(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202392023 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.24

(22) Дата подачи заявки
2022.01.28

(51) Int. Cl. ***A61K 38/00*** (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
C07K 14/045 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **2101228.1**
(32) **2021.01.29**
(33) **GB**
(86) **PCT/EP2022/052130**
(87) **WO 2022/162192 2022.08.04**
(88) **2022.09.15**

(71) Заявитель:
ТЕЛПЕР АС (NO)

(72) Изобретатель:
Ветвик Катя (NO)

(74) Представитель:
Билык А.В., Поликарпов А.В., Соколова М.В., Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Дмитриев А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) В настоящем изобретении представлены связывающие молекулы, имеющие одно или несколько (предпочтительно все) из высокоспецифического связывания с белком US28 цитомегаловируса человека (HCMV), очень низких уровней неспецифического связывания с нормальными (неинфицированными) клетками и/или способности к агностическому в отношении штамма связыванию, а также молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие указанные связывающие молекулы. Связывающие молекулы предназначены для связывания с внеклеточным доменом 3 (ECD3) белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV), третьим из четырех внеклеточных доменов, презентируемых US28, что соответствует положениям 167-183 белковой последовательности US28, как определено SEQ ID NO: 5. Было продемонстрировано, что связывающие молекулы по настоящему изобретению имеют превосходные связывающие свойства, включая особую специфичность связывания в отношении агрессивных и/или метастазирующих инфицированных HCMV различных видов рака, включая различные виды рака молочной железы. В определенных предпочтительных вариантах осуществления связывающая молекула выбрана из антитела (включая, например, антитело BiTE) и химерного антигенного рецептора (CAR) или их функциональных вариантов, фрагментов, слитых белков и/или конъюгатов. Также представлены клетки, экспрессирующие указанные связывающие молекулы, такие как CAR-экспрессирующие клетки, включая CAR-T-клетки, CAR-NK-клетки и CAR-M-клетки.



202392023 A1

202392023 A1

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Область техники

Настоящее изобретение относится к области вирусологии. Более конкретно, настоящее изобретение относится к терапевтическим и диагностическим средствам, нацеленным на конкретную область белка US28, кодируемого цитомегаловирусом человека (HCMV), и связанным с ним видам терапии, включая без ограничения различные виды инфицированного HCMV рака и другие состояния, ассоциированные с латентными или литическими инфекциями HCMV.

Список литературных источников

Перечисление или обсуждение явно ранее опубликованного документа в настоящем описании не обязательно должно восприниматься как признание того, что документ является частью уровня техники или является общеизвестным. Раскрытые ссылки в той мере, в какой они предоставляют иллюстративные процедурные или другие детали, дополняющие изложенные в данном документе, специально включены в данный документ посредством ссылки.

Уровень техники

Цитомегаловирус человека (HCMV), также известный как вирус герпеса человека 5 типа (HHV-5), представляет собой универсальный условно-патогенный ДНК-вирус, переносимый 56-94% населения во всем мире (Geisler *et al*, *Cancers*, 2019, **11**: 1842; Zuhair *et al*, *Rev Med Virol*, 2019. **29**(3): p. e2034).

У большинства иммунокомпетентных индивидуумов инфекции HCMV протекают бессимптомно, остаются недиагностированными и считаются безвредными, поскольку репликация вируса в достаточной степени контролируется иммунной системой хозяина (Boeckh and Geballe, J Clin Invest, 2011. **121**(5): p. 1673-80).

Подобно всем герпесвирусам, после первичной инфекции HCMV персистирует в течение всей жизни в виде латентной инфекции. Латентная инфекция характеризуется низким уровнем репликации вируса или его отсутствием, при этом вирусный геном находится преимущественно в популяции $CD34^+$ гемопоэтических клеток-предшественников , находящихся в костном мозге (Collins-McMillen *et al*., *Viruses*, 2018. **10**(8)).

Предполагается, что латентный HCMV может периодически реактивироваться стохастическим образом, если только иммунная система хозяина не контролирует его постоянно. По этой причине вирус может вызывать осложнения при определенных обстоятельствах, например, у пациентов с ослабленным иммунитетом, у которых не только первичная инфекция HCMV, но и реинфекция или реактивация могут вызывать опасное для жизни заболевание, которое поражает многие органы, вызывая значительную заболеваемость и смертность. (Boeckh and Geballe, см. выше; Griffiths *et al*, *J Pathol*, 2015. **235**(2): p. 288-97).

HCMV является одной из наиболее распространенных врожденных вирусных инфекций и наиболее важной причиной врожденных дефектов (Davis *et al*, *Birth Defects Res*, 2017. **109**(5): p. 336-346). Становится все более очевидным, что инфицирование HCMV на протяжении всей жизни может также играть роль в патогенезе атеросклероза, аутоиммунных заболеваний и некоторых злокачественных новообразований, в частности, мультиформной глиобластомы (Soderberg-Naucler, *J Intern Med*, 2006, **259**(3): p. 219-46; Cobbs, Curr Opin Virol, 2019. **39**: p. 49-59). Серостатус HCMV может дополнительно влиять на клиническое течение ожогов, травмы и сепсиса (Soderberg-Naucler, 2006, см. выше; Limaye, *et al*, *JAMA*, 2008. **300**(4): p. 413-22; Osawa & Singh, *Crit Care*, 2009. **13**(3): p. R68).

Латентная инфекция HCMV может реактивироваться во время воспалительного процесса, когда клетки-предшественники дифференцируются в моноциты/инфильтрирующие макрофаги или дендритные клетки (DC), и эти клетки могут распространять вирус в периферические органы (Soderberg-Naucler *et al*, *Cell*, 1997, **91**: 119–126). Реактивированный HCMV, переносимый этими воспалительными клетками, может достигать всех тканей организма, инфицировать и размножаться в большом количестве типов клеток (Ljungman *et al.*, *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, 2010, **24**: 319–337). Инфекция далее передается всеми жидкостями организма, включая слюну и грудное молоко (Hamprecht *et al.*, *Lancet*, 2001, **357**: 513–518). Девяносто процентов образцов грудного молока от HCMV серопозитивных женщин содержат вирус, что приводит к приблизительно 30% распространенности HCMV среди детей в возрасте одного года. Таким образом, уход за больными и контакт с родителями составляют важный путь к заражению инфекцией HCMV в раннем младенчестве или детстве (Hamprecht *et al.*, 2001, см. выше).

Геном цитомегаловируса и генетическое разнообразие

Как обсуждалось в Berg *et al*, 2019, PLoS ONE **14**(9): e0222053, геном CMV состоит из однокомпонентной линейной двухцепочечной ДНК и имеет размер примерно 235 т.п.н. Он содержит более 750 транслируемых ORF (Stern-Ginossar *et al.*, *Science*, 2012, **338**(6110):1088–93), которые можно разделить на две области, уникальные длинные (UL) и уникальные короткие (US) области, фланкированные терминальными и внутренними инвертированными повторами.

Цитомегаловирус адаптировал широкий спектр стратегий для избежания иммунного обнаружения и облегчения распространения инфекции. Эти стратегии основаны на манипулировании и модулировании иммунного ответа хозяина во время инфекции, т.е. путем экспрессии кодируемых вирусом гомологов рецепторов и лигандов, важных для нормальной функции иммунной системы человека. Кодируя в 2-3 раза большее количество генных продуктов, чем другие герпесвирусы человека, многие из которых, как было показано, взаимодействуют с иммунной системой человека и манипулируют ею (Mocarski, *Trends Microbiol.*, 2002; **10**(7):332–9), CMV имеет беспрецедентное количество инструментов для изменения иммунного ответа хозяина.

Генетическая вариация между циркулирующими штаммами CMV велика, и в недавнем исследовании было описано, что 75% штаммов содержат деструктивные мутации и полиморфизмы в нескольких генах (Sijmons *et al.*, *J. Virol.*, 2015, 89(15): 7673-7695). Для исключения деструктивных мутаций вследствие серийного пассирования, авторы исследования использовали только штаммы, пассированные 1-2 раза, и верифицировали большинство наблюдаемых мутаций непосредственно из клинических образцов. Для генов UL40 и UL111A мутации, вызывающие функциональные нокауты, были обнаружены у 9,9% и 5,5% исследованных штаммов соответственно (Sijmons *et al.*, 2015, см. выше). UL111A представляет собой функциональный гомолог интерлейкина-10, который может ингибировать нормальный иммунный ответ (Mocarski, 2002, см. выше; Engel and Angulo, *Adv Exp Med Biol.*, 2012, **738**:256–76). Сигнальный пептид UL40 облегчает поверхностную экспрессию HLA-E на инфицированных клетках, который является лигандом для рецептора, ингибирующего естественные клетки-киллеры (Wilkinson *et al.*, *J Clin Virol.*, 2008; **41**(3):206–12).

Другими генами CMV, которые также являются высоковариабельными, являются гомолог хемокинов UL146, где было идентифицировано 14 различных генотипов (Dolan *et al.*, *J Gen Virol.*, 2004, **85**(Pt 5):1301–12), а также рецептор-мусорщик хемокинов (Kledal *et al.*, *FEBS Lett.*, 1998; **441**(2):209–14) и сопряженный с G-белком рецептор US28, где

сообщалось о многочисленных N-концевых полиморфизмах (Goffard *et al.*, *Virus Genes*, 2006; **33**(2):175–81; Arav-Boger *et al.*, *J Infect Dis.*, 2002; **186**(8):1057–64).

Berg *et al*, 2019 (см. выше) сообщает, что такая степень генетического разнообразия не наблюдается для других герпесвирусов человека (Sijmons *et al.*, 2015, см.выше), и ставит вопрос о том, почему CMV проявляет такую изменчивость по важным иммуномодулирующим генам и как это влияет на взаимодействие вирус-хозяин.

Считается, что большая часть патогенеза HCMV ассоциирована с латентностью вируса, которая тесно связана со способностью вируса ускользать от гуморального и клеточного иммунного ответа хозяина с помощью ряда механизмов (Manandhar *et al.*, *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(15)). Один из наиболее важных таких механизмов включает это высокое, постоянно меняющееся генетическое разнообразие HCMV. Геном HCMV различается у разных индивидуумов и даже в пределах одного и того же хозяина (Gorzer et al., *J Virol*, 2010, **84**(14): 7195-7203; Renzette et al., *PLoS Pathog*, 2011, **7**(5): e1001344; Renzette et al., *Curr Opin Virol*, 2014. **8**: 109-15; Renzette et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(30): E4120-8; Renzette et al., *J Virol*, 2017, **91**(5)). Инфекции нового хозяина приводят к появлению уникального вирусного штамма для каждого инфицированного индивидуума и создают явления отбора, при которых новый генотип становится доминантным вследствие селективного давления иммунного ответа (Renzette et al., 2011, выше). Возможно, что как вирусные факторы, так и факторы хозяина могут способствовать развитию генетического дрейфа вируса во время инфекции HCMV (Vabret *et al.*, *Trends Immunol*, 2017, **38**(1): 53-65; Christensen & Paludan, *Cell Mol Immunol*, 2017, **14**(1): 4-13). Кроме того, каждый пациент, вероятно, будет инфицирован несколькими штаммами CMV, о чем ранее широко сообщалось в литературе (Renzette et al., 2015, выше). Наличие нескольких штаммов у одного и того же индивидуума делает возможным рекомбинацию разных штаммов HCMV. Считается, что рекомбинация является основным фактором генетического разнообразия HCMV (Suarez *et al.*, *J Infect Dis*, 2019, **220**(5): 781-791; Sijmons *et al.*, 2015, выше; Lassalle *et al.*, *Virus Evol*, 2016, **2**(1): vew017; Cudini *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, **116**(12): 5693-5698). Пересортировка весьма разнообразных участков создаст новые комбинации для обеспечения эффективного ускользания от иммунитета, что также может повлиять на патогенность вируса. В результате в нескольких исследованиях смешанная инфекция HCMV ассоциировалась с неблагоприятным клиническим исходом у лиц с ослабленным иммунитетом (Coaquette *et al.*, *Clin Infect Dis*, 2004, **39**(2): 155-161; Lisboa *et al.*, *Transpl Infect Dis*, 2012, **14**(2): 132-140; Houldcroft *et al.*, *Front Microbiol*, 2016, **7**: 1317).

Более того, разнообразие HCMV обусловлено генетическим полиморфизмом, который неравномерно распределен по геному (Sijmons *et al.*, 2015, выше). Отбор является более сильным в белковых областях, экспонированных на поверхности вириона, а также в вирусных белках, экспрессируемых на мембране клетки-хозяина во внеклеточных доменах (Mozzi *et al.*, *PLoS Pathog*, 2020, **16**(5): e1008476). Избирательное давление, оказываемое иммунной системой хозяина, вероятно, сыграло важную роль в формировании генетического разнообразия среди циркулирующих штаммов HCMV. Таким образом, несколько сайтов, на которые направлен положительный отбор, расположены внутри эпитопов, распознаваемых человеческими антителами, или в белковых областях, которые напрямую взаимодействуют с молекулами хозяина, участвующими в иммунном ответе (Sijmons *et al.*, 2015, выше; Mozzi *et al.*, 2020, выше). Эти особенности согласуются с продолжающимся взаимодействием между HCMV и иммунной системой человека.

Изменчивость штаммов и постоянно мутирующий вирус обуславливают необходимость как вирусной диагностики, так и разработки вакцин и лекарственных средств против HCMV и устанавливают ограничения для современного лечения противовирусными лекарственными средствами. Разработка вакцин против HCMV на протяжении многих лет имела высокий приоритет для медицинского сообщества, но до сих пор не было одобрено ни одной эффективной вакцины против HCMV.

Онкогенные свойства HCMV

Белки, кодируемые HCMV, демонстрируют разнообразные онкогенные функции (Geisler *et al*, 2019, выше). При попадании в клетку-хозяина высвобождаются белки тегумента вириона HCMV, такие как pUL48, отключая внутренние и врожденные клеточные иммунные ответы и способствуя усилению метаболической активности клеток-хозяев (Kumari *et al.*, *Cell Death Dis.*, 2017, **8**: e3078). Эти белки, кодируемые HCMV, могут обеспечить преодоление клетками фазы G1 для облегчения быстрого деления клеток (Kumari *et al.*, 2017, выше). Благодаря активированию антиапоптотических генов и подавлению проапоптотических генов клетки переходят в состояние повышенной выживаемости.

После проникновения вирусной ДНК в ядро клетки клеточные РНК-полимеразы I и II (Pol I и II) используются для транскрипции вирусных генов путем связывания с главным немедленно-ранним промотором (MIEP) (Kostopoulou *et al.*, *Oncotarget*, 2017, **8**: 96536–96552). Первыми экспрессируются немедленно-ранние (IE) гены. IE белки,

полученные из таких генов, выступают в качестве факторов транскрипции, контролирующих как раннюю, так и позднюю экспрессию вирусных генов, а также прямую экспрессию генов хозяина. Такие белки необходимы для появления литической инфекции и имеют решающее значение для реактивации вируса из латентного периода (Kumari *et al.*, 2017, выше; Tamrakar *et al.*, *J. Virol.*, 2005, **79**: 15477–15493). Литическая инфекция HCMV приводит к нарушению регуляции клеточного цикла, а продукты IE гена влияют на ключевые клеточные факторы, включая семейство белков ретинобластомы (Rb), циклины, p53, Wnt, фосфатидилинозитол-3-киназу/Akt, обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT) и NF-κB, для повышения иммортальных свойств инфицированных клеток (Moussawi *et al.*, *Sci. Rep.*, 2018, **8**: 12574). Эти пути обычно активируются в раковых клетках. Активация митогенных сигналов, доставляемых протоонкогенами, такими как Fos и Myc, может быть индуцирована IE белками в инфицированных HCMV клетках (Hagemeier *et al.*, *J. Virol.*, 1992, **66**: 4452–4456). Более того, ген MYB индуцируется в клетках, инфицированных HCMV, что напоминает усиленную экспрессию гена MYB при связанной с HPV карциноме (Moussawi *et al.*, 2018, выше). Помимо митогенных сигналов, инфекция HCMV вызывает хромосомные аберрации посредством ухудшения путей репарации ДНК, что приводит к генетической нестабильности в инфицированных клетках (Straat *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 2009, **101**: 488–497; Siew *et al.*, *J. Biomed. Sci.*, 2009, **16**: 107). Это приводит к развитию генетических мутаций.

Сообщалось, что различные кодируемые HCMV белки, подобные сопряженным с G-белком рецепторами (GPCR), включая US27, US28, UL33 и UL78, демонстрируют важные онкогенные функции (Heukers *et al.*, *Oncogene*, 2018, **37**: 4110–4121). G-белки активируют как метаболические, так и онкогенные ключевые сигнальные пути, такие как cAMP и сигнальные пути PI3K, из которых последний имеет решающее значение для возникновения независимого от заякорения роста и онкогенной трансформации эпителиальных клеток (Moussawi *et al.*, 2018, выше; Boroughs *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 2015, **17**: 351–359). Транскрипт раннего гена HCMV-2.7 представляет собой длинную некодирующую (lnc) РНК, которая напрямую взаимодействует с комплексом I дыхательной цепи в митохондриях, предупреждая индуцированную митохондриями гибель клеток путем ингибирования взаимодействий Fas-лиганда и гранзима B путем связывания с каспазой 8, улучшая окислительную способность и поддерживая выработку энергии в инфицированных клетках (Reeves *et al.*, *Science*, 2007, **316**: 1345–1348).

