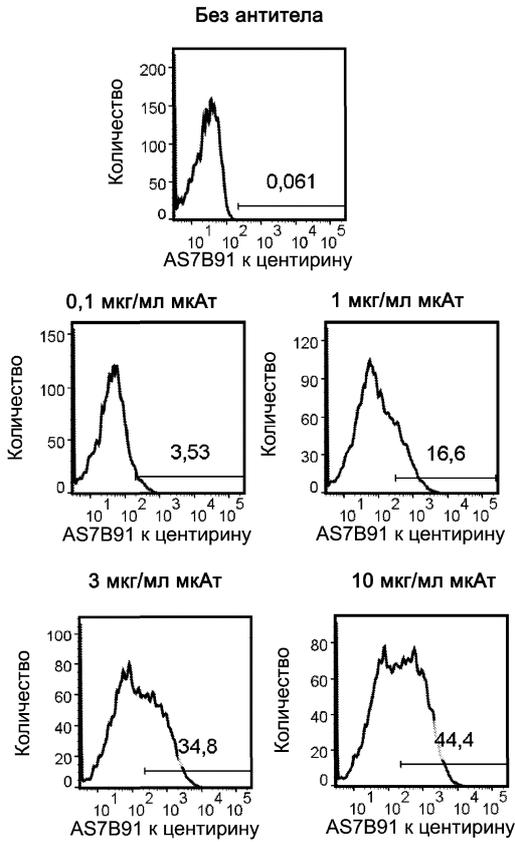
Фиг. 1В



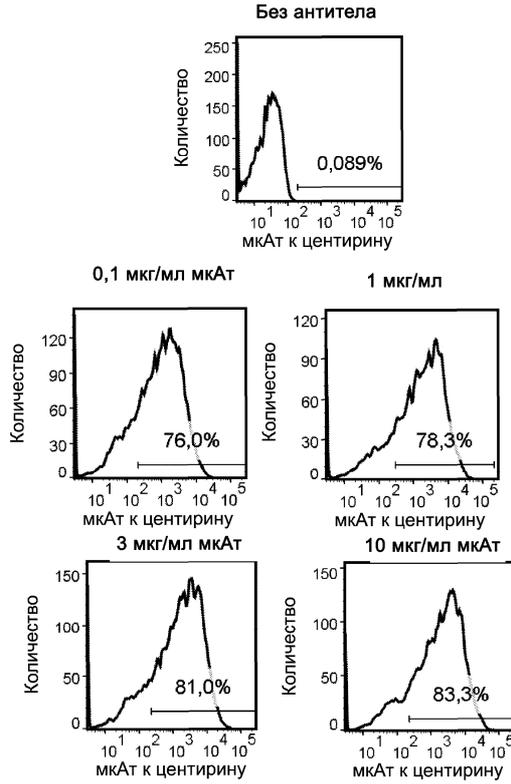
Фиг. 1С



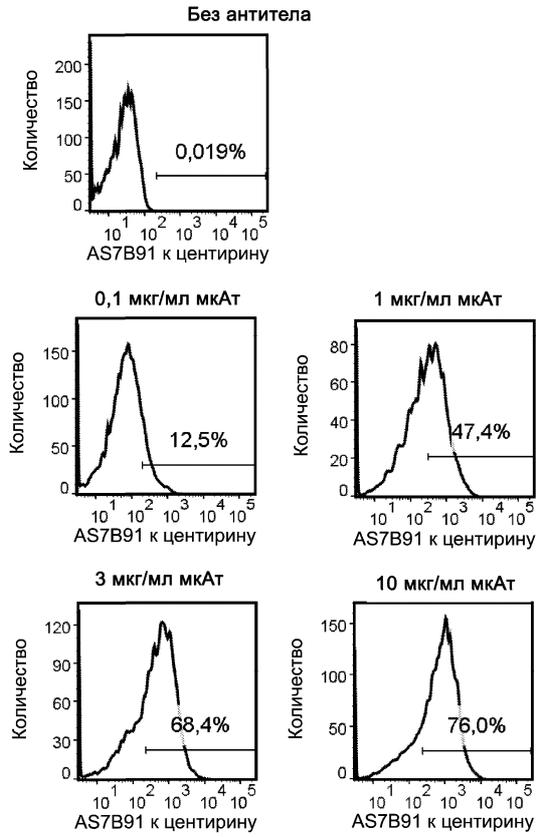
Фиг. 2А (ЕР-контроль)



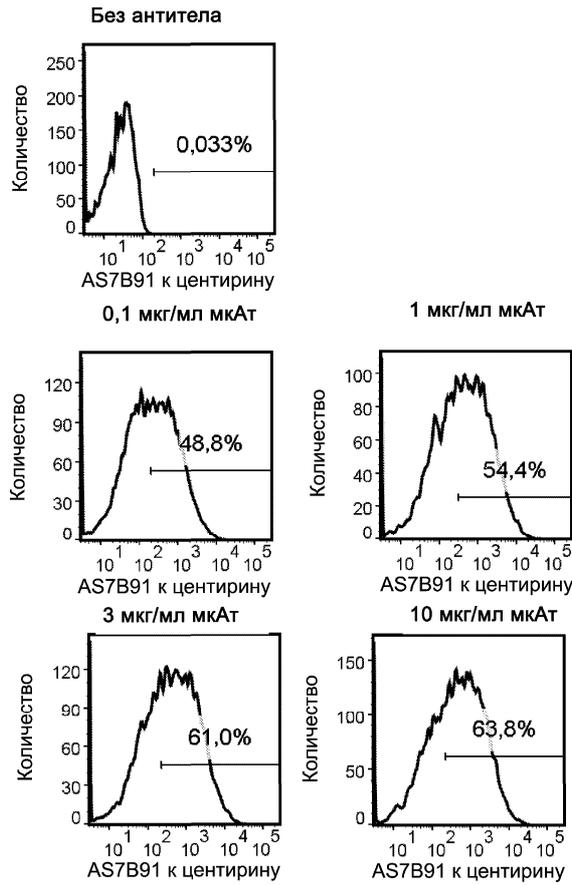
Фиг. 2В (АО8)