HCMV также разработал несколько способов манипулирования врожденными и адаптивными иммунными ответами для уменьшения иммунного надзора и повышения шансов на выживание в иммунокомпетентном хозяине, что вполне может объяснять важные механизмы ускользания от иммунного надзора в инфицированных HCMV раковых клетках. HCMV кодирует множество белков, которые модулируют узнавание инфицированных клеток NK-клетками (Fielding *et al.*, *PLoS Pathog.*, 2014, **10**: e1004058) и повышают толерантность $CD8^+$ Т-клеток к вирусным белкам. Кодируемые HCMV белки могут стимулировать развитие незрелого фенотипа DC, что снижает активацию $CD4^+$ Т-клеточных ответов (Wagner *et al.*, *J. Leukoc Biol.*, 2008, **83**: 56–63), и, кроме того, снижает элиминацию инфицированных клеток $CD8^+$ цитотоксическими Т-клетками.

Терапевтические мишени HCMV

В настоящее время единственная доступная противовирусная терапия HCMV основана на нуклеозидных аналогах, таких как ганцикловир (GCV) и валганцикловир (VAL-GCV) (Rawlinson *et al.*, *Lancet Infect Dis*, 2017, **17**(6): e177-e188; James & Kimberlin, *Curr Opin Pediatr*, 2016, **28**(1): 81-85), которые имеют ряд недостатков, таких как слабая биодоступность, токсические побочные эффекты и риск развития лекарственной устойчивости. Имеющиеся в настоящее время результаты указывают на то, что ДНК-полимераза (UL54) и вирусная фосфотрансфераза (UL97), два высокополиморфных гена HCMV, играют важную роль в лекарственной устойчивости против GCV (Komatsu *et al.*, *Antiviral Res*, 2014, **101**: 12-25).

Кроме того, что важно, существующие противовирусные средства можно использовать только для лечения литических инфекций HCMV, но они не могут уничтожить латентный вирус. Уничтожение или уменьшение скрытого резервуара могло бы стать благоприятным способом снижения бремени связанных с HCMV заболеваний в нескольких группах пациентов.

Ранее разработанные лекарственные средства против HCMV, такие как ганцикловир (GCV), фоскарнет (FOS) и цидофовир (CDV), нацелены на вирусную ДНК-полимеразу UL54. Тем не менее, противовирусная токсичность и устойчивость к противовирусным лекарственным средствам против HCMV представляют собой растущую терапевтическую проблему в условиях трансплантации, поэтому крайне необходимы новые лекарственные средства против HCMV с новыми вирусными мишенями (Burrel *et al*, 2014, *Lack of influence of human cytomegalovirus (HCMV)*

susceptibility to current antiviral drugs on HCMV-encoded US28 chemokine receptor polymorphism, Poster presentation at ECCMID 2014, Barcelona).

Burrel *et al*, 2014 (выше) показали, что вследствие своей потенциальной роли в распространении и персистенции вируса, а также в миграции гладкомышечных клеток и онкогенезе, кодируемый HCMV US28 представляет собой потенциальную мишень для новых противовирусных видов терапии.

US28 HCMV представляет собой семь трансмембранных белков, принадлежащих к классу сопряженных с G-белком рецепторов (GCPR). GCPR составляют наиболее крупное семейство белков, на которые нацелены одобренные лекарственные средства (Sriram & Insel, *Mol Pharmacol*, 2018. **93**(4): 251-258), и имеют общую архитектуру, каждый из которых состоит из одного полипептида с внеклеточным N-концом, внутриклеточным С-концом и семью гидрофобными трансмембранными доменами (TM1-TM7), связанных тремя внеклеточными петлями (ECL1-3) (Alexander *et al*., *Br J Pharmacol*, 2019, **176 Suppl 1**: S21-S141).

Полная последовательность US28, кодируемая штаммом DB HCMV (номер доступа KT959235), представлена в настоящей заявке как SEQ ID NO: 5, где:

– N-концевой внеклеточный домен (также обозначаемый в данном документе ECD1, поскольку он является первым внеклеточным доменом) представлен в данном документе как SEQ ID NO: 1 и соответствует положениям 1-37 SEQ ID NO: 5,

– первая внеклеточная петля (ECL1; хотя она также обозначается в данном документе как ECD2, поскольку она является вторым внеклеточным доменом) представлена в данном документе как SEQ ID NO: 2 и соответствует положениям 91-101 SEQ ID NO:5,

– вторая внеклеточная петля (ECL2; в тоже время также обозначаемая в данном документе ECD3, поскольку она является третьим внеклеточным доменом) представлена в данном документе как SEQ ID NO: 3 и соответствует положениям 167-183 SEQ ID NO:5; и

– третья внеклеточная петля (ECL3; хотя она также обозначается в данном документе как ECD4, поскольку она является четвертым внеклеточным доменом) представлена в данном документе как SEQ ID NO: 4 и соответствует положениям 250-273 SEQ ID NO:5.

Burrel *et al* (выше) оценили уровни полиморфизма белка US28 среди клинических штаммов HCMV и пришли к выводу, что уровень полиморфизма US28 среди

клинических штаммов выше, чем уровень полиморфизмов, о которых ранее сообщалось для других белков, кодируемых HCMV, таких как UL97 фосфотрансфераза и фактор процессивности UL44, хотя этот полиморфизм существенно не варьируется в зависимости от чувствительности или устойчивости HCMV к одобренным в настоящее время противовирусным лекарственным средствам (т.е. GCV, FOS и CDV), таким образом подтверждая идею о том, что хемокиновый рецептор US28, кодируемый HCMV, может представлять собой перспективную вирусную мишень для лекарственных средств против HCMV, особенно в случае устойчивости к HCMV.

Подход, ориентированный на US28, был использован авторами WO 2019/151865, о чем также сообщается в аналогичной журнальной статье De Groof *et al*, 2019, *Mol. Pharmaceutics*, **16**: 3145-3156. Авторы сообщили, что они создали антитела с одной вариабельной областью тяжелой цепи (VHH), примером которых является конкретный VHH, обозначаемый VUN100 (SEQ ID NO: 60 настоящей заявки), который, как утверждается, специфически обнаруживает US28 в тканях глиобластомы (GBM) и ингибируют лиганд-зависимую и конститутивную активность US28, что, по сообщениям авторов, приводит к последовательному нарушению US28-зависимого роста GBM *in vitro* и *in vivo* в модели ортотопического ксенотрансплантата.

Было показано, что VUN100 связывается с прерывистым эпитопом, который содержит несколько положений связывания в N-концевой внеклеточной области US28 (положения 1-37, также обозначаемые в данном документе ECD1), и на это дополнительно влияет наличие третьей внеклеточной петли (ECL3, положения 250-273, также обозначаемые в данном документе ECD4) US28, как обсуждалось в примере 3 WO 2019/151865 (стр. 36, строки 11-32) и подписи к фиг. 2 De Groof *et al*, 2019 (выше).

Анализ для сравнения связывания Ab VUN100 с US28-экспрессирующими мембранами HEK293T с трансфицированными имитационным контролем мембранами HEK293T показал, что 20% трансфицированных имитационным контролем клеток были связаны VUN100, и он достиг только относительной оценки специфичности 4 для US28-экспрессирующих мембран HEK293T (De Groof *et al*., 2019 (выше) во вспомогательной информации, фигура S1.A и таблица 2 настоящей заявки). Очевидная способность различать US28-экспрессирующие и US28-отрицательные клетки с оценкой специфическисти всего около 4 потенциально неоптимальна и вызывает опасения по поводу способности VUN100 оказывать специфически целевое воздействие на инфицированные HCMV клетки, при этом происходит избегание неприемлемых уровней нецелевых побочных эффектов в здоровых клетках. Это также вызывает

обеспокоенность по поводу способности VUN100 быть применимым в контексте надежной идентификации US28-экспрессирующих клеток (в частности, инфицированных HCMV клеток) в анализах, включая диагностические анализы, например, для использования в иммуногистохимии (IHC). Кроме того, в дальнейшей публикации было признано, что эффективность нацеленных на US28 нанотел необходимо подтвердить в условиях вируса и возможно *in vivo* (De Groof *et al.*, 2021, *Pharmacol Rev* 73:828–846).

Предоставление связывающих молекул, имеющих значительно более высокую способность, чем VUN100, специфически связываться с US28-экспрессирующими клетками (в частности, инфицированными HCMV клетками), и/или минимизировать нецелевое связывание с клетками, которые не экспрессируют US28 (в частности, клетками которые не инфицированы HCMV), было бы крайне желательно как *in vivo*, так и при использовании в анализах, включая IHC.

Более того, как отмечалось выше, уровень полиморфизмов US28 среди клинических штаммов выше, чем уровень полиморфизмов, ранее сообщавшихся для других белков, кодируемых HCMV (Burrel *et al*, выше), и сообщалось о многочисленных N-концевых полиморфизмах US28 (Goffard *et al.*, 2006, выше; Arav-Boger *et al.*, 2002, выше).

Поэтому автор настоящего изобретения рассмотрел возможность того, что наличие высоких уровней полиморфизма в N-концевой области US28, связанной с VUN100, может сделать молекулу VUN100 VHH неспособной последовательно связываться с различными штаммами HCMV. Действительно при рассмотрении в данном контексте результаты в отношении связывания VUN100 с различными штаммами HCMV на фигуре 8D WO 2019/151865 показывают разницу в связывании между штаммами HCMV VHL/E, Merlin и TB40/E, при этом связывание особенно снижается у штамма TB40/E (тип B1) приблизительно только вдвое от уровня связывания, наблюдаемого в отношении штамма Merlin. Более того, дополнительная характеристика VUN100 представлена в предварительно напечатанной статье, доступной онлайн от De Groof *et al*, 2020 (doi: https://doi.org/10.1101/2020.05.12.071860), где на фиг. 2 дополнительных данных показаны результаты % индуцированной IE экспрессии в ядре CD14+ моноцитов, связанных VUN100. Все протестированные клетки получали от HCMV серопозитивных индивидуумов и подтверждали как латентно инфицированные HCMV, хотя штамм(ы) HCMV, инфицирующий(ие) каждого донора, не был(и) определен(ы). Уровень IE экспрессии, индуцированный связыванием VUN100

с этими HCMV-положительными CD14+ клетками у каждого из четырех разных пациентов, существенно различался, при этом заявленные цифры составляли 57%, 33%, 22% и 4% (диапазон различий более в 14 раз) соответственно для клеток доноров 1-4. Этот высокий уровень вариабельности ответа после связывания VUN100 с подтвержденными HCMV-положительными клетками, скорее всего, обусловлен инфицированием каждого из доноров различными штаммами HCMV и, таким образом, является убедительным признаком того, что связывающая способность VUN100 будет значительно варьироваться между различными штаммами HCMV. На той же фигуре также показаны высокие уровни вариабельности ответа (свыше 7-кратных уровней различия) после связывания бивалентной формы VUN100 (обозначаемой De Groof *et al*, 2020 (см. выше) VUN100b), как представлено SEQ ID NO: 63 настоящей заявки) с той же группой HCMV-положительных клеток от доноров 1-4, что снова приводит к результатам, указывающим на штаммоспецифичную чувствительность связывания.

Для применения US28 в качестве терапевтической мишени, важно преодолеть одно или несколько наиболее важных препятствий, описанных выше, включая не только относительно высокие уровни неспецифической связывающей активности, о которых сообщалось для молекулы VUN100 известного уровня техники, но также минимизировать активность нецелевого связывания и получить молекулы, которые связываются с US28, которые преодолевают препятствия, связанные с разнообразием штаммов, вирусными мутациями, мутагенным дрейфом и способностью вируса скрываться от иммунной системы во время латентного периода вируса.

Таким образом, целью настоящего изобретения является создание связывающих молекул, которые могут высокоспецифически связываться с биологическими материалами, экспрессирующими US28 и/или положительными в отношении инфекции HCMV, по сравнению с нормальными клетками человека, уровень которых должен быть намного ниже, и/или минимизировать абсолютные уровни нецелевого связывания с нормальными клетками человека. Например, получение связывающих молекул, которые обеспечивают или направляют цитотоксический эффект на клетки, с которыми связываются связывающие молекулы, представляет большой интерес для борьбы с инфекциями HCMV и связанными с ними состояниями, и целью настоящего изобретения является получение связывающих молекул, которые могут нацеливаться на эти эффекты таким образом, чтобы минимизировать или избежать неприемлемых (например, терапевтически неприемлемых) уровней нецелевых цитотоксических эффектов в нормальных клетках человека. В частности, одной из целей настоящего изобретения

является получение связывающих молекул, имеющих более высокий уровень специфичности к US28 и/или инфицированным HCMV клеткам, чем Ab VUN100 из WO 2019/151865 и De Groof *et al*, 2019 (выше) и/или чем бивалентная молекула VUN100b из De Groof *et al*, 2020 (выше), при оценке специфичности связывания с биологическими материалами (например, клетками), которые экспрессируют US28 и/или которые являются положительными в отношении инфекции HCMV по сравнению с биологическими материалами (например, эквивалентными клетками), которые не экспрессируют US28 и не являются положительными в отношении инфекции HCMV.

Другой целью настоящего изобретения является получение связывающих молекул против US28, которые специфичны для связывания биологических материалов, которые экспрессируют US28 и/или которые являются положительными в отношении инфицированных HCMV US28-экспрессирующих клеток по сравнению с соответствующими биологическими материалами, которые не экспрессируют US28 (такими как нормальные клетки человека) и/или которые демонстрируют абсолютные уровни нецелевого связывания с нормальными клетками человека, которые заметно ниже, чем у молекул Ab VUN100, как отмечено выше.

Еще одной целью настоящего изобретения является получение связывающих молекул, которые являются агностическими в отношении штамма и, следовательно, в идеале способны воздействовать на все или по сути все инфекции HCMV, независимо от штамма или комбинации штаммов HCMV, присутствующих и/или способных обеспечивать постоянный эффект в ходе лечения инфекций HCMV, несмотря на возможность возникновения одной или нескольких мутаций HCMV в инфицирующем(их) штамме(ах) у индивидуума(ов), подлежащего(их) лечению. В частности, особый интерес представляют связывающие молекулы против US28, характеристики связывания которых демонстрируют более высокую степень агностического в отношении штамма связывания, чем Ab VUN100.

Краткое описание сути изобретения

В настоящем изобретении представлены связывающие молекулы, имеющие одно или несколько (предпочтительно все) из высокоспецифического связывания с белком US28 цитомегаловируса человека (HCMV), очень низких уровней неспецифического связывания с нормальными (неинфицированными) клетками и/или способности к агностическому в отношении штамма связыванию, а также молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие указанные связывающие молекулы.

Связывающие молекулы по настоящему изобретению предназначены для связывания с внеклеточным доменом 3 (ECD3) белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV).

Было продемонстрировано, что связывающие молекулы по настоящему изобретению имеют превосходные связывающие свойства, включая описанные выше и дополнительно описанные в данном документе. Например, также неожиданно было продемонстрировано, что связывающие молекулы по настоящему изобретению обеспечивают особенно предпочтительную специфичность связывания в отношении агрессивных и/или метастазирующих инфицированных HCMV различных видов рака, включая различные виды рака молочной железы.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления связывающая молекула выбрана из антитела (включая, например, антитело BiTE) и химерного антигенного рецептора (CAR) или их функциональных вариантов, фрагментов, слитых белков и/или конъюгатов, а также молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих то же самое. Указанная связывающая молекула может, например, содержать цитотоксический компонент или другой эффекторный компонент, имеющий способность оказывать влияние (например, ингибировать или уничтожать) любые клетки, связываемые связывающей молекулой, или быть связана с ними. Указанная связывающая молекула может, например, содержать компонент, который может рекрутировать другие средства (например, другие белки, лекарственные средства, клетки или любое другое вещество по выбору) или быть связана с ним, таким образом, что рекрутированное средство имеет специфически направленную способность оказывать влияние (например, ингибировать или уничтожать) клетки, связанные связывающей молекулой; поэтому неограничивающим примером является молекула BiTE, которая имеет способность рекрутировать Т-клетку для воздействия на клетки, связанные указанным BiTE. Также представлены клетки, экспрессирующие указанные связывающие молекулы, включая примеры, в которых связывающая молекула представляет собой CAR, и указанные клетки могут представлять собой CAR-экспрессирующие клетки, включая CAR-T-клетки, CAR-NK-клетки и CAR-M-клетки.

Эти и другие раскрытия настоящего изобретения описаны более подробно посредством следующего описания и прилагаемой формулы изобретения и фигур.

Соответственно, в первом аспекте настоящего изобретения представлена связывающая молекула, содержащая одну или несколько полипептидных цепей, при этом указанная связывающая молекула имеет специфичность связывания в отношении

эпитопа во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV). В соответствии с настоящим изобретением ECD3 белка US28 содержит, по сути состоит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в белке US28, кодируемой штаммом HCMV, в положениях, соответствующих положениям 167-183 белка US28, кодируемого штаммом DB цитомегаловируса человека (HCMV), как указано в SEQ ID NO: 5.

В качестве примера и без ограничения связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения может быть выбрана из антитела или химерного антигенного рецептора (CAR).

Связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения может, например, иметь специфичность связывания в отношении эпитопа, полностью присутствующего во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 HCMV.

Связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения может, например, иметь специфичность связывания в отношении линейного эпитопа в ECD3 белка US28.

Связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения может, например, иметь агностическую в отношении штамма специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV. Например, связывающая молекула может иметь специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, где специфичность связывания является агностической в отношении двух или более (например, всех) штаммов HCMV, например, является агностической в отношении 4D-вариантных штаммов и 4N-вариантных штаммов (каждый из которых описан далее в данном документе), необязательно двух или более (например, всех) штаммов HCMV, выбранных из группы, состоящей из DB, Towne, AF1, VHL/E, AD169, BL, DAVIS, JP, Merlin, PH, TB40/E, Толедо, TR и VR1814 (FIX).