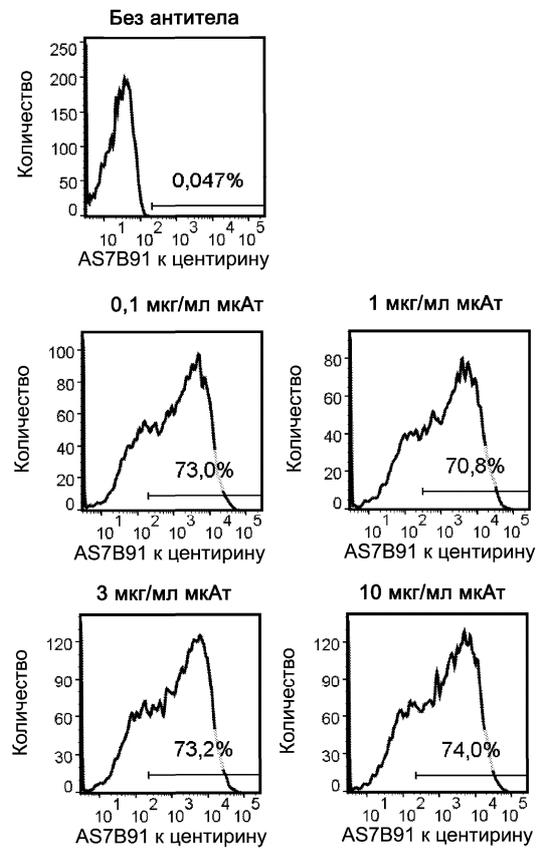
Фиг. 2С (А12)



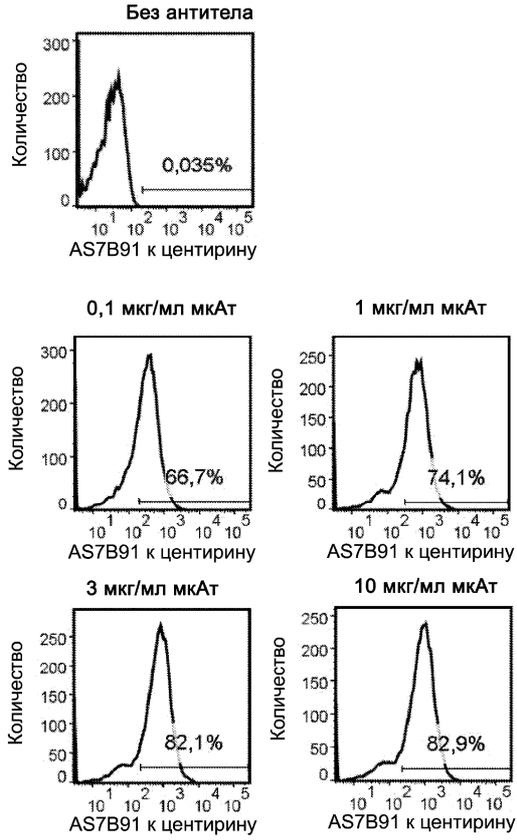
Фиг. 2D (B03)



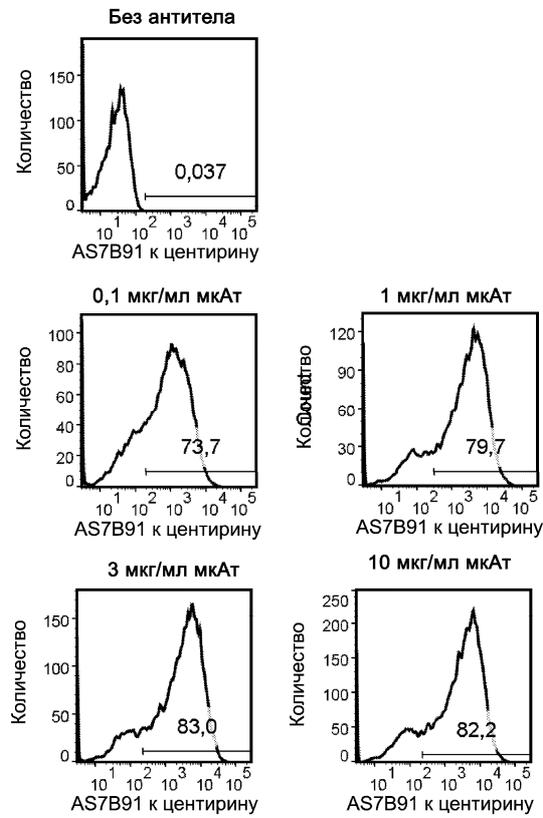
Фиг. 2Е (СО8)



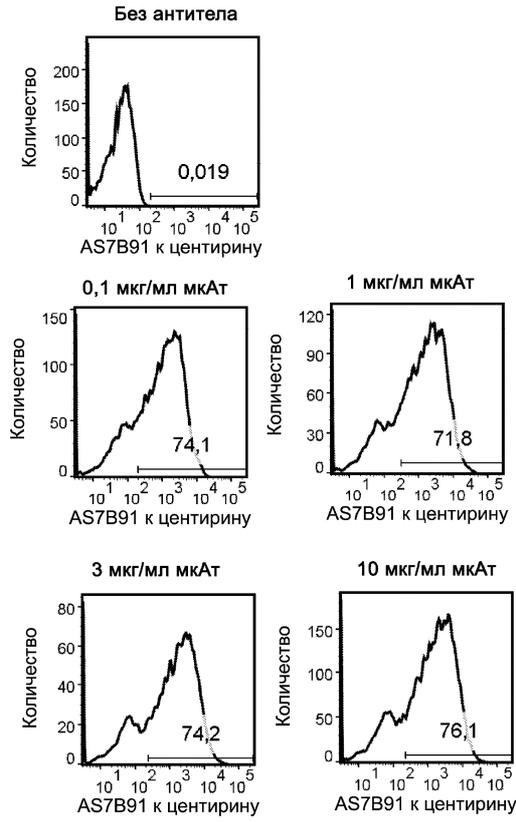
Фиг. 2F (DO8)



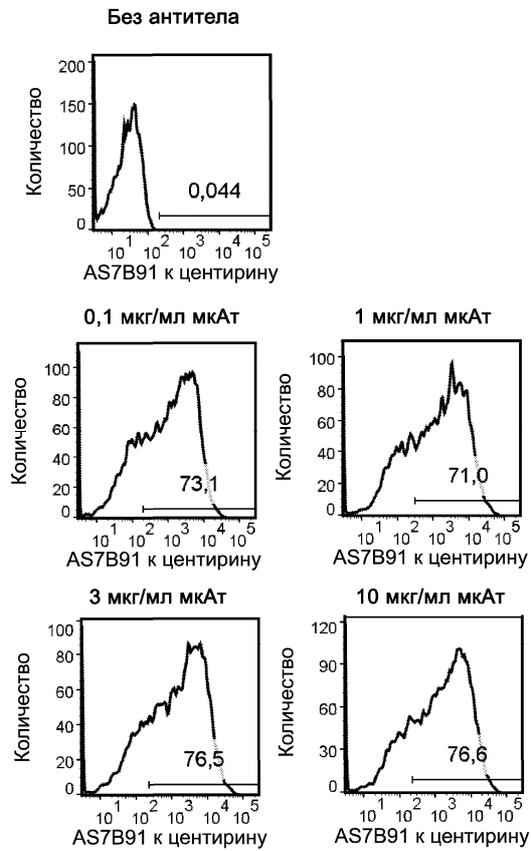
Фиг. 2G(D10)



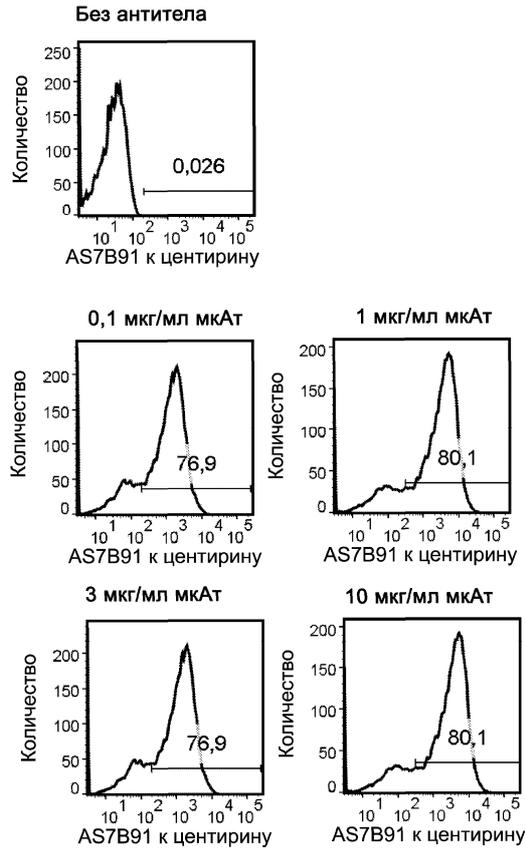
Фиг. 2H (EO2)



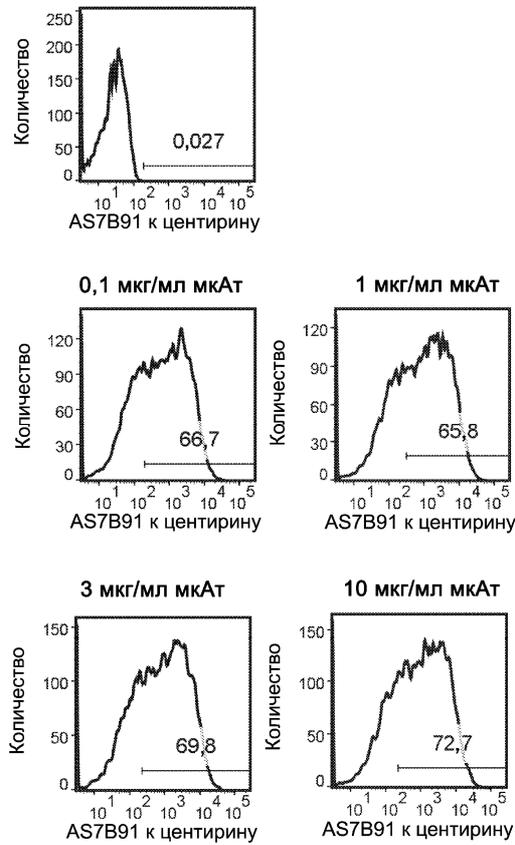
Фиг. 2I (EO9)



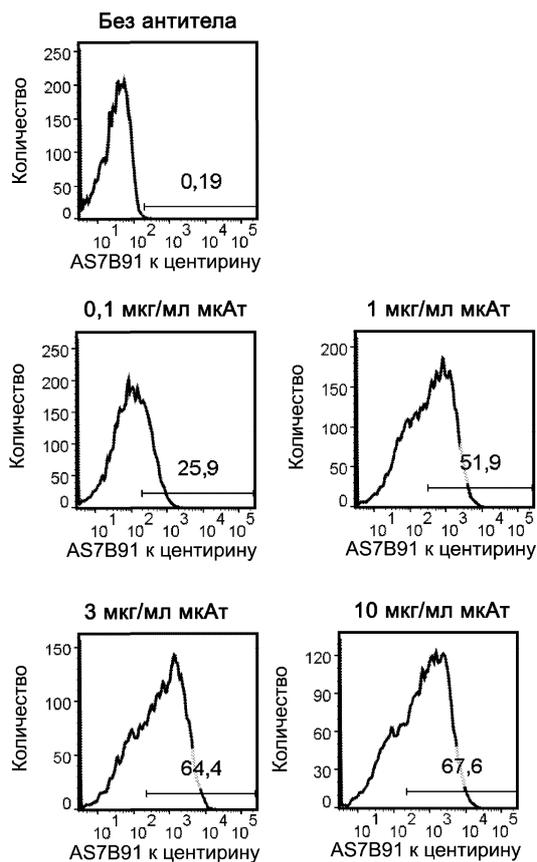
Фиг. 2J (FO1)