Соответственно, связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения может, например, иметь специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, независимо от того, содержит ли ECD3 белка US28 последовательность 4D-варианта или 4N-варианта:

- где 4D-вариант содержит последовательность TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7), обнаруженную в ECD3 US28, кодируемую первой группой штаммов HCMV, таких как Towne, VR1814, TB40/E, Merlin, JP, Ad169, AF1, VHL/E, BL и DAVIS; и

– при этом 4N-вариант содержит последовательность TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), обнаруженную в ECD3 US28, кодируемую второй группой штаммов HCMV, таких как штаммы Toledo, TR и DB.

Используя протоколы, описанные в данном документе, автор настоящей заявки последовательно и неоднократно получал многочисленные антитела к ECD3 с одним или несколькими из вышеупомянутых полезных свойств связывания, включая антитела, указанные в данном документе под следующими обозначениями (последовательности которых также представлены ниже): US28-13-5G6-1D3; US28-13-1C10-1C10; US28-13-1H3-1A10; US28-14-2C2-1G4; US28-13-1C10-1G9; и US28-14-4E4-1E8.

В одном варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей (CDR), соответствующих любому одному, двум, трем, четырем, пяти или всем шести из последовательности CDR антитела 13-5G6-1D3 (обычно обозначаемого в данном документе «1D3»), как определено SEQ ID NO: 8, 9, 10, 14, 15 и 16 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1D3, и необязательно при этом связывающая молекула выбрана из антитела и CAR.

Необязательно связывающая молекула в соответствии с этим вариантом осуществления может содержать (a) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) антитела 1D3, как определено SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно; и/или (b) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области легкой цепи (VL) антитела 1D3, как определено SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно.

В качестве дополнения или в качестве альтернативы в дополнительном варианте связывающая молекула в соответствии с этим вариантом осуществления может содержать: (a) по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно, и необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, по сути состоит или состоит из последовательности SEQ ID NO:12; и/или (b) по меньшей мере один полипептид вариабельной области легкой цепи (VL), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно, и необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой

цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO:18.

В данном документе идентифицированы следующие последовательности антитела US28-13-5G6-1D3 со ссылкой на идентификационные номера последовательностей (SEQ ID NO), описанные ниже:

1D3		Последовательность ДНК	Белковая последовательность
Полная тяжелая цепь (включая лидерную последовательность)		SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 20
Полная легкая цепь (включая лидерную последовательность)		SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 21
Цепь V_H	Незрелая	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 11
	Зрелая	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 12
Цепь V_L	Незрелая	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO:17
	Зрелая	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 18
V_H-CDR1		SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 8
V_H-CDR2		SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 9
V_H-CDR3		SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 10
V_L-CDR1		SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 14
V_L-CDR2		SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 15
V_L-CDR3		SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 16

В другом варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR, соответствующих любому одному, двум, трем, четырем, пяти или всем шести из последовательности CDR антитела 13-1C10-1C10 (обычно обозначаемого в данном документе «1C10»), как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83 и 118 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1C10, и необязательно при этом связывающая молекула выбрана из антитела и CAR.

Необязательно связывающая молекула в соответствии с этим вариантом осуществления может содержать (a) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 V_H антитела 13-1C10-1C10, как определено SEQ ID NO: 112, 113 и 114

соответственно; и/или (b) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 V_L антитела 13-1C10-1C10, как определено SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно.

В качестве дополнения или в качестве альтернативы в дополнительном варианте связывающая молекула в соответствии с этим вариантом осуществления может содержать: (a) по меньшей мере один полипептид V_H, который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно, и необязательно при этом по меньшей мере один полипептид V_L содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 104; и/или (b) по меньшей мере один полипептид V_L, который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно, и необязательно при этом полипептид V_L содержит, состоит по сути из или состоит из последовательность SEQ ID NO: 108.

В данном документе идентифицированы следующие последовательности антитела US28-13-1C10-1C10 со ссылкой на идентификационные номера последовательностей (SEQ ID NO), описанные ниже:

1C10		Последовательность ДНК	Белковая последовательность
Полная тяжелая цепь (включая лидерную последовательность)		SEQ ID NO: 155	SEQ ID NO: 157
Полная легкая цепь (включая лидерную последовательность)		SEQ ID NO: 156	SEQ ID NO: 158
Цепь V_H	Незрелая	SEQ ID NO: 101	SEQ ID NO: 103
	Зрелая	SEQ ID NO: 102	SEQ ID NO: 104
Цепь V_L	Незрелая	SEQ ID NO: 105	SEQ ID NO: 107
	Зрелая	SEQ ID NO: 106	SEQ ID NO: 108
V_H-CDR1		SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 112
V_H-CDR2		SEQ ID NO: 110	SEQ ID NO: 113
V_H-CDR3		SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 114
V_L-CDR1		SEQ ID NO: 115	SEQ ID NO: 117
V_L-CDR2		SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 83
V_L-CDR3		SEQ ID NO: 116	SEQ ID NO: 118

В другом варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR, соответствующих любому одному, двум, трем, четырем, пяти или всем шести из последовательности CDR антитела 13-1H3-1A10 (обычно обозначаемого в данном документе «1A10»), как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83 и 118 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1A10, и необязательно при этом связывающая молекула выбрана из антитела и CAR.

Необязательно связывающая молекула в соответствии с этим вариантом осуществления может содержать (a) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 V_H антитела 13-1H3-1A10, как определено SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно; и/или (b) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 V_L антитела 13-1H3-1A10, как определено SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно.

В качестве дополнения или в качестве альтернативы в дополнительном варианте связывающая молекула в соответствии с этим вариантом осуществления может содержать: (a) по меньшей мере один полипептид V_H, который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно, и необязательно при этом по меньшей мере один полипептид V_L содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 122; и/или (b) по меньшей мере один полипептид V_L, который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно, и необязательно при этом полипептид V_L содержит, состоит по сути из или состоит из последовательность SEQ ID NO: 126.

В данном документе идентифицированы следующие последовательности антитела US28-13-1H3-1A10 со ссылкой на идентификационные номера последовательностей (SEQ ID NO), описанные ниже:

1A10		Последовательность ДНК	Белковая последовательность
Полная тяжелая цепь (включая лидерную последовательность)		SEQ ID NO: 159	SEQ ID NO: 161
Полная легкая цепь (включая лидерную последовательность)		SEQ ID NO: 160	SEQ ID NO: 162
Цепь V_H	Незрелая	SEQ ID NO: 119	SEQ ID NO: 121

	Зрелая	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 122
Цепь V_L	Незрелая	SEQ ID NO: 123	SEQ ID NO: 125
	Зрелая	SEQ ID NO: 124	SEQ ID NO: 126
V_H-CDR1		SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 112
V_H-CDR2		SEQ ID NO: 110	SEQ ID NO: 113
V_H-CDR3		SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 114
V_L-CDR1		SEQ ID NO: 115	SEQ ID NO: 117
V_L-CDR2		SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 83
V_L-CDR3		SEQ ID NO: 116	SEQ ID NO: 118

В другом варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR, соответствующих любому одному, двум, трем, четырем, пяти или всем шести из последовательности CDR антитела 13-1C10-1G9 (обычно обозначаемого в данном документе «1G9»), как определено SEQ ID NO: 76, 77, 78, 82, 83 и 84 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1G9, и необязательно при этом связывающая молекула выбрана из антитела и CAR.

Необязательно связывающая молекула в соответствии с этим вариантом осуществления может содержать (a) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 V_H антитела 13-1C10-1G9, как определено SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно; и/или (b) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 V_L антитела 13-1C10-1G9, как определено SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно.

В качестве дополнения или в качестве альтернативы в дополнительном варианте связывающая молекула в соответствии с этим вариантом осуществления может содержать: (a) по меньшей мере один полипептид V_H, который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно, и необязательно при этом по меньшей мере один полипептид V_L содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 68; и/или (b) по меньшей мере один полипептид V_L, который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно, и необязательно при этом полипептид V_L содержит, состоит по сути из или состоит из последовательность SEQ ID NO: 72.

В данном документе идентифицированы следующие последовательности антитела US28-13-1C10-1G9 со ссылкой на идентификационные номера последовательностей (SEQ ID NO), описанные ниже:

1G9		Последовательность ДНК	Белковая последовательность
Полная тяжелая цепь (включая лидерную последовательность)		SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 149
Полная легкая цепь (включая лидерную последовательность)		SEQ ID NO: 148	SEQ ID NO: 150
Цепь V_H	Незрелая	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 67
	Зрелая	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 68
Цепь V_L	Незрелая	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 71
	Зрелая	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 72
V_H-CDR1		SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 76
V_H-CDR2		SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 77
V_H-CDR3		SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 78
V_L-CDR1		SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 82
V_L-CDR2		SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 83
V_L-CDR3		SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 84

В другом варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR, соответствующих любому одному, двум, трем, четырем, пяти или всем шести из последовательности CDR антитела 14-4E4-1E8 (обычно обозначаемого в данном документе «1E8»), как определено SEQ ID NO: 76, 95, 96, 82, 99 и 100 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1E8, и необязательно при этом связывающая молекула выбрана из антитела и CAR.

Необязательно связывающая молекула в соответствии с этим вариантом осуществления может содержать (a) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 V_H антитела 14-4E4-1E8, как определено SEQ ID NO: 76, 95 и 96 соответственно; и/или (b) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 V_L антитела 14-4E4-1E8, как определено SEQ ID NO: 82, 99 и 100 соответственно.

В качестве дополнения или в качестве альтернативы в дополнительном варианте связывающая молекула в соответствии с этим вариантом осуществления может содержать: (a) по меньшей мере один полипептид V_H, который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 76, 95 и 96 соответственно, и необязательно при этом по меньшей мере один полипептид V_L содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 88; и/или (b) по меньшей мере один полипептид V_L, который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 82, 99 и 100 соответственно, и необязательно при этом полипептид V_L содержит, состоит по сути из или состоит из последовательность SEQ ID NO: 92.

В данном документе идентифицированы следующие последовательности антитела US28-14-4E4-1E8 со ссылкой на идентификационные номера последовательностей (SEQ ID NO), описанные ниже:

1E8		Последовательность ДНК	Белковая последовательность
Полная тяжелая цепь (включая лидерную последовательность)		SEQ ID NO: 151	SEQ ID NO: 153
Полная легкая цепь (включая лидерную последовательность)		SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 154
Цепь V_H	Незрелая	SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 87
	Зрелая	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 88
Цепь V_L	Незрелая	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 91
	Зрелая	SEQ ID NO: 90	SEQ ID NO: 92
V_H-CDR1		SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 76
V_H-CDR2		SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 95
V_H-CDR3		SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 96
V_L-CDR1		SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 82
V_L-CDR2		SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 99
V_L-CDR3		SEQ ID NO: 98	SEQ ID NO: 100

В другом варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR, соответствующие любой одной, двум, трем, четырем, пяти или всем шести из

следующих консенсусных последовательностей CDR (где замещающие аминокислоты для конкретного положения указаны в скобках, а * указывает на отсутствие аминокислоты в этом положении):

(a) V_H-CDR1, соответствующая S(Y/H)A(M/L)S (SEQ ID NO: 167);

(b) V_H-CDR2, соответствующая SISS(G/R)G(S/R)TYYPDSVKG (SEQ ID NO: 168);

(c) V_H-CDR3, соответствующая GG(S/T)(T/R/H)(M/H/Y)(I/S)(T/Y)(T/G)(G/N)(L/*)GF(A/D)(Y/F) (SEQ ID NO: 169);

(d) V_L-CDR1, соответствующая S(A/V)SSSVSYMH (SEQ ID NO: 170);

(e) V_L-CDR2, соответствующая D(T/S)SKLAS (SEQ ID NO: 171); и/или

(f) V_L-CDR3, соответствующая QQW(S/T/*)SN(*/N)PP(I/L)T (SEQ ID NO: 172).

В другом варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR, соответствующие любой одной, двум, трем, четырем, пяти или всем шести из следующих консенсусных последовательностей CDR (где замещающие аминокислоты для конкретного положения указаны в скобках, а * указывает на отсутствие аминокислоты в этом положении):

(a) V_H-CDR1, соответствующая S(Y/H)A(M/L)S (SEQ ID NO: 167);

(b) V_H-CDR2, соответствующая SISS(G/R)GRTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 174);

(c) V_H-CDR3, соответствующая GG(S/T)(T/R/H)(M/H/Y)(I/S)(T/Y)(T/G)(G/N)GF(A/D)(Y/F) (SEQ ID NO: 175);

(d) V_L-CDR1, соответствующая S(A/V)SSSVSYMH (SEQ ID NO: 170);

(e) V_L-CDR2, соответствующая D(T/S)SKLAS (SEQ ID NO: 171); и/или

(f) V_L-CDR3, соответствующая QQW(T/*)SN(*/N)PPIT (SEQ ID NO: 176).

Функциональные варианты любой одной или нескольких последовательностей V_H-CDR1, V_H-CDR2, V_H-CDR3, V_L-CDR1, V_L-CDR2 и/или V_L-CDR3, как определено выше для любого из антител US28-13-5G6-1D3, 13-1C10-1C10, 13-1H3-1A10, 13-1C10-1G9, 14-4E4-1E8 могут необязательно содержать одну из консенсусных последовательностей, указанных выше для последовательностей V_H-CDR1, V_H-CDR2, V_H-CDR3, V_L-CDR1, V_L-CDR2 и/или V_L-CDR3 соответственно.

Последовательности, соответствующие указанным выше SEQ ID NO, приведены в разделе настоящей заявки под заголовком «Последовательности», который следует за разделом «Примеры» в настоящей заявке.

В определенных вариантах осуществления связывающая молекула в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения может быть выбрана из группы, состоящей из:

(a) бивалентных антител, таких как антитела IgG-scFv (например, где первый связывающий домен представляет собой интактный IgG, а второй связывающий домен представляет собой scFv, прикрепленный к первому связывающему домену на N-конце легкой цепи и/или на C-конце легкой цепи, и/или на N-конце тяжелой цепи и/или на C-конце тяжелой цепи IgG, или наоборот);

(b) моновалентных антител, таких как *DuoBody*® или биспецифическое антитело типа «выступ во впадине» (например, scFv-KIH, scFv-KIH^r, BiTE-KIH или BiTE-KIH^r;

(c) антител $scFv_2$-Fc;

(d) биспецифических антител, таких как антитела на основе привлекающих T-клетки биспецифических активаторов (BiTE);

(e) антител с двойным вариабельным доменом (DVD)-Ig;

(f) переориентирующихся антител с двойной аффинностью (DART) (например, $DART_2$-Fc или DART);

(g) триспецифических антител, таких как антитела DNL-Fab_3;

(h) антител scFv-HSA-scFv;

(i) однодоменных антител;

(j) IgG, содержащих только тяжелые цепи (hcIgG), таких как IgG верблюдовых (например, антитела VHH) и рецептор нового антигена иммуноглобулина акулы (IgNAR), и их одноцепочечных антител; и

(k) химерного антигенного рецептора (CAR), содержащего внеклеточный домен, который содержит, состоит по сути из или состоит из связывающей молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, например, внеклеточный домен, который содержит любой из вариантов (a)-(h) данного перечня или их комбинации.

В качестве дополнения или в качестве альтернативы связывающая молекула в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения может быть выбрана из группы, состоящей из:

(i) антитела на основе привлекающего иммунные клетки биспецифического активатора, например, привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BiTE), и необязательно при этом антитело BiTE содержит CD3-связывающий домен; или

(ii) моноклональное антитело, необязательно рекомбинантное моноклональное антитело, например, моноклональное антитело, продуцируемое рекомбинантно клетками CHO.

В первом аспекте настоящего изобретения также представлен функциональный фрагмент связывающей молекулы, как определено выше, где функциональный фрагмент:

(a) содержит или состоит из антигенсвязывающего фрагмента связывающей молекулы, как определено в любом из предыдущих пунктов, или его варианта, слияния или производного, выбранного из группы, состоящей из: фрагмента Fv (такого как одноцепочечный фрагмент Fv (scFv) или фрагмент Fv с дисульфидной связью), Fab-подобного фрагмента (такого как Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент или фрагмент $F(ab)_2$) и однодоменных антител (dAb, включая одиночные и двойные форматы, такие как dAb-линкер-dAb и нанотела);

(b) обеспечивает одну или несколько характеристик связывания связывающей молекулы по первому аспекту настоящего изобретения, как определено в данном документе;

(c) содержит последовательности CDR связывающей молекулы по первому аспекту настоящего изобретения, как определено в данном документе; и/или

(d) содержит последовательности V_H и/или V_L связывающей молекулы по первому аспекту настоящего изобретения, как определено в данном документе.

В данном документе также представлены слияния связывающих молекул по первому аспекту настоящего изобретения. Например, представлена связывающая молекула, как определено выше, или функциональный фрагмент указанной связывающей молекулы, как определено выше, где связывающая молекула или ее функциональный фрагмент содержит последовательность слитого полипептида, при этом указанная последовательность слитого полипептида содержит первую аминокислотную последовательность, слитую со второй аминокислотной последовательностью, при этом первая аминокислотная последовательность содержит или состоит по меньшей мере из одной из полипептидных цепей связывающей молекулы или ее функционального фрагмента, а вторая аминокислотная последовательность представляет собой партнера по слиянию.

В определенных вариантах осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR) или содержится в нем. Соответственно, в первом аспекте настоящего изобретения также представлен CAR, содержащий:

(i) внеклеточный домен, где внеклеточный домен содержит или состоит из связывающей молекулы по первому аспекту настоящего изобретения, как определено в данном документе, или функционального фрагмента указанной связывающей молекулы, как определено в данном документе;

(ii) трансмембранный домен; и

(iii) внутриклеточный домен;

где внеклеточный домен CAR имеет специфичность связывания в отношении эпитопа внеклеточного домена 3 (ECD3) белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV), и

где ECD3 белка US28 содержит аминокислотную последовательность, представленную в белке US28 в положениях, соответствующих положениям 167-183 белка US28, кодируемого цитомегаловирусом человека (HCMV), как указано в SEQ ID NO:5.