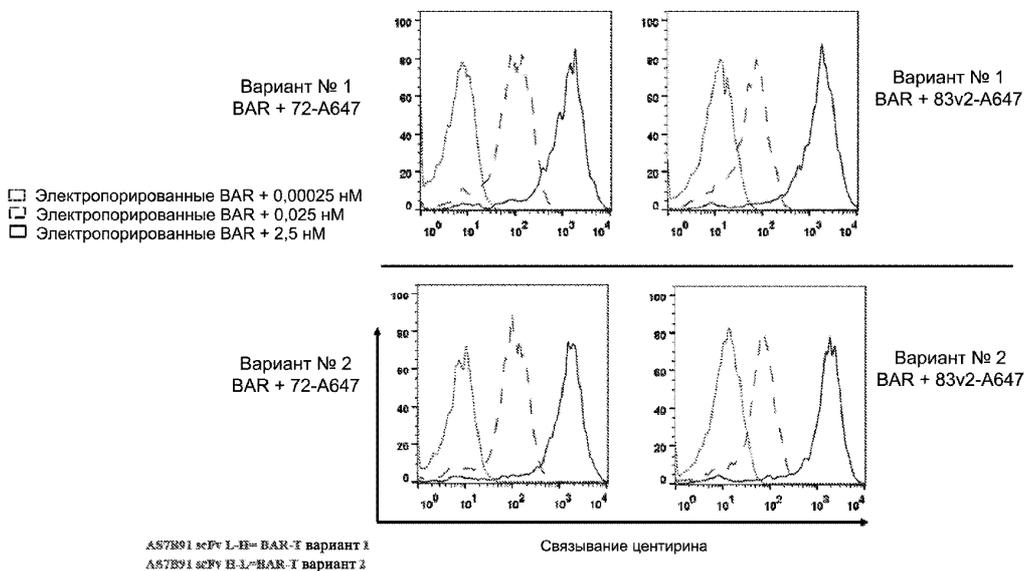
Фиг. 2К(F11)



Фиг. 2Л(G10)

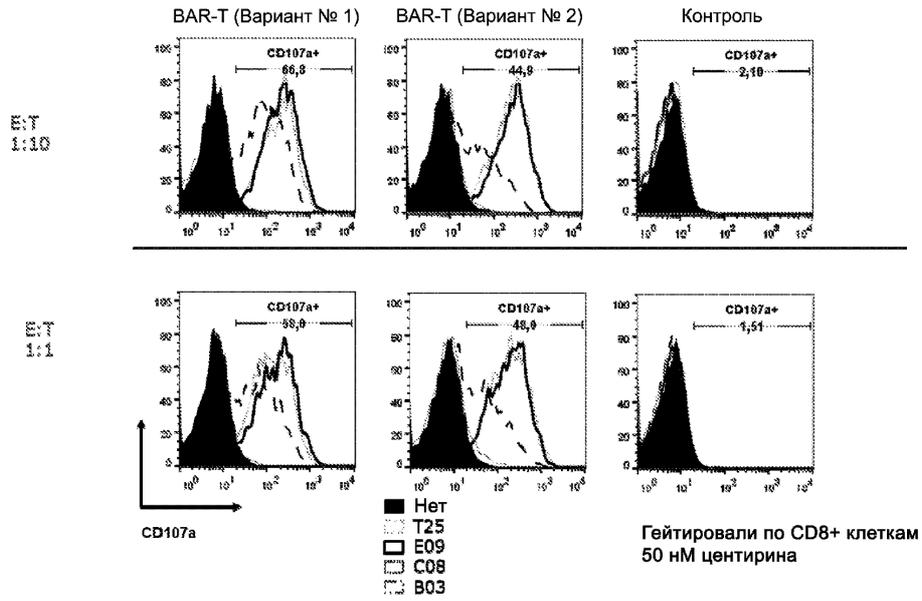


Фиг. 2М (D08-89)



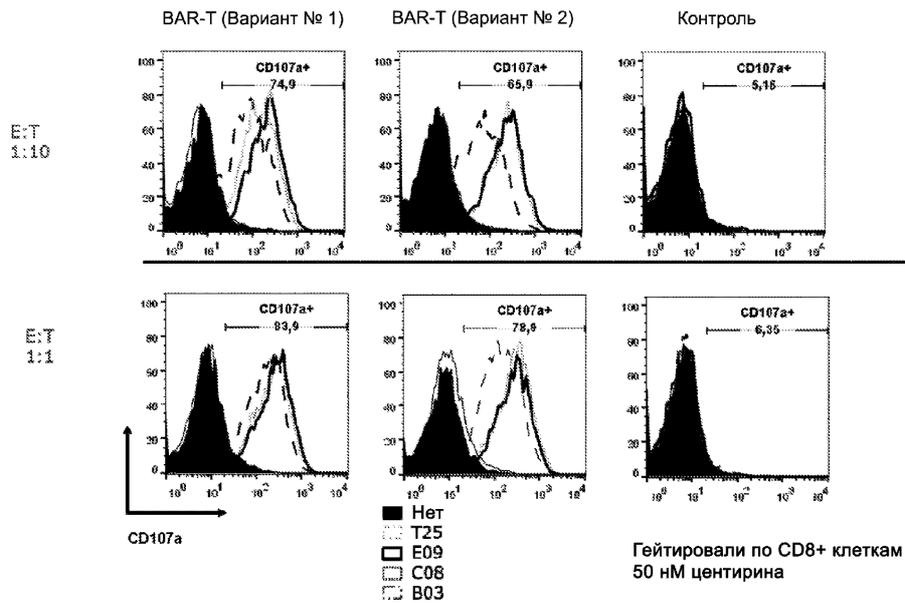
Фиг. 3

Клетки H929 (VCMA^{hi})