Необязательно, в указанном CAR:

(a) внеклеточный домен CAR имеет специфичность связывания в отношении эпитопа, полностью присутствующего во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 HCMV;

(b) внеклеточный домен CAR имеет специфичность связывания в отношении линейного эпитопа в ECD3 белка US28;

(c) внеклеточный домен CAR имеет специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, который является агностическим в отношении штамма HCMV, например, специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, который является агностическим в отношении двух или более (например, всех) штаммов HCMV, выбранных из группы, состоящей из DB, Towne, AD169, DAVIS, BL, JP, Merlin, PH, TB40/E, Toledo, TR, VHL/E и VR1814 (FIX); и/или

(d) внеклеточный домен CAR имеет специфичность в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, независимо от того, содержит ли ECD3 белка US28 последовательность:

- TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7), обнаруженную в ECD3 US28, кодируемую большинством штаммов HCMV, или

– TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), обнаруженную в ECD3 US28, кодируемую меньшинством штаммов HCMV.

В определенных вариантах осуществления в CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения:

(a) внеклеточный домен CAR содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей (CDR), соответствующих любой одной, двум, трем, четырем, пяти или всем шести последовательностям CDR антитела 1D3, как определено SEQ ID NO: 8, 9, 10, 14, 15 и 16 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1D3;

(b) внеклеточный домен CAR содержит:

(i) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области тяжелой цепи (V_H) антитела 1D3, как определено SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно; и/или

(ii) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области легкой цепи (V_L) антитела 1D3, как определено SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно; и/или

(c) внеклеточный домен CAR содержит: (i) по меньшей мере одну полипептидную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H), которая содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно, и необязательно при этом по меньшей мере одна полипептидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 12; и/или (ii) по меньшей мере одну полипептидную последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L), которая содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно, и необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 18.

В другом варианте осуществления в CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения:

(a) внеклеточный домен CAR содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей (CDR), соответствующих любой одной, двум, трем, четырем, пяти или всем шести последовательностям CDR антитела 1C10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83 и 118 соответственно, и/или

функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1C10;

(b) внеклеточный домен CAR содержит:

(i) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области тяжелой цепи (V_H) антитела 1C10, как определено SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно; и/или

(ii) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области легкой цепи (V_L) антитела 1C10, как определено SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно; и/или

(c) внеклеточный домен CAR содержит: (i) по меньшей мере одну полипептидную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H), которая содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно, и необязательно при этом по меньшей мере одна полипептидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 104; и/или (ii) по меньшей мере одну полипептидную последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L), которая содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно, и необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 108.

В другом варианте осуществления в CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения:

(a) внеклеточный домен CAR содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей (CDR), соответствующих любой одной, двум, трем, четырем, пяти или всем шести последовательностям CDR антитела 1A10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83 и 118 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1A10;

(b) внеклеточный домен CAR содержит:

(i) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области тяжелой цепи (V_H) антитела 1A10, как определено SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно; и/или

(ii) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области легкой цепи (V_L) антитела 1A10, как определено SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно; и/или

(c) внеклеточный домен CAR содержит: (i) по меньшей мере одну полипептидную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H), которая содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно, и необязательно при этом по меньшей мере одна полипептидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 122; и/или (ii) по меньшей мере одну полипептидную последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L), которая содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно, и необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 126.

В другом варианте осуществления в CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения:

(a) внеклеточный домен CAR содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей (CDR), соответствующих любой одной, двум, трем, четырем, пяти или всем шести последовательностям CDR антитела 1G9, как определено SEQ ID NO: 76, 77, 78, 82, 83 и 84 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1G9;

(b) внеклеточный домен CAR содержит:

(i) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области тяжелой цепи (V_H) антитела 1G9, как определено SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно; и/или

(ii) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области легкой цепи (V_L) антитела 1G9, как определено SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно; и/или

(c) внеклеточный домен CAR содержит: (i) по меньшей мере одну полипептидную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H), которая содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно, и необязательно при этом по меньшей мере одна полипептидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит,

состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 68; и/или (ii) по меньшей мере одну полипептидную последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L), которая содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно, и необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 72.

В другом варианте осуществления в CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения:

(a) внеклеточный домен CAR содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей (CDR), соответствующих любой одной, двум, трем, четырем, пяти или всем шести последовательностям CDR антитела 1E8, как определено SEQ ID NO: 76, 95, 96, 82, 99 и 100 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1E8;

(b) внеклеточный домен CAR содержит:

(i) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области тяжелой цепи (V_H) антитела 1E8, как определено SEQ ID NO: 76, 95 и 96 соответственно; и/или

(ii) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области легкой цепи (V_L) антитела 1E8, как определено SEQ ID NO: 82, 99 и 100 соответственно; и/или

(c) внеклеточный домен CAR содержит: (i) по меньшей мере одну полипептидную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H), которая содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 76, 95 и 96 соответственно, и необязательно при этом по меньшей мере одна полипептидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 88; и/или (ii) по меньшей мере одну полипептидную последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L), которая содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 82, 99 и 100 соответственно, и необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 92.

Необязательно в указанном CAR внеклеточный домен представляет собой антитело, например, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

Трансмембранный домен CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения может, например, содержать трансмембранный домен белка, например, трансмембранный домен белка трансмембранного рецептора, и необязательно при этом трансмембранный домен содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD8, CD45 и CD4.

Внеклеточный домен CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения может, например, быть соединен с трансмембранным доменом шарнирной областью.

Внутриклеточный домен CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения может, например, содержать внутриклеточный сигнальный домен, например, при этом: (a) внутриклеточный сигнальный домен содержит один или несколько мотивов активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM) ; и/или (b) внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета, Fc-гамма-рецептора, Fc-бета-рецептора, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

Внутриклеточный домен CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения может, например, содержать один или несколько костимулирующих доменов, например: (a) при этом один или несколько костимулирующих доменов содержит один или несколько функциональных сигнальных доменов, полученных из белка, выбранного из группы, состоящей из CD28, 41BB, OX40, ICOS, CD27 и DAP10; (b) при этом внутриклеточный домен содержит костимулирующий домен, проксимальный к внутриклеточному сигнальному домену, (c) при этом внутриклеточный домен содержит два или более костимулирующих домена, например, два последовательных костимулирующих домена, и/или (d) при этом внутриклеточный домен включает отдельные сигналы цитокинов.

CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения может, например, дополнительно содержать лидерную последовательность.

Во втором аспекте настоящего изобретения представлена молекула нуклеиновой кислоты или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты, при этом молекула нуклеиновой кислоты содержит или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты, вместе взятых, содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, которые индивидуально или в комбинации кодируют связывающую молекулу по первому аспекту настоящего изобретения,

например, антитело или CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения.

В третьем аспекте настоящего изобретения представлен вектор, содержащий (или комбинацию множества различных векторов, которые вместе содержат) молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения. Указанный вектор или каждый вектор по третьему аспекту настоящего изобретения может быть выбран, например, из группы, состоящей из ретровирусного вектора, плазмиды, лентивирусного вектора и аденовирусного вектора.

Необязательно молекула нуклеиновой кислоты или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения и/или вектор в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения содержат одну или несколько дополнительных последовательностей, где указанная или каждая дополнительная последовательность кодирует один или несколько селектируемых маркеров.

В четвертом аспекте настоящего изобретения представлена клетка или популяция клеток (необязательно гомогенная или гетерогенная популяция клеток), содержащие молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения, и/или вектор в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, необязательно при этом клетка экспрессирует одну или несколько связывающих молекул соответствии с первым аспектом настоящего изобретения (например, одно или несколько антител и/или один или несколько CAR), при этом указанная одна или несколько связывающих молекул и/или CAR, кодируемых молекулой нуклеиновой кислоты или комбинацией множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения, или вектор в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения. Указанные клетки необязательно могут быть выбраны из выделенных клеток, клеток *ex vivo* и клеток *in vitro*.

Клетка в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения может, например, содержать: (а) молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения, где кодируемая связывающая молекула представляет собой антитело, функциональный фрагмент указанного антитела или антитело его функционального

фрагмента, который содержит слитую полипептидную последовательность в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения; и/или (b) вектор в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, где указанный вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты, как определено вариантом (a) данного параграфа.

Клетка в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения может, например, содержать: (a) молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения, где кодируемая связывающая молекула представляет собой CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения; и/или (b) вектор в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, где указанный вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты, как определено частью (a) данного параграфа. Без ограничения указанная клетка может быть выбрана, например, из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK) и макрофага. Соответственно, клетка может необязательно представлять собой CAR-Т-клетку, CAR-NK-клетку или CAR-макрофаг, и необязательно, когда клетка представляет собой CAR-Т-клетку, тогда, например, Т-клетка может быть выбрана из группы, состоящей из CD8+ Т-клеток, CD4+ Т-клеток, эффекторных Т-клеток, Т-клеток-хелперов, Т-клеток памяти, цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), EBV-специфического Т-клеточного рецептора (TCR) или подтипов γδ-Т-клеток.

В четвертом аспекте настоящего изобретения также представлена клетка, содержащая связывающую молекулу в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанную связывающую молекулу, необязательно, где указанная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту или вектор, как определено вторым или третьим аспектами настоящего изобретения соответственно. Например, связывающая молекула может представлять собой антитело в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, функциональный фрагмент указанного антитела в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или антитело его функционального фрагмента, который содержит слитую полипептидную последовательность в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, и необязательно при этом антитело представляет собой моноклональное антитело, и, кроме того, например, при этом клетка представляет

собой клетку млекопитающего, такую как клетка CHO, которая рекомбинантно экспрессирует моноклональное антитело.

В четвертом аспекте настоящего изобретения также представлена клетка, содержащая CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный CAR, необязательно, где указанная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту или вектор, как определено вторым или третьим аспектами настоящего изобретения соответственно. Без ограничения указанная клетка может быть выбрана, например, из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK) и макрофага. Соответственно, клетка может необязательно представлять собой CAR-T-клетку, CAR-NK-клетку или CAR-макрофаг, и необязательно, когда клетка представляет собой CAR-T-клетку, тогда, например, Т-клетка может быть выбрана из группы, состоящей из $CD8^+$ Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток, эффекторных Т-клеток, Т-клеток-хелперов, Т-клеток памяти, цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), EBV-специфического Т-клеточного рецептора (TCR) или подтипов γδ-Т-клеток.

В пятом аспекте настоящего изобретения представлен способ получения клетки, более конкретно рекомбинантной клетки или популяции таких клеток (необязательно гомогенной или гетерогенной популяции клеток), при этом способ включает введение молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения и/или вектор в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения в клетку.

Указанный способ необязательно дополнительно включает стадию выбора клеток в соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения; например, отбор указанных клеток из гетерогенной популяции клеток, чтобы тем самым создать обогащенную и/или гомогенную популяцию клеток. Указанная стадия отбора может включать отбор на наличие одного или нескольких селектируемых маркеров, присутствующих в молекуле нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты, в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения, и/или векторе в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения.

В шестом аспекте настоящего изобретения представлен способ получения связывающей молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, например антитела или CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, при этом способ включает: экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом

настоящего изобретения и/или вектора в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения в клетке, более конкретно рекомбинантной клетке или популяции таких клеток (необязательно гомогенной или гетерогенной популяции клеток). Необязательно способ в соответствии с шестым аспектом настоящего изобретения может также включать стадию выделения полученной таким образом связывающей молекулы из клетки; например, при этом связывающая молекула представляет собой антитело в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, функциональный фрагмент указанного антитела или антитело его функционального фрагмента, который содержит последовательность слитого полипептида в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения. Указанные клетки необязательно могут быть выбраны из выделенных клеток, клеток *ex vivo* и клеток *in vitro*.

В седьмом аспекте настоящего изобретения представлена выделенная связывающая молекула, которую получают или можно получить с помощью способа по шестому аспекту настоящего изобретения, необязательно при этом выделенную связывающую молекулу дополнительно составляют для введения субъекту.

В восьмом аспекте настоящего изобретения представлен конъюгат, где конъюгат содержит фрагмент, конъюгированный со связывающей молекулой, как определено первым аспектом настоящего изобретения, или с функциональным фрагментом указанной связывающей молекулы. Без ограничения, указанный фрагмент может, например, представлять собой терапевтический, профилактический, диагностический, прогностический или терагностический фрагмент. В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой лекарственное средство (например, при этом конъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство («ADC»)) и/или радиоактивный фрагмент (например, при этом конъюгат применим для применения в радиоиммунотерапии («RIT»)).

В девятом аспекте настоящего изобретения представлен способ получения конъюгата в соответствии с восьмым аспектом настоящего изобретения, при этом способ включает стадии:

(a) получение связывающей молекулы, как определено первым аспектом настоящего изобретения, или функционального фрагмента указанной связывающей молекулы; и

(b) конъюгирование фрагмента со связывающей молекулой или с функциональным фрагментом указанной связывающей молекулы.

Способ по девятому аспекту настоящего изобретения может дополнительно включать стадию выделения полученного таким образом конъюгата. Таким образом, выделенный конъюгат может быть представлен в выделенной форме, например, в форме композиции, где по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9% или по сути 100% (по молярному соотношению) связывающей молекулы или функционального фрагмента указанной связывающей молекулы присутствует в форме конъюгата. В качестве дополнения или в качестве альтернативы выделенная форма конъюгата может представлять собой композицию, где по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9% или по сути 100% (по молярному соотношению) фрагмента присутствует в форме конъюгата. В девятом аспекте настоящего изобретения дополнительно представлены выделенный конъюгат или композиция, содержащая указанный выделенный конъюгат.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления конъюгата по восьмому аспекту настоящего изобретения или способа по девятому аспекту настоящего изобретения связывающая молекула представляет собой антитело в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, функциональный фрагмент указанного антитело или антитело его функционального фрагмента, который содержит слитую полипептидную последовательность в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения.

В десятом аспекте настоящего изобретения представлен выделенный конъюгат, который получен или может быть получен с помощью способа по девятому аспекту настоящего изобретения, необязательно при этом выделенный конъюгат дополнительно составлен для введения субъекту.

В одиннадцатом аспекте настоящего изобретения представлен способ борьбы с HCMV или заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, при этом способ включает введение субъекту, или *ex vivo* или *in vitro* в клеточный материал любого одного или нескольких средств, выбранных из группы, состоящей из:

i. связывающей молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения,

ii. функционального фрагмента указанной связывающей молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения,

iii. выделенной связывающей молекулы в соответствии с седьмым аспектом настоящего изобретения,

iv. молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения,

v. вектора в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения,

vi. клетки в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения,

vii. конъюгата в соответствии с восьмым аспектом настоящего изобретения, и

viii. выделенного конъюгата в соответствии с десятым аспектом настоящего изобретения.

Другими словами, в одиннадцатом аспекте настоящего изобретения представлен один или несколько из указанных средств для применения в борьбе с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, у субъекта или в клеточном материале *ex vivo* или *in vitro*.

Кроме того, в одиннадцатом аспекте настоящего изобретения представлено применение одного или нескольких из указанных средств при производстве лекарственного средства для борьбы с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, у субъекта или в клеточном материале *ex vivo* или *in vitro*.

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, с которым необходимо бороться в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может представлять собой инфекцию HCMV или быть ассоциировано с инфекцией HCMV. В одном варианте осуществления инфекция HCMV может представлять собой инфекцию одного штамма. Необязательно в альтернативном варианте осуществления инфекция HCMV включает мультиштаммовую инфекцию HCMV, где мультиштаммовая инфекция HCMV включает инфекцию более чем одним различным штаммом HCMV, например, двумя или более штаммами HCMV, которые кодируют разные белковые последовательности US28. Указанные два или более штамма могут кодировать белки US28, которые различаются в одной или нескольких внеклеточных областях, таких как N-концевая область (ECD1), первая область внеклеточной петли (ECD2), вторая область внеклеточной петли (ECD3), и/или третья область внеклеточной петли (ECD4). В одном варианте осуществления, представляющем интерес, каждый из двух или более штаммов HCMV при мультиштаммовой инфекции HCMV кодирует белок US28, который отличается от другого по меньшей мере в одном или нескольких положениях N-концевой (ECD1) области; например, они могут различаться в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 или более аминокислотных положениях в N-концевой (ECD1) области. В качестве дополнения или в качестве альтернативы в другом варианте осуществления, представляющем интерес,

каждый из двух или более штаммов HCMV при мультиштаммовой инфекции HCMV кодирует белок US28, который отличается от другого в одном или нескольких положениях области второй внеклеточной петли (ECD3), например, один или несколько штаммов HCMV при инфекции, состоящей из нескольких штаммов HCMV, могут кодировать белок US28, который кодирует 4N-вариант ECD3, а один или несколько других штаммов HCMV при инфекции, состоящей из нескольких штаммов HCMV, могут кодировать белок US28, который кодирует 4D-вариант ECD3.

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, с которым необходимо бороться в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может представлять собой латентную инфекцию HCMV (например, одноштаммовую или мультиштаммовую латентную инфекцию HCMV) или быть ассоциировано с латентной инфекцией HCMV (необязательно мультиштаммовой латентной инфекцией HCMV).

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, с которым необходимо бороться в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может представлять собой литическую инфекцию HCMV (необязательно мультиштаммовую литическую инфекцию HCMV) или быть ассоциировано с литической инфекцией HCMV (необязательно мультиштаммовой литической инфекцией HCMV).

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, с которым необходимо бороться в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может представлять собой врожденную инфекцию HCMV (например, одноштаммовую или мультиштаммовую инфекцию), такую как латентная врожденная одноштаммовая или мультиштаммовая инфекция HCMV или литическая врожденная одноштаммовая или мультиштаммовая инфекция HCMV.

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, с которым необходимо бороться в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может представлять собой рак, например инфицированный HCMV рак (необязательно одноштаммовый или мультиштаммовый инфицированный HCMV рак), такой как латентный инфицированный HCMV рак (необязательно одноштаммовый или мультиштаммовый латентный инфицированный HCMV рак).

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, с которым необходимо бороться в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может представлять собой эпителиальный рак; необязательно при этом эпителиальный рак представляет собой рак молочной железы; например, при этом рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы (TNBC) или HER2-

положительный рак молочной железы. HER2-положительный рак молочной железы может, например, представлять собой HER2+ HR- (где HR- означает отрицательный по рецептору гормонов статус и относится к отрицательному по рецептору эстрогена (ER-) и отрицательному по рецептору прогестерона (PR-) статусу); или HER2+ ER+ PR-; или HER2+ ER- PR+; или трижды положительную форму рака молочной железы «ТРВС», то есть HER2+ ER+ PR+. Отмечается, что HER2+ HR- представляет собой особенно агрессивную форму рака молочной железы и представляет большой интерес для диагностики и лечения в соответствии с настоящим изобретением. Указанные формы эпителиального рака необязательно могут представлять собой одноштаммовую или мультиштаммовую форму инфицированного HCMV эпителиального рака, например, латентную инфицированную HCMV форму эпителиального рака (необязательно одноштаммовый или мультиштаммовый латентный инфицированный HCMV рак).

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, с которым необходимо бороться в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может представлять собой метастазирующую и/или агрессивную форму рака. Указанные формы метастазирующего и/или агрессивного рака могут необязательно представлять собой одноштаммовую или мультиштаммовую инфицированную HCMV форму метастазирующего и/или агрессивного рака, например, латентную инфицированную HCMV форму метастазирующего и/или агрессивного рака (необязательно одноштаммового или мультиштаммового латентного инфицированного HCMV рака).

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, с которым необходимо бороться в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может представлять собой глиобластому. В другом варианте осуществления, описанном в данном документе, заболевание или состояние не является глиобластомой и/или у субъекта, подлежащего лечению, не имеет глиобластомы и/или у него не было диагностировано наличие глиобластомы.

В некоторых вариантах осуществления субъект (или клеточный материал *ex vivo* или *in vitro*), подлежащий лечению в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может иметь и/или был диагностирован как имеющий или обладающий инфицированными HCMV раковыми клетками, такими как латентные инфицированные HCMV раковые клетки.

В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может быть или

предположительно может быть реципиентом клеточного материала, например, донирования клеточного продукта. Указанный клеточный продукт может, например, содержать, состоять по сути или состоять из живого клеточного материала *ex vivo*, выбранного из группы, которая включает: один или несколько типов клеток *ex vivo*; один или несколько типов клеточных культур *ex vivo*; один или несколько типов тканей *ex vivo*; один или несколько типов культур тканей *ex vivo*; один или несколько типов органов *ex vivo*; и/или один или несколько типов культур органов *ex vivo*. Необязательно, клеточный продукт может быть получен прямо или опосредованно от живого донора.

В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может быть или предположительно может быть донором клеточного материала, например, донором клеточного продукта. Указанный клеточный продукт может включать, состоять из любой одной или нескольких клеток, ткани или органа от указанного донора.

В некоторых вариантах осуществления клеточный материал *ex vivo* или *in vitro*, подлежащий обработке в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может представлять собой клеточный продукт *ex vivo*. Указанный клеточный продукт *ex vivo* может, например, содержать, состоять по сути или состоять из живого клеточного материала *ex vivo*, выбранного из группы, которая включает: один или несколько типов клеток *ex vivo*; один или несколько типов клеточных культур *ex vivo*; один или несколько типов тканей *ex vivo*; один или несколько типов культур тканей *ex vivo*; один или несколько типов органов *ex vivo*; и/или один или несколько типов культур органов *ex vivo*. Необязательно, клеточный продукт может быть получен прямо или опосредованно от живого донора.

В одном варианте осуществления один или несколько средств, подлежащих применению в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, могут, например, быть (или включать одно или несколько средств) выбраны из группы, состоящей из:

i. терапевтического антитела, как определено первым аспектом настоящего изобретения,
ii. функционального фрагмента указанного терапевтического антитела, как определено первым аспектом настоящего изобретения,
iii. терапевтического антитела, которое содержит слитую полипептидную последовательность, как определено первым аспектом настоящего изобретения; и

iv. функционального фрагмента указанного терапевтического антитела, который содержит последовательность слитого полипептида, как определено первым аспектом настоящего изобретения.

Например, одно или несколько средств, применяемых в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, могут представлять собой (или включать одно или несколько средств, выбранных из) биспецифическое антитело, как определено первым аспектом настоящего изобретения. Без ограничения, это может быть антитело на основе привлекающего иммунные клетки биспецифического активатора. Иллюстративным вариантом осуществления является антитело на основе привлекающих Т-клетки биспецифического активатора (BiTE), необязательно при этом в дополнение к области, которая содержит связывающую молекулу по первому аспекту настоящего изобретения, которая имеет специфичность связывания в отношении области ECD3 белка US28, антитело BiTE дополнительно содержит домен, связывающий Т-клетки, такой как CD3-связывающий домен.

В дополнительном варианте осуществления одно или несколько средств, подлежащих применению в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, могут, например, представлять собой (или включать) конъюгат в соответствии с восьмым аспектом настоящего изобретения и/или десятым аспектом настоящего изобретения, такой как конъюгат, который представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство («ADC»), или конъюгат, который содержит радиоактивный фрагмент, такой как конъюгат, который является подходящим для применения в радиоиммунотерапии («RIT»).

В другом варианте осуществления один или несколько средств, которые поделжат применению в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, могут, например, представлять собой (или включать) клетку (или популяцию клеток, например гомогенную популяцию клеток), в которой указанная или каждая клетка содержит CAR в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения. Указанную клетку или популяцию клеток обычно выделяют и/или составляют для введения субъекту. Указанная или каждая клетка может, например, содержать CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный CAR, необязательно при этом указанная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту или вектор, как определено вторым или третьим аспектами настоящего изобретения соответственно. Например, указанная или каждая клетка может представлять собой клетку в соответствии с четвертым аспектом настоящего

изобретения. Без ограничения указанная клетка или клетки могут быть выбраны, например, из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK) и макрофага. Соответственно, клетка может необязательно представлять собой CAR-T-клетку, CAR-NK-клетку или CAR-макрофаг, и необязательно, когда клетка представляет собой CAR-T-клетку, тогда, например, Т-клетка может быть выбрана из группы, состоящей из CD8+ Т-клеток, CD4+ Т-клеток, эффекторных Т-клеток, Т-клеток-хелперов, Т-клеток памяти, цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), EBV-специфического Т-клеточного рецептора (TCR) или подтипов γδ-Т-клеток.

Необязательно в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, субъекту можно вводить дополнительное вещество, такое как дополнительное терапевтическое, профилактическое, диагностическое, прогностическое или терагностическое вещество, и необязательно при этом дополнительное вещество можно вводить отдельно, последовательно или одновременно с указанным или каждым из одного или нескольких средств.

Соответственно, в одиннадцатом аспекте настоящего изобретения также представлен способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, путем введения субъекту терапевтического, профилактического, диагностического, прогностического или терагностического вещества, при этом субъекта также лечат отдельно, последовательно (для например, до или после), или одновременно указанными или каждым из одного или нескольких средств.

В варианте осуществления, в котором лечение является одновременным, указанное одно или несколько средств, подлежащих применению в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, могут быть составлены и/или введены в комбинации с терапевтическими, профилактическими, диагностическими, прогностическими или терагностическими веществами; или могут быть составлены отдельно, но введены одновременно в виде двух отдельных составов.

Например, в одном варианте осуществления заболевание или состояние, подлежащее лечению, может представлять собой форму рака (такую как одна или несколько форм рака, раскрытых выше), а дополнительное терапевтическое, профилактическое, диагностическое, прогностическое или терагностическое вещество может быть нацелено на рак.

В двенадцатом аспекте настоящего изобретения представлено средство для применения в медицине, при этом средство выбрано из группы, состоящей:

i. связывающей молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения,

ii. функционального фрагмента указанной связывающей молекулы, как определено первым аспектом настоящего изобретения,

iii. выделенной связывающей молекулы в соответствии с седьмым аспектом настоящего изобретения,

iv. молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения,

v. вектора в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения,

vi. клетки в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения,

vii. конъюгата в соответствии с восьмым аспектом настоящего изобретения, и

viii. выделенного конъюгата в соответствии с десятым аспектом настоящего изобретения.

Указанное средство может, например, представлять собой средство, определенное выше в отношении одиннадцатого аспекта настоящего изобретения.

В тринадцатом аспекте настоящего изобретения представлен пептид или полипептид, содержащий, состоящий по сути или состоящий из последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), или содержащий последовательность иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 6. Указанный пептид или полипептид не является белком US28. Предпочтительно единственной последовательностью, полученной из US28, в указанном пептиде или полипептиде является последовательность SEQ ID NO: 6 или последовательность иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 6.

В четырнадцатом аспекте настоящего изобретения представлен пептид или полипептид, содержащий, состоящий по сути или состоящий из последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7), или содержащий последовательность иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 7. Указанный пептид или полипептид не является белком US28. Предпочтительно единственной последовательностью, полученной из US28, в указанном пептиде или полипептиде является последовательность SEQ ID NO: 7 или последовательность иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 7.

Иммуногенный фрагмент эталонной последовательности SEQ ID NO: 6 или 7 в соответствии с тринадцатым или четырнадцатым аспектом настоящего изобретения соответственно содержит менее чем полную последовательность эталонной

последовательности и предпочтительно содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 последовательных аминокислот эталонной последовательности.

В одном варианте осуществления иммуногенный фрагмент пептида или полипептида по тринадцатому и/или четырнадцатому аспекту настоящего изобретения содержит, состоит по сути или состоит из последовательности, которая является общей и присутствует в обеих SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7.

В тринадцатом и четырнадцатом аспектах настоящего изобретения также представлены пептиды или полипептиды, содержащие, состоящие или состоящие по сути из иммуногенного фрагмента или варианта эталонной последовательности, выбранной из TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6) или TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7) соответственно, где иммуногенный фрагмент или вариант содержит последовательность эпитопа в ECD3 US28, которая связывается любым из антител 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8, как описано в данном документе (включая также scFv, содержащий полипептидную последовательность V_H, имеющую последовательность V_H 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8, как определено SEQ ID NO: 12, 104, 122, 68 и 88 соответственно, и полипептидную последовательность V_L, имеющую последовательность V_L 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8, как определено SEQ ID NO: 18, 108, 126, 72 и 92 соответственно). Предпочтительно указанные пептиды или полипептиды специфически связываются 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8.

В пятнадцатом аспекте настоящего изобретения представлена комбинация по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов, содержащая первый пептид или полипептид и второй пептид или полипептид, где:

первый пептид или полипептид содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), или ее иммуногенного фрагмента, такого как иммуногенный фрагмент, как определено тринадцатым аспектом настоящего изобретения, при условии, что указанный иммуногенный фрагмент содержит по меньшей мере 4N аминокислоту SEQ ID NO: 6; и

второй пептид или полипептид содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7) или ее иммуногенного фрагмента, такого как иммуногенный фрагмент, как определено четырнадцатым аспектом настоящего изобретения, при условии, что указанный иммуногенный фрагмент содержит по меньшей мере 4D аминокислоту SEQ ID NO: 7.

В шестнадцатом аспекте настоящего изобретения представлен слитый белок, содержащий, состоящий по сути из или состоящий из первой аминокислотной

последовательности, слитой либо непосредственно, либо через одну или несколько линкерных аминокислотных последовательностей со второй аминокислотной последовательностью, при этом первая аминокислотная последовательность представляет собой последовательность пептида или полипептида, как определено тринадцатым или четырнадцатым аспектом настоящего изобретения; и вторая аминокислотная последовательность представляет собой партнера по слиянию.

Необязательно партнером по слиянию является белок-носитель, такой как белок-носитель, который выбран для получения слитого белка, подходящего для иммунизации и получения антител против первой аминокислотной последовательности. Например, белок-носитель может быть выбран из группы, состоящей из гемоцианина лимфы улитки (KLH), HSA (человеческого сывороточного альбумина), BSA (бычьего сывороточного альбумина), OVA (овальбумина), столбнячного анатоксина (TT), дифтерийного анатоксина (DT), генетически модифицированный перекрестно реагирующего материала (CRM) дифтерийного токсина, белкового комплекса внешней мембраны менингококка (OMPC) и белка D *H. influenzae* (HiD).

В семнадцатом аспекте настоящего изобретения представлена комбинация по меньшей мере двух различных слитых белков, содержащая первый слитый белок и второй слитый белок, где:

первый слитый белок в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения содержит в качестве первой аминокислотной последовательности первого слитого белка последовательность, которая содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6) или ее иммуногенного фрагмента или варианта, при условии, что указанный иммуногенный фрагмент или вариант содержит 4N аминокислоту SEQ ID NO: 6; и

второй слитый белок в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения содержит в качестве первой аминокислотной последовательности второго слитого белка последовательность, которая содержит, состоит по сути или состоит из последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7) или ее иммуногенного фрагмента или варианта, при условии, что указанный иммуногенный фрагмент или вариант содержит 4D аминокислоту SEQ ID NO: 7.

В восемнадцатом аспекте настоящего изобретения представлен конъюгат, содержащий фрагмент, конъюгированный с пептидом или полипептидом, как определено одним или обоими из тринадцатого и четырнадцатого аспектов настоящего

изобретения, или со слитым белком, как определено шестнадцатым аспектом настоящего изобретения.

Фрагмент указанного конъюгата может быть конъюгирован непосредственно с пептидом или полипептидом, как определено одним или обоими из тринадцатого и четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, или со слитым белком, как определено шестнадцатым аспектом настоящего изобретения. В качестве альтернативы фрагмент указанного конъюгата может быть конъюгирован опосредованно, например, через линкер, с пептидом или полипептидом, как определено одним или обоими из тринадцатого и четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, или со слитым белком, как определено шестнадцатым аспектом настоящего изобретения.

Необязательно фрагмент может представлять собой носитель, например, белок-носитель, такой как носитель, выбранный из KLH (гемоцианин лимфы улитки), HSA (сывороточный альбумин человека), BSA (бычий сывороточный альбумин), OVA (овальбумин), столбнячный анатоксин (TT), дифтерийный анатоксин (DT), генетически модифицированный перекрестно реагирующий материал (CRM) дифтерийного токсина, белковый комплекс наружной мембраны менингококка (OMPC) и белок D *H. influenzae* (HiD).

В девятнадцатом аспекте настоящего изобретения представлена комбинация по меньшей мере двух различных конъюгатов, при этом комбинация содержит:

первый конъюгат в соответствии с восемнадцатым аспектом настоящего изобретения, где первый конъюгат содержит, состоит по сути из или состоит из фрагмента, конъюгированного с пептидом или полипептидом, где пептид или полипептид содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6) или ее иммуногенного фрагмента или варианта, при условии, что указанный иммуногенный фрагмент или вариант содержит 4N аминокислоту SEQ ID NO: 6; и

второй конъюгат в соответствии с восемнадцатым аспектом настоящего изобретения, где второй конъюгат содержит, состоит по сути из или состоит из фрагмента, конъюгированного с пептидом или полипептидом, где пептид или полипептид содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7) или ее иммуногенного фрагмента или варианта, при условии, что указанный иммуногенный фрагмент или вариант содержит 4D аминокислоту SEQ ID NO: 7.

В двадцатом аспекте настоящего изобретения представлен способ получения конъюгата в соответствии с девятнадцатым аспектом настоящего изобретения, при этом способ включает стадии:

(a) получение пептида или полипептида, как определено одним или обоими из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, их комбинации, как определено пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, или слитого белка, как определено шестнадцатым аспектом настоящего изобретения; и

(b) конъюгирование с ними фрагмента.

В двадцать первом аспекте настоящего изобретения представлен способ получения комбинации по меньшей мере двух различных конъюгатов, как определено девятнадцатым аспектом настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления способ включает стадии: (a) получение или продуцирование первого конъюгата, как определено восемнадцатым аспектом настоящего изобретения, с помощью способа в соответствии с двадцатым аспектом настоящего изобретения; (b) получение или продуцирование второго конъюгата, как определено восемнадцатым аспектом настоящего изобретения, с помощью способа в соответствии с двадцатым аспектом настоящего изобретения (где первый и второй конъюгаты различаются); и (c) объединение первого и второго конъюгатов с образованием таким образом комбинации в соответствии с девятнадцатым аспектом настоящего изобретения.

В другом варианте осуществления способ включает стадии: (a) получение комбинации по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения или комбинации по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения; и (b) конъюгирование фрагмента с комбинацией по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения или с комбинацией по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения, за счет чего образуется комбинация в соответствии с девятнадцатым аспектом настоящего изобретения.

Способы двадцатого или двадцать первого аспекта настоящего изобретения необязательно включают стадию выделения полученного таким образом конъюгата или комбинации конъюгатов.