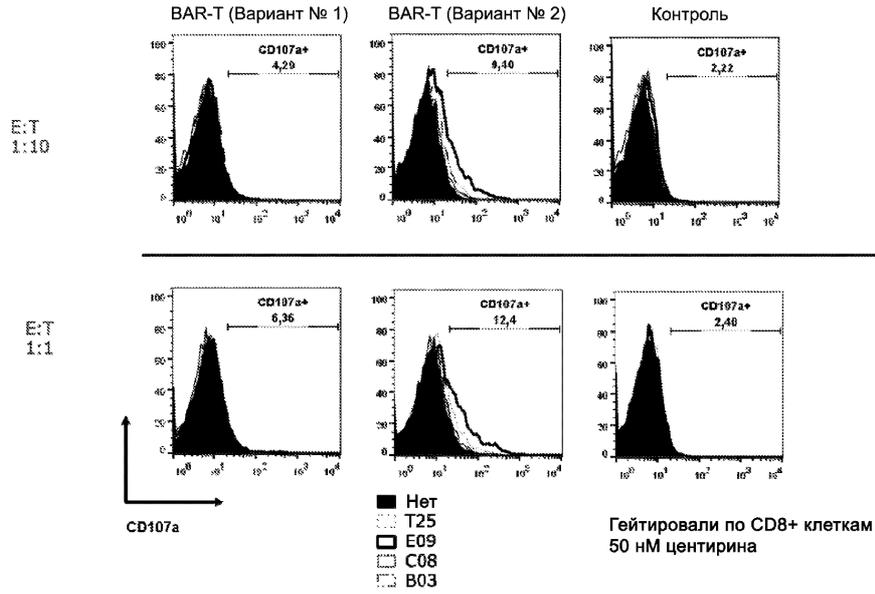
Фиг. 4А

Клетки ARH77 (VCMA^{lo})



Фиг. 4В

Клетки K562 (BCMA^{отриц})

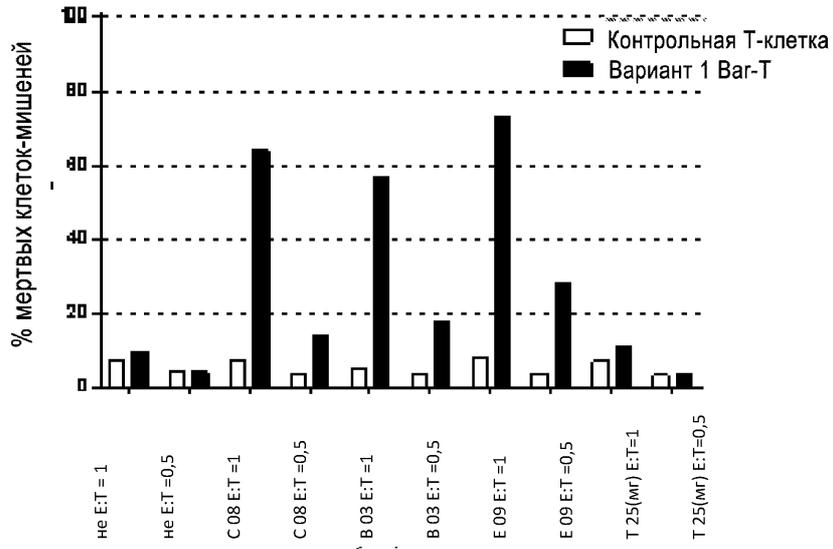


Фиг. 4С

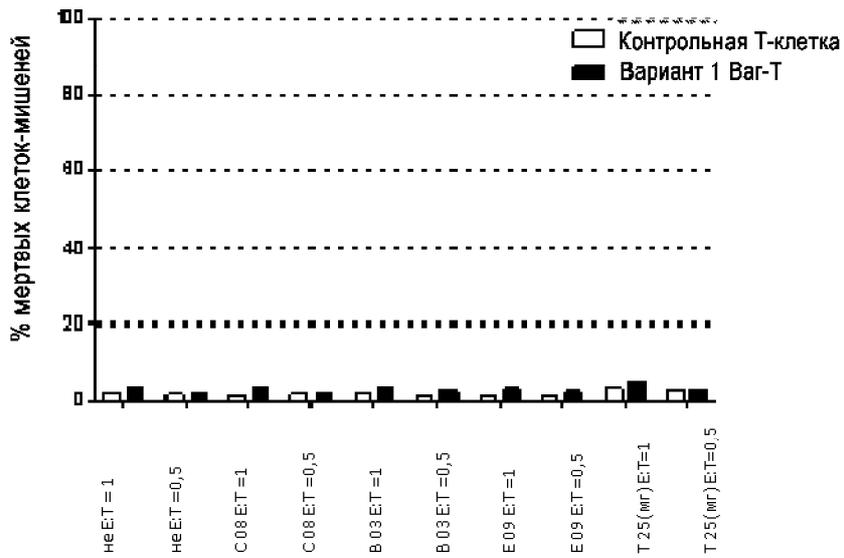
Клетки-мишени H929
Контрольная Т-клетка по сравнению с вариантом 1 BART



Клетки-мишени ARH77
Контрольная Т-клетка по сравнению с вариантом 1 Bar-T

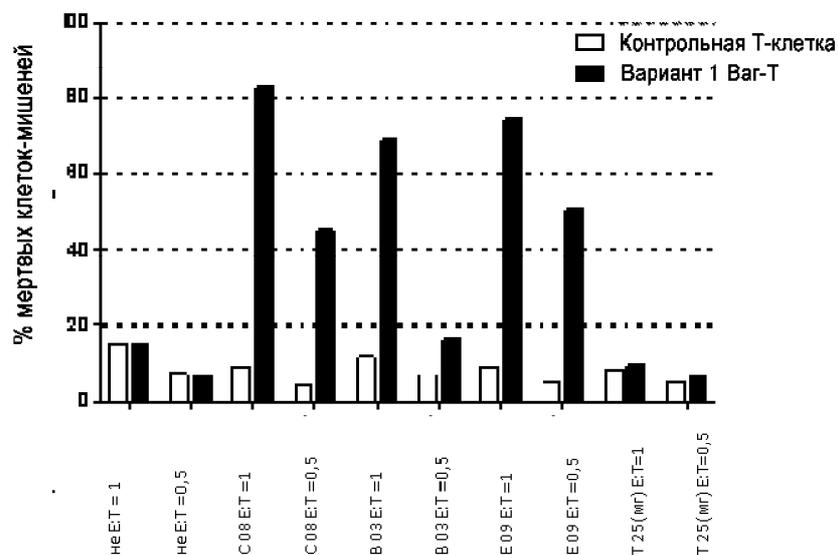


Клетки-мишени K562
Контрольная Т-клетка по сравнению с вариантом 1 Bar-T



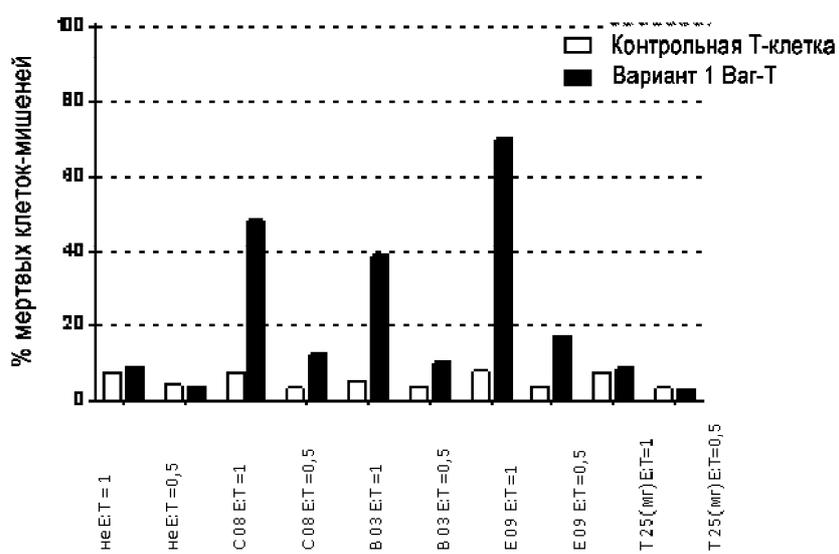
Центирин, соотношение Е: Т

Клетки-мишени H929
Контрольная Т-клетка по
сравнению с вариантом 2 BART



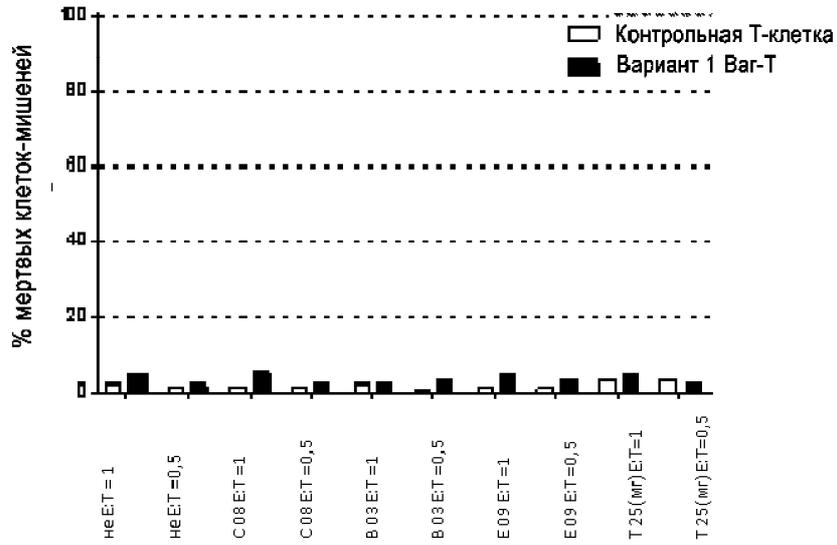
Центрин, соотношение E: T

Клетки-мишени ARH77
Контрольная Т-клетка по
сравнению с вариантом 2 BART



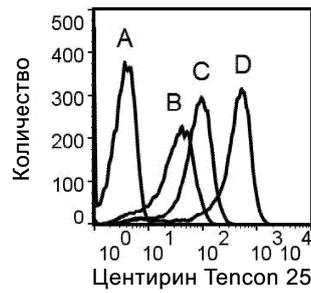
Центрин, соотношение E: T

Клетки-мишени K562
Контрольная Т-клетка по
сравнению с вариантом 2 BART



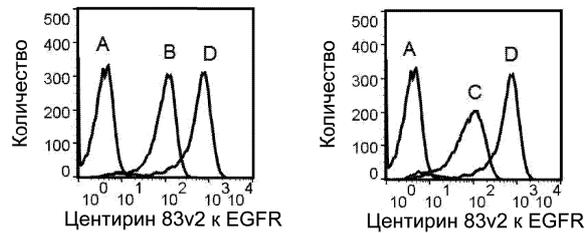
Центириин, соотношение E: T

Фиг. 5



- A. Без CAR
- B. AS7B16 L2H scFv CAR
- C. AS7B16 H2L scFv CAR
- D. AS7B91 H2L scFv CAR

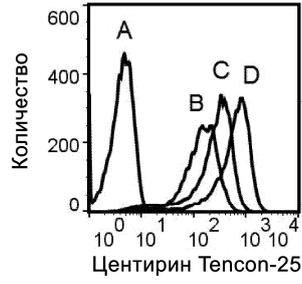
Фиг. 6



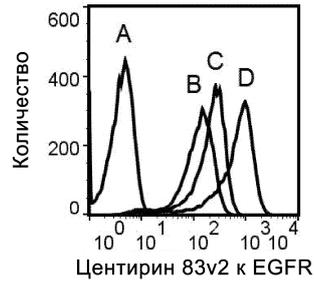
- A. Без CAR
- B. AS7B16 L2H scFv CAR
- C. AS7B16 H2L scFv CAR
- D. AS7B91 H2L scFv CAR