В двадцать втором аспекте настоящего изобретения представлен выделенный конъюгат или комбинация конъюгатов, которые получены или могут быть получены с помощью способа по любому из двадцатого или двадцать первого аспекта настоящего изобретения, необязательно при этом выделенный конъюгат представляет собой дополнительно составлен для введения субъекту.

В двадцать третьем аспекте настоящего изобретения представлена молекула нуклеиновой кислоты или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты, при этом молекула нуклеиновой кислоты содержит или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты вместе содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, которые, отдельно или в комбинации кодируют один или несколько пептидов и/или полипептидов в соответствии с одним или обоими из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинацию по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, слитый белок в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения и/или комбинацию по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения.

Указанная или каждая молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с двадцать третьим аспектом настоящего изобретения может быть, например, независимо выбрана из молекулы ДНК или РНК. Указанная или каждая молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с двадцать третьим аспектом настоящего изобретения может быть, например, независимо выбрана из одноцепочечной или двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты.

В двадцать четвертом аспекте настоящего изобретения представлен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с двадцать третьим аспектом настоящего изобретения. Можно применять любой вектор, хотя без ограничений указанный вектор необязательно может быть выбран из группы, состоящей из ретровирусного вектора, плазмиды, лентивирусного вектора и аденовирусного вектора.

В двадцать пятом аспекте настоящего изобретения представлена клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с двадцать третьим аспектом настоящего изобретения, или вектор в соответствии с двадцать четвертым аспектом настоящего изобретения. Необязательно клетка экспрессирует один или несколько пептидов или

полипептидов, выбранных из одного или обоих из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинацию по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, слитый белок в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения и/или комбинацию по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения.

В двадцать шестом аспекте настоящего изобретения представлена клетка, которая подвергается воздействию и/или содержит один или несколько пептидов или полипептидов, выбранных из одного или обоих из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинацию по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, слитый белок в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения и/или комбинацию по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения, конъюгат в соответствии с восемнадцатым аспектом настоящего изобретения, комбинацию по меньшей мере двух различных конъюгатов в соответствии с девятнадцатым аспектом настоящего изобретения, молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с двадцать третьим аспектом настоящего изобретения и/или вектор в соответствии с двадцать четвертым аспектом настоящего изобретения.

В двадцать седьмом аспекте настоящего изобретения представлен способ выделения и/или обогащения клеток, содержащих Т-клеточный рецептор (TCR) со специфичностью в отношении эпитопа в ECD3 US28 (например, встречающиеся в природе Т-клетки или рекомбинантные клетки, экспрессирующие CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, например CAR Т-клетки, CAR NK-клетки и/или CAR-макрофаги), при этом способ включает стадию применения одного или нескольких средств для выделения и/или обогащения клеток со специфичностью связывания в отношении одной или обеих из последовательностей SEQ ID NO: 6 и/или 7,

где один или несколько средств выбраны из группы, состоящей из пептида или полипептида в соответствии с одним или обоими из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинации по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, слитый белок в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего

изобретения и/или комбинации по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения, конъюгат в соответствии с восемнадцатым аспектом настоящего изобретения и/или комбинации по меньшей мере двух различных конъюгатов в соответствии с девятнадцатым аспектом настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления способа по двадцать седьмому аспекту настоящего изобретения последовательности могут быть составлены в виде тетрамера MHC, например, тетрамера MHC класса I для антигенспецифического обнаружения $CD8^+$ Т-клеток, тетрамера MHC класса II для антигенспецифического обнаружения $CD4^+$ Т-клеток или меченого флуорофором тетрамера для проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии. Необязательно Т-клетка может быть выбрана из группы, состоящей из $CD8^+$ Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток, эффекторных Т-клеток, Т-клеток-хелперов, Т-клеток памяти, цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), EBV-специфического Т-клеточного рецептора (TCR). или подтипов γδ-Т-клеток.

В двадцать восьмом аспекте настоящего изобретения представлен тетрамер MHC, содержащий пептид или полипептид в соответствии с пептидом или полипептидом в соответствии с одним или обоими из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинация по меньшей мере двух различных пептидов и /или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, необязательно при этом указанный или каждый пептид содержит или соответствует SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:7, или иммуногенному фрагменту любого из них или обоих, например, при этом тетрамер MHC представляет собой тетрамер MHC класса I для обнаружения антигенспецифических $CD8^+$ Т-клеток, тетрамер MHC класса II для обнаружения антигенспецифических $CD4^+$ Т-клеток, меченый флуорофором тетрамер для проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии. Тетрамер MHC можно дополнительно применять для выделения и/или обогащения клеток, содержащих Т-клеточный рецептор (TCR) со специфичностью в отношении эпитопа в ECD3 US28, например, Т-клетку, выбранную из группы, состоящей из $CD8^+$ Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток, эффекторных Т-клеток, Т-клеток-хелперов, Т-клеток памяти, цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), EBV-специфического Т-клеточного рецептора (TCR) или подтипов γδ-Т-клеток и/или рекомбинантной клетки, экспрессирующей CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, например, CAR Т-клетки, CAR NK-клетки и/или CAR-макрофага.

В двадцать девятом аспекте настоящего изобретения представлена вакцинная композиция, подходящая для применения в вакцинации, снижении риска, предупреждении или борьбе с заболеванием или состоянием, ассоциированным с цитомегаловирусом человека (HCMV). Вакцина может представлять собой активную или пассивную вакцину. Активная вакцина в соответствии с двадцать девятым аспектом настоящего изобретения может запускать иммунный ответ, направленный на эпитоп, присутствующий в ECD3 белка US28 HCMV. Пассивная вакцина в соответствии с двадцать девятым аспектом настоящего изобретения может представлять собой композицию, которая обеспечивает иммунный ответ, направленный на эпитоп, присутствующий в ECD3 белка US28 HCMV. Как обсуждалось выше в контексте других аспектов настоящего изобретения, ECD3 белка US28 содержит, состоит по сути из или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в белке US28, кодируемой штаммом HCMV в положениях, соответствующих положениям 167-183 белка US28, кодируемого штаммом DB цитомегаловируса человека (HCMV), как указано в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по двадцать девятому аспекту настоящего изобретения запускает и/или обеспечивает иммунный ответ:

(a) в отношении одного или нескольких эпитопов, полностью присутствующих во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 HCMV;

(b) в отношении одного или нескольких линейных эпитопов в ECD3 белка US28;

(c) в отношении одного или нескольких эпитопов в ECD3 белка US28 HCMV, который представляет собой эпитоп или эпитопы, присутствующие в идентичной форме как в 4D-вариантных штаммах, так и в 4N-вариантных штаммах HCMV, при этом 4D-вариантный штамм HCMV кодирует белок US28, содержащий ECD3, имеющий последовательность TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7), и при этом 4N-вариантный штамм HCMV кодирует белок US28, содержащий ECD3, имеющий последовательность TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6); и/или

(d) при этом иммунный ответ, который запускается или обеспечивается вакциной, является агностическим в отношении штамма HCMV по отношению к 4D-вариантным штаммам и 4N-вариантным штаммам HCMV, и запускает и/или обеспечивает иммунный ответ, направленный на один или несколько из 4D-вариантных штаммов HCMV, выбранных из Towne, VR1814, TB40/E, Merlin, JP, Ad169, VHL/E, BL, AF1 и DAVIS, а

также направленный на один или несколько 4N-вариантных штаммов HCMV, выбранных из Toledo, TR и DB.

Указанная вакцинная композиция может представлять собой пассивную вакцину и/или необязательно содержать: (a) одну или несколько связывающих молекул в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, (b) один или несколько функциональных фрагментов указанной одной или нескольких связывающих молекул, как определено в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, (c) одну или несколько выделенных связывающих молекул в соответствии с седьмым аспектом настоящего изобретения, (d) одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения, (e) один или несколько векторов в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, (f) одну или несколько клеток в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения, (g) один или несколько конъюгатов в соответствии с восьмым аспектом настоящего изобретения и/или (h) один или несколько выделенных конъюгатов в соответствии с десятым аспектом настоящего изобретения.

В качестве альтернативы указанная вакцинная композиция может представлять собой активную вакцину и/или необязательно содержать:

(a) один или несколько пептидов или полипептидов в соответствии с одним или обоими из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинации по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, слитый белок в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения, комбинации по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения, конъюгат в соответствии с восемнадцатым аспектом настоящего изобретения и/или комбинации по меньшей мере двух различных конъюгатов в соответствии с девятнадцатым аспектом настоящего изобретения.

(b) одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с двадцать третьим аспектом настоящего изобретения и/или вектор в соответствии с двадцать четвертым аспектом настоящего изобретения; и/или

(c) клетку, такую как антигенпрезентирующая клетка (например, дендритная клетка), или гомогенную или гетерогенную популяцию указанных клеток, где указанная или каждая из указанных клеток нагружена одним или несколькими из следующих

веществ: пептидом или полипептидом в соответствии с одним или обоими из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинацией по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, слитым белком в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения, комбинацией по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения, конъюгатом в соответствии с восемнадцатым аспектом настоящего изобретения, комбинацией по меньшей мере двух различных конъюгатов в соответствии с девятнадцатым аспектом настоящего изобретения, одной или несколькими молекулами нуклеиновой кислоты или комбинацией множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с двадцать третьим аспектом настоящего изобретения и/или вектором в соответствии с двадцать четвертым аспектом настоящего изобретения.

В тридцатом аспекте настоящего изобретения представлен способ вакцинации, снижения риска, предупреждения и/или борьбы с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, при этом способ включает введение субъекту вакцины в соответствии с двадцать девятым аспектом настоящего изобретения.

В тридцатом аспекте настоящего изобретения представлена вакцина в соответствии с двадцать девятым аспектом настоящего изобретения для применения в вакцинации, снижении риска, предупреждении и/или борьбе с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, у субъекта.

В тридцатом аспекте настоящего изобретения представлено применение вакцины в соответствии с двадцать девятым аспектом настоящего изобретения при производстве лекарственного препарата для вакцинации против, снижения риска, предупреждения и/или борьбы с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV.

Указанное заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, может, например, представлять собой заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, как раскрыто выше в контексте одиннадцатого аспекта настоящего изобретения. Необязательно заболевание или состояние представляет собой латентную инфекцию HCMV или представляет собой заболевание или состояние, ассоциированное с латентной инфекцией HCMV.

В некоторых вариантах осуществления способ вакцинации против, снижения риска, предупреждения и/или борьбы с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, может включать введение вакцины субъекту только один раз.

В других вариантах осуществления способ вакцинации против, снижения риска, предупреждения и/или борьбы с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, может включать введение вакцины субъекту дважды или несколько раз. Например, в варианте осуществления, в котором вакцина представляет собой активную вакцину, может быть целесообразным отдельно ввести субъекту первичную дозу и последующую бустерную дозу.

В тридцать первом аспекте настоящего изобретения представлен способ оценки одного или нескольких биологических состояний и/или биологических характеристик субъекта и/или биологического материала *ex vivo*, при этом способ включает: (a) приведение субъекта и/или биологический материал *ex vivo* в контакт со связывающей молекулой, например, как определено первым аспектом настоящего изобретения, или конъюгатом, например, как определено восьмым или десятым аспектом настоящего изобретения; и (b) проведение оценки субъекта и/или биологического материала *ex vivo* на основе прямого и/или опосредованного измерения связывания связывающей молекулы или конъюгата с субъектом и/или биологическим материалом *ex vivo*.

В некоторых вариантах осуществления способ оценки (который может включать диагностику) одного или нескольких биологических состояний и/или биологических характеристик субъекта и/или биологического материала *ex vivo* представляет собой гибридизацию in situ (ISH) для специфического обнаружения одного или нескольких последовательностей нуклеиновой кислоты, кодируемых HCMV, наиболее предпочтительно, когда указанный ISH не обнаруживает последовательности нуклеиновой кислоты, кодируемые здоровым (т.е. не инфицированным HCMV) субъектом и/или здоровым биологическим материалом *ex vivo*. В качестве неограничивающего примера ISH может использовать последовательности нуклеиновой кислоты, как обсуждается в разделе «Примеры» настоящей заявки. В некоторых вариантах осуществления биологическое состояние представляет собой рак и/или биологические характеристики связаны с раком. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из одного или нескольких видов рака, указанных в данном документе, необязательно при этом рак не является глиобластомой. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из: рака молочной железы (например, HER2+ рака молочной железы или трижды негативного рака молочной железы), астроцитомы, глиобластомы, рака коры надпочечников, рака почки, саркомы сердца, рака печени и различных видов рака гладкой мускулатуры сосудов; необязательно при этом рак не является глиобластомой.

В некоторых вариантах осуществления способ оценки (который может включать диагностику) одного или нескольких биологических состояний и/или биологических характеристик субъекта и/или биологического материала *ex vivo* осуществляется с помощью иммуногистохимии (IHC) для специфического обнаружения одной или нескольких белковых последовательностей, кодируемых HCMV, наиболее предпочтительно, когда указанная IHC не обнаруживает белковые последовательности, кодируемые здоровым (т.е. не инфицированным HCMV) субъектом и/или здоровым биологическим материалом *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления в IHC используется связывающая молекула, которая позволяет специфически обнаруживать одну или несколько белковых последовательностей, которые экспрессируются только или экспрессируются только поверхностно при латентной инфекции HCMV. В некоторых вариантах осуществления в IHC используется связывающая молекула, которая позволяет специфически обнаруживать одну или несколько белковых последовательностей, которые экспрессируются только или экспрессируются только поверхностно при литической инфекции HCMV. В некоторых вариантах осуществления в IHC используется связывающая молекула, которая позволяет специфически обнаруживать одну или несколько экспрессируемых белковых последовательностей, например, поверхностно экспрессируемых как при литических, так и при латентных инфекциях HCMV. В некоторых вариантах осуществления IHC можно проводить (например, с использованием биологической ткани, в которой клетки не пермеабилизированы) для обеспечения только обнаружения белков, экспрессируемых на клеточной поверхности. В других вариантах осуществления IHC можно проводить (например, с использованием биологической ткани, в которой клетки пермеабилизированы) для обеспечения обнаружения внутриклеточных белков. В качестве неограничивающих примеров в IHC может использоваться молекула на основе антитела для специфического обнаружения одной или нескольких белковых последовательностей, кодируемых HCMV, как обсуждается в разделе «Примеры» настоящей заявки, и/или с использованием одной или нескольких связывающих молекулы по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления биологическое состояние представляет собой рак и/или биологические характеристики связаны с раком. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из одного или нескольких видов рака, указанных в данном документе, необязательно при этом рак не является глиобластомой. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из: рака молочной железы (например, HER2+ рака молочной железы или

трижды негативного рака молочной железы), астроцитомы, глиобластомы, рака коры надпочечников, рака почки, саркомы сердца, рака печени и различных видов рака гладкой мускулатуры сосудов; необязательно при этом рак не является глиобластомой.

Субъект и/или живой биологический материал *ex vivo*, в котором инфекция HCMV была положительно идентифицирована в соответствии с тридцать вторым аспектом настоящего изобретения, может представлять собой иллюстративного субъекта и/или материал, которые можно лечить в соответствии с другими аспектами настоящего изобретения, как описано в данном документе.

В тридцать втором аспекте настоящего изобретения представлен способ борьбы с инфекцией HCMV (такой как латентная инфекция HCMV, и/или литическая инфекция HCMV, и/или мультиштаммовая инфекция HCMV) в живом биологическом материале *ex vivo*, при этом способ включает приведение живого биологического материала *ex vivo* в контакт с любым одним или несколькими средствами, выбранными из группы, состоящей из:

i. связывающей молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения,

ii. функционального фрагмента указанной связывающей молекулы, как определено первым аспектом настоящего изобретения,

iii. выделенной связывающей молекулы в соответствии с седьмым аспектом настоящего изобретения,

iv. молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения,

v. вектора в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения,

vi. клетки в соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения,

vii. конъюгата в соответствии с восьмым аспектом настоящего изобретения, и

viii. выделенного конъюгата в соответствии с десятым аспектом настоящего изобретения.

В тридцать втором аспекте настоящего изобретения также представлен живой биологический материал *ex vivo*, который получен или может быть получен с помощью способа по данному аспекту.

В одном варианте осуществления способа по тридцать второму аспекту настоящего изобретения и/или живого биологического материал*а ex vivo*, полученного или получаемого с помощью него, живой биологический материал *ex vivo* содержит,

состоит по сути из или состоит из живого биологического материала *ex vivo*, выбранного из группы, которая включает: один или несколько типов клеток *ex vivo*; один или несколько типов клеточных культур *ex vivo*; один или несколько типов тканей *ex vivo*; один или несколько типов культур тканей *ex vivo*; один или несколько типов органоидов *ex vivo*; один или несколько типов культур органоидов *ex vivo*; один или несколько типов органов *ex vivo*; и/или один или несколько типов культур органов *ex vivo*.

В тридцать третьем аспекте настоящего изобретения представлен способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту живого биологического материала *ex vivo*, как определено тридцать вторым аспектом настоящего изобретения.

Например, способ может представлять собой способ трансплантации живого биологического материала *ex vivo*, такой как трансплантат органа или ткани. Указанный способ можно применять для предупреждения или снижения риска передачи инфекции HCMV или заболевания или состояния, ассоциированного с инфекцией HCMV, у реципиента трансплантата.

В тридцать четвертом аспекте настоящего изобретения представлен способ скрининга связывающей молекулы, имеющей специфичность связывания и/или аффинность связывания в отношении эпитопа во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV), при этом способ включает:

(a) получение одного или нескольких пептидов, соответствующих аминокислотной последовательности, присутствующей в ECD3 белка US28,

(b) получение одной или нескольких связывающих молекул-кандидатов;

(c) определение специфичности связывания и/или аффинности связывания одной или нескольких связывающих молекул-кандидатов с одним или несколькими пептидами.