Фиг. 7

044007



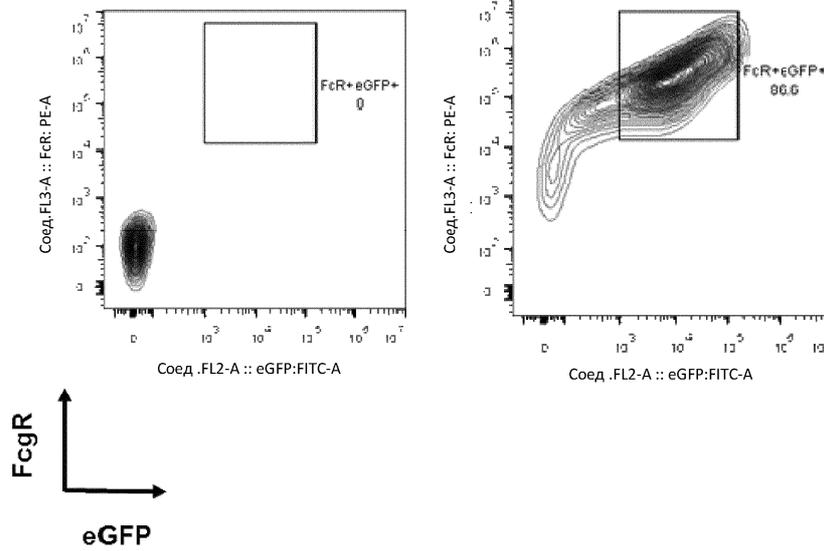
A. Без CAR
B. AS7B82 L2H scFv CAR
C. AS7B82 H2L scFv CAR
D. AS7B91 H2L scFv CAR
Фиг. 8