В тридцать пятом аспекте настоящего изобретения представлен способ получения композиции, которая содержит множество копий связывающей молекулы, при этом указанный способ включает воспроизведение выбранной связывающей молекулы-кандидата, которая была выбрана в соответствии со способом по тридцать четвертому аспекту настоящего изобретения.

В тридцать шестом аспекте настоящего изобретения представлен способ оценки выбранной связывающей молекулы-кандидата, которая была выбрана в соответствии со способом по тридцать четвертому аспекту настоящего изобретения и/или получена в соответствии со способом по тридцать пятому аспекту настоящего изобретения, при

этом указанный способ включает и идентифицирует структуру(ы) внутри выбранной связывающей молекулы-кандидата, которая обеспечивает ее характеристики связывания (в частности, специфичность связывания и/или аффинность связывания в отношении эпитопа во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV)), например, путем идентификации указанной или каждой последовательности CDR в выбранной связывающей молекуле-кандидате, которая представляет собой антитело или CAR.

В тридцать седьмом аспекте настоящего изобретения представлен способ получения композиции, которая содержит множество копий связывающей молекулы, имеющей специфичность связывания и/или аффинность связывания с эпитопом во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV), где указанная связывающая молекула содержит указанную или каждую из структуры(тур) (например, последовательностей CDR), которые были идентифицированы в выбранной связывающей молекуле-кандидате как обеспечивающие ее характеристики связывания, в соответствии со способом по тридцать шестому аспекту настоящего изобретения, где указанный способ включает воспроизведение связывающей молекулы.

В тридцать седьмом аспекте настоящего изобретения дополнительно представлена композиция связывающей молекулы, полученная с помощью того же аспекта.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1. Анализ на основе вестерн-блоттинга использовали для проверки экспрессии белка US28 в трансформированных клетках CHO-US28-A1 с использованием Ab к HIS. Слева в первой строке: лэддер, во второй строке: экстракт белка из контрольных клеток CHO, в третьей строке: экстракт белка из клеток CHO-US28-A1 и в четвертой строке: положительный контроль 6HIS. С-концевая часть конструкции US28-A1, которую трансфицировали в клетки CHO-US28-A1, содержит метку 6HIS. Окрашивание антителом к HIS, которое связывается с меткой 6HIS, выявило специфическую полосу при ~41 кДа по сравнению с лэддером, что эквивалентно размеру белка US28 HCMV, о котором сообщалось ранее. Эта полоса, обведенная на изображении, не присутствовала в контрольных клетках CHO, что подтверждает экспрессию US28 в трансфицированных клетках CHO-US28-A1, но не в контрольных клетках CHO. Положительный контроль 6HIS является положительным, что указывает на то, что Ab к 6HIS связывается со своей мишенью, как и ожидалось.

Фиг. 2. Анализ проточной цитометрии, показывающий поверхностное связывание клона антитела US28-13-5G6-1D3 в клетками CHO-US28-A1. Слева холостой контроль, контроль 2-м антителом и клон Ab US28-13-5G6-1D3, связывающегося на поверхности клеток CHO-US28-A1. Ab US28-13-5G6-1D3 связывалось с 53,4% клеток CHO-US28-A1, тогда как контроли на основе холостого и вторичного антител демонстрировали низкое связывание: 0,11% и 1,63% соответственно.

Фиг. 3. Положительное поверхностное связывание клона US28-13-5G6-1D3 с клетками CHO-US28-A1 дополнительно подтверждали градиентным разбавлением в анализе FACS. Слева поверхностное связывание клона Ab US28-13-5G6-1D3 Ab с клетками CHO-US28-A1 в разведениях 1:20, 1:50, 1:200 (масса/объем).

Фиг. 4. Положительное поверхностное связывание клона US28-13-5G6-1D3 с клетками CHO-US28-A1 сравнивали с отрицательными контрольными клетками CHO US28. Клон Ab US28-13-5G6-1D3 связывался в 15 раз более эффективно с поверхностью US28-положительных клеток CHO-US28-A1, чем с US28-отрицательными клетками CHO в соотношении 1:50 (масса/объем).

Фиг. 5. Исходный анализ ELISA показал одинаковое качественное связывание клонов антитела US28-13-5G6-1D3 как с биопептидом-1 (генотип US28 ECD3 4N), так и с биопептидом-2 (генотип US28 ECD3 4D). Поскольку никаких других мутаций в ECD3 не наблюдалось, эти результаты показывают, что связывание Ab US28-13-5G6-1D3 со своей мишенью является агностическим по отношению к штамму HCMV.

Фиг. 6. Качественный анализ ELISA, показывающий связывание продукта rAb US28-13-5G6-1D3 rAb с биопептидами 1 и 2. Эти результаты показывают сильное и одинаковое связывание полученного антитела с обоими генетическими вариантами US28 ECD3, подтверждая, что рекомбинантное антитело хорошо связывается со своей мишенью и сохраняет свойства связывания, агностические в отношении штамма HCMV.

Фиг. 7. Поверхностное связывание rAb 13-5G6-1D3 с клетками CHO-US28-A1 и соответствующими контрольными клетками CHO подтверждали с помощью анализа FACS. Столбцы, показывающие результаты для клеток CHO, окрашены в темно-серый цвет, тогда как столбцы, показывающие результаты для клеток CHO-US28-A1, окрашены в светло-серый цвет. Слева на первом столбце показано измерение холостого контроля без антитела для клеток CHO-US28-A1 и CHO соответственно; на втором столбце слева показано поверхностное связывание вторичного конъюгированном с Alexa 488 Ab к lgG мыши в отдельности с обоими типами клеток; на третьем столбце слева показано поверхностное связывание rAb 13-5G6-1D3 в разведении 1:10

(масса/объем) с обоими типами клеток; на четвертом столбце слева показано поверхностное связывание rAb 13-5G6-1D3 в разведении 1:50 (масса/объем) только с клетками CHO-US28-A1; и на пятом столбце слева показано поверхностное связывание rAb 13-5G6-1D3 в разведении 1:100 (масса/объем) только с клетками CHO-US28-A1. Ось y показывает связывание с процентом клеток. На основании этих результатов оптимальное разведение для окрашивания rAb 13-5G6-1D3 составляет 1:50 по массе/объему (третий столбец слева). Поверхностное связывание rAb 13-5G6-1D3 с клетками CHO измеряли только в разведении 1:10 (масса/объем) и оно составляло 0,77% после удаления связывания с холостыми контролями и контролями на основе конъюгированных с Alexa 488 вторичных антителами к lgG мыши. Эти результаты согласуются с предыдущими результатами, полученными с использованием антитела из клона 13-5G6-1D3, и демонстрируют высокую специфичность поверхностного связывания rAb 13-5G6-1D3 с клетками CHO-US28-A1, что в >21 раз выше, чем нормальным клеткам CHO.

Фиг. 8. Связывание rAb US28-13-5G6-1D3 на поверхности популяции инфицированных HCMV Ad169 клеток MRC-5, но не с клетками имитационного контроля, показывали с помощью анализа FACS. **A.** В верхнем ряду показано поверхностное связывание rAb US28-13-5G6-1D3 с инфицированными имитационным контролем и HCMV Ad169 клетками MRC-5, демонстрирующее высокоспецифическое связывание с инфицированными HCMV клетками. **B.** Для того, чтобы убедиться в том, что rAb 13-5G6-1D3 связывается с поверхностью популяции инфицированных HCMV клеток, другой набор инфицированных HCMV Ad169 и имитационным контролем клеток пермеабилизировали и окрашивали коммерческим антителом MAB810X против основного немедленно-раннего (IE) антигена HCMV, который представляет собой внутриклеточный белок, который, как известно, экспрессируется на ранних стадиях литической инфекции HCMV. Антитело MAB810X окрашивало ту же популяцию инфицированных HCMV клеток MRC-5, что и rAb US28-13-5G6-1D3, чего не наблюдалось для неинфицированных клеток ни для одного из антител, подтверждая, что поверхностное связывание продемонстрировали для rAb US28-13-5G6-1D3 было специфичным для инфицированных HCMV Ad169 клеток.

Фиг. 9. Неспецифическое связывание rAb US28-13-5G6-1D3 тестировали с использованием контрольного изотипа IgG мыши вместо первичного антитела перед инкубацией с конъюгированным с Alexa 488 антителом козы к lgG мыши. Результаты показали сдвиг в окрашивании инфицированных HCMV клеток MRC-5 с помощью rAb

US28-13-5G6-1D3 по сравнению с изотипическим контролем, тогда как окрашивание неинфицированных клеток (имитационный контроль) было сходным с изотипическим контролем IgG. В совокупности эти результаты показывают, что rAb US28-13-5G6-1D3 специфически связывается (~ в 16 раз более высокое связывание) с поверхностью литически инфицированных HCMV клеток по сравнению с неинфицированными клетками.

Фиг. 10. Связывание rAb US28-13-5G6-1D3 с первичными PBMC трех HCMV серопозитивных индивидуумов исследовали с использованием того же протокола проточной цитометрии, что и в более ранних исследованиях. Столбцы на фигуре показывают относительное поверхностное связывание rAb US28-13-5G6-1D3 с PBMC от соответствующих доноров. Результаты показали поверхностное связывание rAb US28-13-5G6-1D3 с 18,37%, 3,57% и 5,25% от общего количества PBMC от трех индивидуумов соответственно. Относительная доля PBMC, экспрессирующих определенные различные маркеры клеточной поверхности от одних и тех же индивидуумов, указана под столбцами; общее количество превышает 100%, поскольку некоторые из одних и тех же клеток экспрессируют более одного из этих маркеров клеточной поверхности (однако они не измеряются в ходе того же эксперимента, что и связывание rAb US28-13-5G6-1D3). Из изученных PBMC только CD11+, CD14+ и Cd16+ положительные клетки могут быть носителями HCMV, причем эти поверхностные маркеры могут частично перекрываться в разных мононуклеарных клетках. Популяция мононуклеарных клеток, латентно инфицированных HCMV, часто составляет до приблизительно 15% от общего числа PBMC (хотя между отдельными индивидуумами могут наблюдаться некоторые значительные различия). Следовательно, наблюдаемое поверхностное связывание rAb US28-13-5G6-1D3 с 18,37%, 3,57% и 5,25% от общего количества PBMC у доноров 1, 2 и 3 соответственно демонстрирует связывание со значительной долей PBMC, которые могут быть носителями HCMV. Эти результаты не связаны с подтипами PBMC, но указывают на то, что rAb US28-13-5G6-1D3 может связываться на поверхности латентно инфицированных HCMV клеток.

Фиг. 11. Связывание коммерческого поликлонального антитела US28 с клетками CHO-US28-A1 тестировали и сравнивали со связыванием rAb US28-13-5G6-1D3 с теми же клетками. **A.** Антитело US28-13-5G6-1D3 связалось с поверхностью более чем 50% клеток CHO-US28-A1 (первый столбец слева), тогда как коммерческое Ab US28 связалось только с 10% клеток (второй столбец слева). **B.** Затем тестировали коммерческое Ab US28 в отношении инфицированных HCMV Ad169 клеток MRC-5, где

оно показало специфическое связывание с инфицированной HCMV популяцией. Однако коммерческое поликлональное Ab US28 также окрашивало неинфицированные клетки имитационного контроля приблизительно в два раза эффективнее по сравнению с контрольным изотипом IgG, что указывает на неспецифическое связывание на поверхности неинфицированных клеток MRC-5. Специфичность связывания коммерческого Ab US28 с HCMV Ad169 положительными клетками MRC-5 составляла всего 1,7 по сравнению с US28 отрицательными клетками MRC-5 имитационного контроля, когда сигнал от изотипа IgG вычитали.

Фиг. 12. Связывание US28-13-5G5-1D3 в разведении 1:400 (масса/объем) с инфицированными HCMV тканями человека изучали с помощью иммуногистохимического анализа (IHC). **A.** Окрашивание инфицированной HCMV легочной ткани с помощью rAb US28-13-5G6-1D3 показало специфичность в отношении инфицированных HCMV альвеолярных и эндотелиальных клеток. Стрелки (в бесцветной версии данной фигуры) отмечают цитоплазматическое окрашивание rAb US28-13-5G6-1D3 в типичных инфицированных HCMV альвеолярных клетках с характерным цитомегало-эффектом на предметном стекле с положительным контролем HCMV. **B.** 13-5G6-1D3 показывает положительное окрашивание US28 для макрофагов, но отрицательное окрашивание для альвеолярных клеток в нормальной легочной ткани. **C.** Те же макрофаги показывают положительную ДНК HCMV при той же биопсии легкого, тогда как в нормальных альвеолярных клетках сигналы ДНК HCMV отсутствуют, что согласуется с окрашиванием US28 в том же образце. **D.** Окрашивание инфицированной HCMV легочной ткани антителом MAB810R продемонстрировало специфичность в отношении инфицированных HCMV альвеолярных и эндотелиальных клеток. Стрелки (в бесцветной версии данной фигуры) отмечают ядерное окрашивание антитела MAB810R в типичных инфицированных HCMV клетках с характерным цитомегало-эффектом на предметном стекле положительного контроля HCMV. **E.** IE окрашивание является отрицательным для альвеолярных HCMV положительных макрофагов в нормальной легочной ткани. Нормальные альвеолярные клетки также демонстрируют отрицательное окрашивание. **F.** lgG использовали в качестве антитела отрицательного контроля и показали отрицательное окрашивание для тех же легочных тканей. Цветные версии фигуры 12 также представлены наряду с черно-белыми версиями.

Фиг. 13. Экспрессию US28 HCMV изучали с помощью иммуногистохимии (IHC) и гибридизации *in situ* (ISH) в когорте с раком молочной железы. **A.** rAb US28-13-5G6-

1D3 демонстрировало выраженное цитоплазматическое окрашивание (3+) раковых клеток (отмечено стрелками в черно-белой версии данной фигуры) в образце трижды негативного рака молочной железы (TNBC). Большинство опухолевых клеток в этом образце положительно окрашивалось rAb US28-13-5G6-1D3 (коричневый цвет). **B.** Тот же образец демонстрировал некоторое точечное положительное цитоплазматическое окрашивание в нескольких клетках во всем образце антителом к IE MAB810R. **C.** Анализ ISH показывает множественные сигналы ДНК HCMV во многих ядрах одних и тех же опухолевых клеток, что характерно для многих трижды негативных и HER2 положительных опухолей в данном материале. Стрелки указывают на некоторые положительные сигналы ДНК HCMV на фигуре. В цитоплазме клеток ДНК HCMV не обнаружена. **D.** Ab отрицательного контроля на основе IgG показывает отрицательное окрашивание. Цветная версия фигуры 13 представлена на странице после черно-белой версии.

Фиг. 14. A. Метастазирование железистой ткани HER2 положительного рака молочной железы демонстрируют положительное промежуточное цитоплазматическое окрашивание (2+) rAb US28-13-5G6-1D3 (коричневый цвет) во всех опухолевых клетках. **B.** Большинство раковых клеток в одном и том же образце были отрицательными в отношении окрашивания MAB810R. Только одна или две клетки во всем образце имели точечное положительное цитоплазматическое окрашивание антителом MAB810R (не показано на фигуре). **C.** ISH анализ показывает множество положительных ядерных сигналов ДНК HCMV в одних и тех же опухолевых клетках. Стрелки указывают на такие положительные сигналы ДНК HCMV. ДНК HCMV не была обнаружена в цитоплазме опухолевых клеток. **D.** Окрашивание Ab отрицательного контроля на основе IgG для того же образца было отрицательным. Также представлена цветная версия фигуры 14.

Фиг. 15. Окрашивание US28 и ISH HCMV были отрицательными во многих тканях молочной железы с нормальной прилегающей опухолью (NAT), как показано на фигуре с образцом BR1008b_J6. **A.** rAb US28-13-5G6-1D3 показало отрицательное IHC окрашивание для нормальной ткани молочной железы. **B.** Антитело MAB810R также показало отрицательное окрашивание для того же образца. **C.** В том же образце не было обнаружено ядерных или цитоплазматических сигналов ДНК HCMV с помощью ISH. **D.** Окрашивание IgG также было отрицательным. Эти результаты указывают на то, что антитела показали последовательно отрицательное окрашивание нормальной железистой ткани молочной железы, где отсутствовали признаки инфекции HCMV. Следует отметить, что HCMV отрицательный образец BR1008b_J6 помещали на то же

предметное стекло с TMA, что и образцы BR1008b_D5 и BR1008b_H6, которые показали выраженное положительное окрашивание антителом US28-13-5G6-1D3 и положительные ядерные сигналы в отношении ISH ДНК HCMV. Таким образом, образцы подвергаются точно таким же условиям окрашивания и концентрациям антител/зондов ДНК. Положительное окрашивание, наблюдаемое при использовании rAb US28-13-5G6-1D3, оценивали как специфичное для инфицированных HCMV клеток, как в тканях с раком молочной железы, так и в нормальных тканях. Также представлена цветная версия фигуры 15.