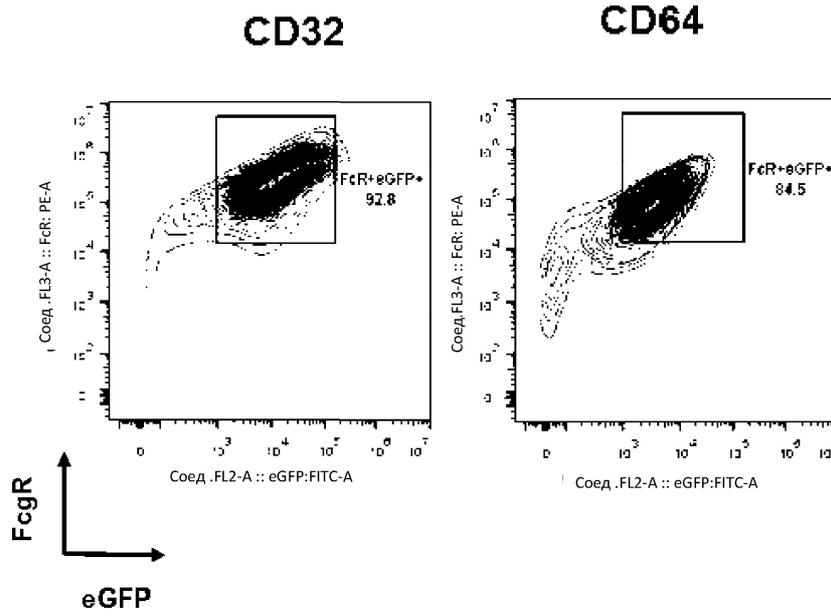


A. Без CAR
B. AS7B8 L2H scFv CAR
C. AS7B82 H2L scFv CAR
D. AS7B91 H2L scFv CAR
Фиг. 9

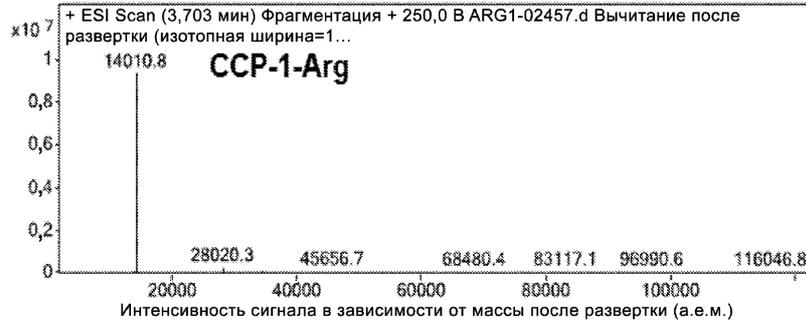
Исходное

CD16a

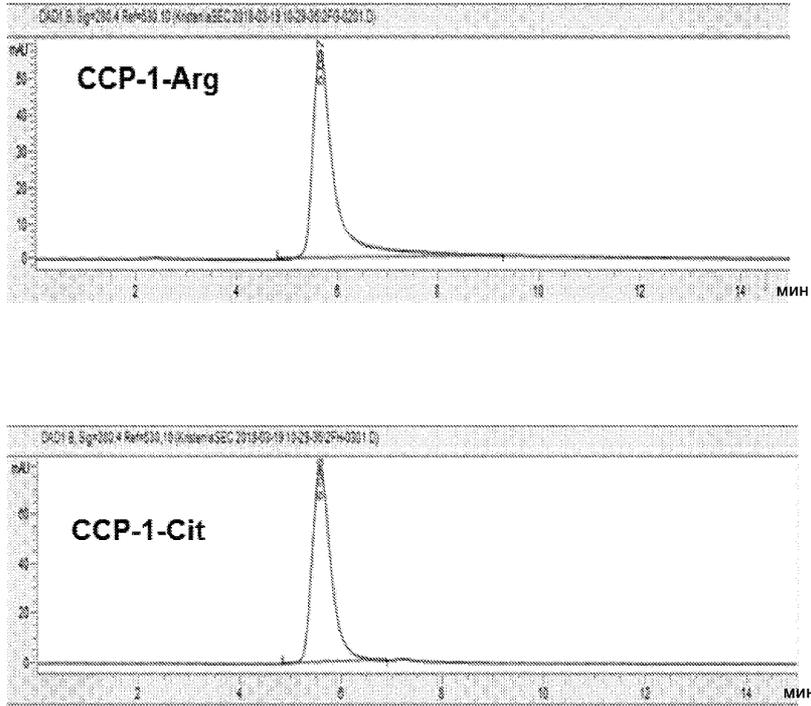




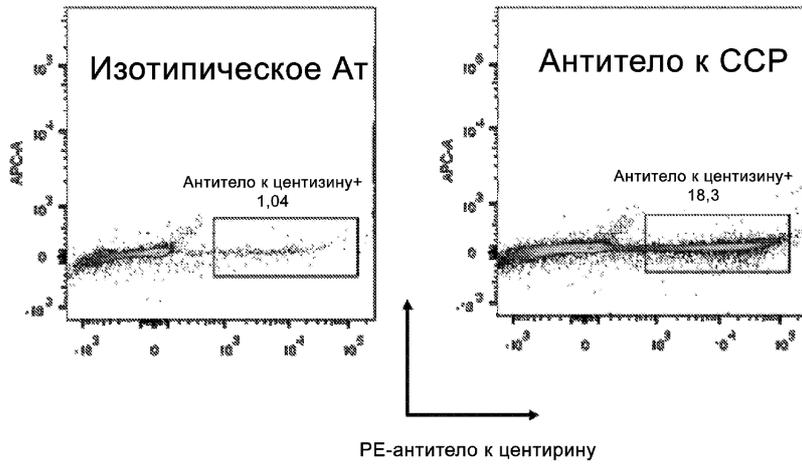
Фиг. 10



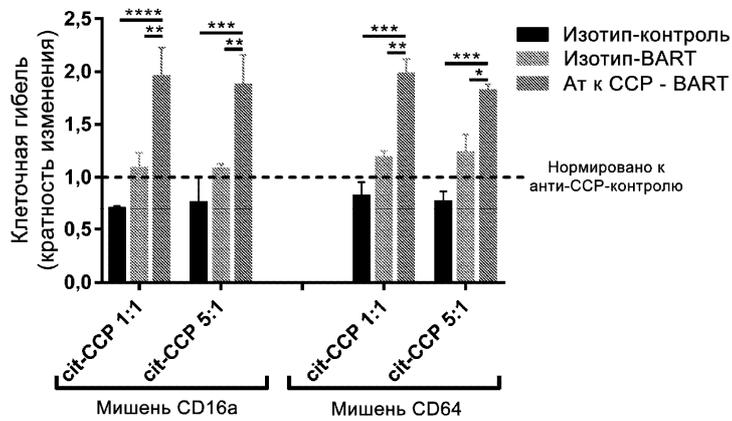
Фиг. 11А



Фиг. 11В

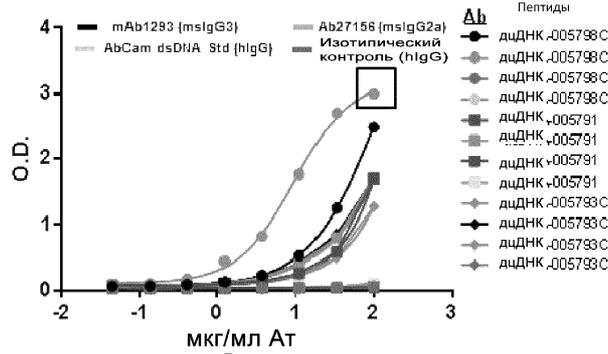


Фиг. 12



Фиг. 13

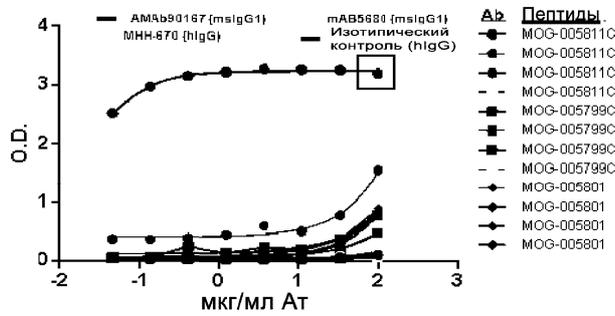
связывание Ат к дцДНК с пептидами



dsDNA-005798C – Asp-Trp-Glu-Tyr-Ser-Val-Trp-Leu-Ser
 dsDNA-005791C – Ala-Ser-Pro-Val-Thr-Ala-Arg-Val-Leu
 dsDNA-005793C – Arg-Leu-Thr-Ser-Ser-Leu-Arg-Tyr-Asn

Фиг. 14А

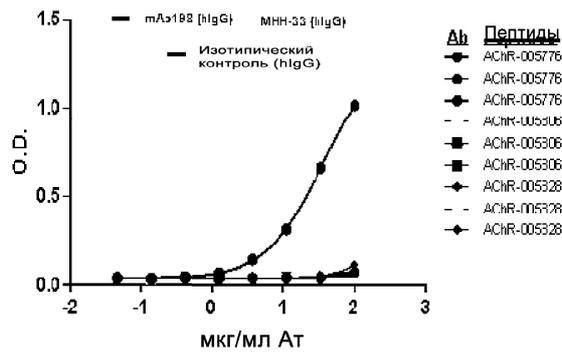
Связывание Ат к МОГ с пептидами



MOG-005811C – Met-Glu-Val-Gly-Trp-Tyr-Arg-Pro
 MOG-005799C – Ala-Gly-Gln-Phe-Leu-Glu-Glu-Arg
 MOG-005801C – Tyr-Arg-Pro-Pro-Phe-Ser-Arg-Val-Val

Фиг. 14В

Связывание Ат к АСhR с пептидами



AChR-005776C – Pro-Met-Thr-Leu-Pro-Glu-Asn-Tyr-Phe
 AChR-005806C – Trp-Asn-Pro-Asp-Asp-Tyr-Gly-Gly-Ile
 AChR-005838C – Lys-Lys-Gly-Trp-Lys-His-Trp-Val-Tyr

Фиг. 14С



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2