Фиг. 16. А. IHC окрашивание образцов первичного рака молочной железы с помощью rAb US28-13-5G6-1D3 было специфичным и положительным в ~73% из 41 изученного образца первичной опухоли молочной железы. 100% опухолей, которые были положительными в отношении окрашивания US28, были также положительными в отношении ядерных сигналов ДНК HCMV, а в ядрах 12/41 опухолей присутствовали множественные сигналы. Все 10 контрольных нормальных прилегающих тканей (n = 10) были отрицательными в отношении цитоплазматического окрашивания US28 в эпителиальных клетках молочной железы (0), а 7/10 были также отрицательными в отношении ISH сигналов. **В.** Положительное окрашивание rAb US28-13-5G6-1D3 наблюдалось в ~94% из изученных 30 метастазов рака молочной железы и было специфичным для метастатических клеток. Все TNBC (n = 7) и HER2 положительные (n = 11) метастазы были положительными в отношении окрашивания US28-13-5G6-1D3, и единственными отрицательными образцами (n = 2) были раковые клетки, положительные по рецептору гормонов. ISH анализ показал положительную ядерную ДНК HCMV в 100% метастазов. В 43% метастатических тканей наблюдались множественные сигналы ядерной ДНК в опухолевых клетках. Эти образцы принадлежали исключительно к подтипу TNBC или HER2+, и два исключения имели низкий статус HR+. Результаты ISH на фигуре не показаны.

Фиг. 17. Ткани глиобластомы человека исследовали с помощью rAb US28-13-5G6-1D3 и антител MAB810R с помощью IHC и анализа ISH в отношении ДНК HCMV. **А.** Опухоль головного мозга глиобластомы IV степени демонстрирует умеренное окрашивание в отношении US28 в опухолевых клетках (коричневый цвет). **В.** Окрашивание антителом MAB810R не показывает IE экспрессии в тех же раковых клетках. Однако положительное цитоплазматическое окрашивание в отношении MAB810R наблюдалось в ~90% образцов глиобластомы. Окрашивание присутствовало в нескольких клетках в каждом положительном образце, что отличалось от образцов рака

молочной железы. Однако окрашивание глиальных клеток было слабее, чем у rAb US28-13-5G6-1D3. **C.** NAT ткани головного мозга является отрицательной при окрашивании 13-5G6-1D3. **D.** ISH анализ показывает положительные ядерные сигналы ДНК HCMV в одних и тех же опухолевых клетках. Стрелки указывают на эти сигналы. **E.** Окрашивание того же образца глиобластомы IV степени является отрицательным в отношении антитела на основе IgG. **F.** ISH анализ является отрицательным в отношении того же образца NAT ткани головного мозга. Положительные глиальные клетки обозначены стрелками в черно-белой версии данных фигур. Цветная версия фигуры 17 представлена на странице после черно-белой версии.

Фиг. 18. Окрашивание US28-13-5G6-1D3 когорты с раком головного мозга человека, содержащей астроцитому человека 1-3 степени и глиобластому 4 степени, а также ткани NAT. Все астроцитомы 1 степени (n = 4) окрашивались отрицательно (0). Из астроцитом 2-3 степени 6 окрашивались отрицательно (0), 37 имели положительное окрашивание цитоплазмы (1+) и 2 имели умеренно положительное окрашивание цитоплазмы (2+). Все опухоли глиобластомы 4 степени (n = 19) показали положительное цитоплазматическое окрашивание (1+) в отношении rAb US28-13-5G6-1D3, из которых 3 были умеренно положительными (2+). Анализ ISH подтвердил наличие ядерной ДНК HCMV в опухолевых клетках всех образцов опухолей. Только 3 из 10 образцов NAT были положительными в отношении ДНК HCMV.

Фиг. 19. A. Анализ на основе проточной цитометрии с использованием антитела 28-13-5G6-1D3-PE проводили в различных первичных клетках человека, чтобы исключить общее нецелевое связывание с поверхностью этих типов клеток. Изучали следующие клеточные линии: первичные клетки коры надпочечников человека, первичные эпителиальные клетки почек человека, первичные эндотелиальные клетки микрососудов сердца человека, первичные эпителиальные клетки печени человека и первичные гладкомышечные клетки вен человека. Нацеленное на US28 антитело 13-5G6-1D3 показало очень низкое поверхностное связывание, намного ниже <1%, со всеми этими типами клеток, что указывает на отсутствие нецелевого поверхностного связывания 13-5G6-1D3 с этими типами клеток. Эти результаты подтверждают наблюдения в отношении лабораторных клеток, демонстрирующие низкое связывание с поверхностью нормальных, US28 отрицательных клеток. **B.** Исходные первичные сердечные клетки человека не были доступны, поэтому образцы сердечной ткани человека исследовали в отношении окрашивания 13-5G6-1D3 иммуногистохимическим методом. В примере на фигуре показано отрицательное окрашивание 13-5G6-1D3 ткани

сердечной мышцы, аналогичное окрашиванию отрицательным контрольным антителом на основе IgG. ISH анализ не выявил никаких признаков наличия латентной инфекции HCMV в сердечной мышце человека. Если в сердце человека присутствовали инфекции HCMV, то они всегда характеризовались продуктивным типом инфекции. Положительный контроль находился на том же планшете с TMA, что и образцы сердца, и был положительным: 13-5G6-1D3 показал положительное окрашивание в отношении злокачественной феохромоцитомы. ISH контроль также показал типичное окрашивание ДНК HCMV в ядрах опухолевых клеток при той же биопсии, что указывает на наличие латентной инфекции HCMV в данном типе опухоли. Положительные результаты 13-5G6-1D3 и ISH HCMV отмечены на фигуре стрелками. Также представлена цветная версия фигуры 19.

Фиг. 20. Некоторые ткани поджелудочной железы изучали для исключения общего нецелевого связывания 28-13-5G6-1D3 с данным типом ткани. В верхнем ряду показана нормальная ткань поджелудочной железы с отрицательным окрашиванием контрольными антителами 13-5G6-1D3, MAB810R и антителом на основе IgG. ISH HCMV является отрицательным, что указывает на отсутствие вирусной ДНК HCMV в образце нормальной ткани поджелудочной железы. В нижнем ряду показан образец ткани поджелудочной железы от другого пациента с положительным окрашиванием 13-5G6-1D3 и MAB810R и отрицательным окрашиванием контрольным антителом на основе IgG (отрицательный контроль). Анализ ISH HCMV также показывает положительные результаты, указывающие на наличие цитоплазматических агрегатов ДНК HCMV в том же образце. Таким образом, один и тот же образец является положительным как в отношении белков HCMV US28 и IE, так и для ДНК HCMV, но отрицательным в отношении отрицательного контрольного IgG, что указывает на специфическое связывание антител. Окрашивание белка US28, как и ожидалось, является цитоплазматическим, IE белок, как и ожидалось, в основном расположен в ядре клетки, поскольку он представляет собой ядерный белок. ISH HCMV показывает большие агрегаты цитоплазматической вирусной ДНК, поскольку вирус упакован в цитоплазме, что указывает на продуктивную инфекцию HCMV. Эти результаты указывают на то, что антитело US28-13-5G6-1D3 не связывается с тканью поджелудочной железы нецелевым образом и что инфекция HCMV, присутствующая в морфологически нормальной ткани поджелудочной железы, имеет продуктивный характер в отличие от опухолей, где она, вероятно, имеет латентный характер. Также представлена цветная версия фигуры 20.

Фиг. 21. A. Абсолютные уровни связывания панели антител, сравнение свойств связывания раскрытого из предыдущего уровня техники VUN100 (моновалентного или бивалентного) с US28-13-5G6-1D3 по отношению к контрольным клеткам CHO и клеткам CHO, экспрессирующим US28, кодируемый различными штаммами HCMV (DB и TB40/E), а также клетками CHO, экспрессирующими модифицированный US28, содержащий все известные мутации US28 («мутантный штамм»). **B.** Специфичность связывания одной и той же панели антител с клетками CHO, экспрессирующими различные формы US28, по сравнению с контрольными клетками CHO, при этом результаты выражаются как кратное повышение связывания с экспрессирующими US28 клетками по сравнению с контрольными клетками CHO. **C.** Влияние различий штаммов на степень абсолютных уровней связывания одной и той же панели антител, представленное как процентное изменение уровней абсолютного связывания между связыванием с клетками CHO, экспрессирующими US28, кодируемый штаммами HCMV DB и TB40/E, при этом меньшее процентное изменение указывает на более высокую степень агностического в отношении штамма связывания. **D.** Процент сохранения специфичности связывания одной и той же панели антител между клетками CHO, экспрессирующими формы US28, кодируемого штаммами HCMV DB и TB40/E, при этом сохранение специфичности связывания, близкое к 100%, указывает на специфичность связывания, независимую от штамма, тогда как более существенная разница (как продемонстрировано двумя образцами антител VUN100) указывает на изменение специфичности связывания в зависимости от штамма, который кодирует US28 (т.е. отсутствие независимой от штамма специфичности связывания). **E.** Процент связывания антител с клетками CHO, экспрессирующими различные формы US28 (кодируемые DB, TB40/E и мутантной формой), нормализованный до уровня связывания, наблюдаемого для 1D3 для каждой формы US28, при этом изменение % связывания данного антитела в различных формах CHO указывает на снижение штаммонезависимой связывающей активности по сравнению с антителом 1D3-mFc и показывает, что связывание в большей степени зависит от штамма, который кодирует US28 (т.е. отсутствие штаммонезависимого связывания по сравнению с антителом 1D3-mFc).

Фиг. 22. Процент нецелевого связывания различных ECD3-связывающих молекул по настоящему изобретению по сравнению с VUN100, оцененный по связыванию с контрольными клетками CHO.

Фиг. 23. Кратное изменение специфичности связывания иллюстративных ECD3-связывающих молекул, связывающихся с US28-экспрессирующими CHO, по сравнению с контрольными клетками CHO, относительно уровня специфичности VUN100 в том же анализе. **A.** Улучшенная специфичность связывания 1D3 по сравнению с VUN100 (n=3). **B.** Улучшенная специфичность связывания 1C10 по сравнению с VUN100 (n=3). **C.** Улучшенная специфичность связывания 1A10 по сравнению с VUN100 (n=3). **D.** Улучшенная специфичность связывания 1G4 по сравнению с VUN100 (n=3). **E.** Улучшенная специфичность связывания 1E8 по сравнению с VUN100 (n=1).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к средствам, нацеленным на конкретную область белка US28, кодируемого цитомегаловирусом человека (HCMV), и связанным с ним терапевтическим, профилактическим и диагностическим подходам, включая без ограничения различные виды инфицированного HCMV рака и другие состояния, ассоциированные с латентными или литическими инфекциями HCMV.

Белок US28 HCMV представляет собой отличный потенциал для борьбы с инфекциями HCMV, включая латентный резервуар, поскольку:

(1) Определенные части белка US28 экспрессируются на поверхности клеток как во время литической, так и в латентной инфекции HCMV (Elder *et al.*, *iScience*, 2019, **12**: 13-26);

(2) US28 представляет собой GCPR, доставка которого к цитоплазматической мембране позволяет как его прямое нацеливание на связывающие молекулы, так и его использование в качестве переносчика полезной нагрузки благодаря его эндоцитозу, который является либо конститутивным, либо возникает в результате связывания лиганда. GCPR в целом составляют наиболее крупное семейство белков, на которые нацелены одобренные лекарственные средства (Sriram & Insel, *Mol Pharmacol*, 2018, **93**(4): 251-258); и

(3) В отличие от многих одобренных лекарственных средств, которые нацелены на GCPR, кодируемые ДНК человека, US28 HCMV полностью кодируется вирусной ДНК, поэтому используется высокоспецифичная мишень в отношении лекарствсенного средства, локализованная исключительно в инфицированных HCMV, а не в здоровых клетках человека.

A. <u>Связывание молекул с US28</u>

Рассматривая конструкцию связывающих молекул против US28, автор настоящего изобретения отметил, что N-концевой домен представляет собой лиганд-связывающую часть белка US28, физически выступающую из цитоплазматической мембраны и, следовательно, наиболее вероятно подверженную продуцированию антител хозяина, иммунному ответу и давлению генетического отбора (Mozzi *et al*, 2020, выше). Соответственно, она также представляет собой область, которая, как известно, содержит высокую межштаммовую изменчивость и мутации (Arav-Boger *et al.*, 2002, выше). Менее консервативные сайты также более восприимчивы к развитию новых мутаций, которые могут со временем изменить ответ на лечение, которое нацелено на эти области (Komatsu et al., *Antiviral Res*, 2014, **101**: 12-25). Таким образом, новые мутации в генах HCMV, вероятно, возникнут в менее консервативных участках, что определяется различиями между различными вирусными штаммами. Большинство структурных антител возникают, скорее всего, против N-концевой части белка US28 (De Groof *et al.*, *Mol Pharm*, 2019, **16**(7): 3145-3156), что, следовательно, также может иметь место в случае природных антител в организме человека (Elder *et al*, 2019, выше).

Насколько известно, к настоящему времени идентифицированы три типа онкогенных штаммов HCMV высокого риска. Клинические изоляты HCMV DB (KT95923) и BL (MW980585) недавно были идентифицированы как способствующие онкогенным молекулярным путям, обеспечивающие независимый от заякорения рост *in vitro* и вызывающие онкогенность в мышиных моделях, и поэтому названы онкогенными штаммами высокого риска (Kumar *et al.*, 2018, и Ahmad *et al.*, 2021). Кроме того, Soroceanu *et al.* секвенировали С-концевую часть гена US28 в 10 HCMV положительных опухолях глиобластомы. Сопоставление результатов (представленное в NIHMS323374-supplement-1.pdf для оригинальной публикации) показало, что все эти штаммы будут аналогичны клиническому изоляту HCMV VHL/E (L20501.1). Все онкогенные штаммы высокого риска DB, BL и VHL/E демонстрируют различные мутации в гене US28, особенно в N-концевой части (таблица 3). N-концевая часть отличается от штамма DB положениями E18D; A19E; F25L (VHL/E) и A19D, T21A, F25L (BL). Таким образом, все аминокислотные положения 18, 19, 21 и 25 являются мутантными в этих онкогенных штаммах высокого риска; а также известно, что другие штаммы имеют мутации в положениях 8 и/или 15 (таблица 3).

Вследствие их высоковариабельных последовательностей автор настоящего изобретения рассматривал области N-концевой части белка US28 (ECD1) как

неподходящую мишень для высокоспецифичного и агностического в отношении штамма антитела против US28.

В отличие от этого, автор настоящего изобретения установил, что ECD2 и ECD3 US28 высококонсервативны между различными штаммами HCMV; ECD2 не имеет каких-либо известных мутаций, тогда как анализ автором настоящего изобретения известных последовательностей ECD3 из многих различных штаммов HCMV выявил существование только одной известной мутации. Из известных онкогенных штаммов высокого риска штамм DB представляет собой ECD3 N170N (также обозначаемый в данном документе вариантной формой «4N», поскольку положение 170 белка US28 соответствует положению 4 ECD3), тогда как штаммы BL и VHL/E представляют собой варианты N170D (также обозначаемый в данном документе «4D») (таблица 3). Автор настоящего изобретения установил, что последовательность ДНК, кодирующая ДНК US28 ECD4, содержит множество полиморфных сайтов, из которых только один приводит к более распространенному аминокислотному изменению (R267K). Следует отметить, что онкогенный штамм BL высокого риска содержит как варианты ECD4, V250L, так и R267K (таблица 3).

Неожиданным образом было установлено, что настоящие исследования продемонстрировали, что ECD2 и консервативные части белка ECD4 не являются подходящими иммуногенами для мышей, в то время как заявитель смог разработать новый подход к идентификации высокоспецифичных агностических в отношении штамма связывающихся молекул против области ECD3 US28 HCMV. Как сообщается в примерах настоящей заявки, было показано, что моноклональные антитела хорошо и специфически связываются с обоими генетическими вариантами пептидов US28 ECD3, с US28-сверхэкспрессирующими клетками US28-CHO-A1, инфицированными HCMV Ad169 клетками MRC-5, первичными PBMC от HCMV серопозитивных индивидуумов, инфицированной HCMV тканью легких человека и несколькими типами агрессивных опухолей человека, таких как различные виды рака пищевода, желудка, прямой кишки, печени, легких, поджелудочной железы, рак шейки матки, злокачественная феохромоцитома и местно-распространенный рак толстой кишки, рак молочной железы и его метастазы и глиобластома 4 степени.

Соответственно, заявитель предоставил высокоспецифичные и независимые от штамма HCMV молекулы, связывающиеся с белком US28, кодируемым HCMV, включая без ограничения антитела и химерные антигенные рецепторы («CAR»), а также их варианты применения, например, для диагностических, профилактических и

терапевтических вариантов применения и способов, связанных с HCMV. Также представлены вакцины против HCMV и другие средства, подходящие для применения в создании указанных связывающих молекул.

В первом аспекте настоящего изобретения представлена связывающая молекула, содержащая одну или несколько полипептидных цепей, при этом указанная связывающая молекула имеет специфичность связывания в отношении эпитопа во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV), где ECD3 белок US28 содержит аминокислотную последовательность, представленную в белке US28 в положениях, соответствующих положениям 167-183 белка US28, кодируемого цитомегаловирусом человека (HCMV), как указано в SEQ ID NO: 5. Неограничивающие, но особенно предпочтительные примеры указанной связывающей молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения включают антитела и химерные антигенные рецепторы (CAR), как дополнительно обсуждается ниже.

Эпитопы

Как отмечалось выше, связывающие молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения имеют специфичность связывания в отношении эпитопа во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV), где ECD3 белка US28 содержит аминокислотную последовательность, представленную в белке US28 в положениях, соответствующих положениям 167-183 белка US28, кодируемого цитомегаловирусом человека (HCMV), как указано в SEQ ID NO: 5.

Эпитоп, в отношении которого связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения имеет специфичность связывания, может, например, предпочтительно полностью присутствовать во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 HCMV.

Эпитоп может, например, представлять собой линейный эпитоп в пределах (предпочтительно полностью в пределах) ECD3 белка US28. В качестве альтернативы эпитоп может представлять собой прерывистый и/или конформационный эпитоп в пределах (предпочтительно полностью в пределах) ECD3 белка US28.

Эпитоп может, например, содержать или состоять из 17 или менее аминокислот ECD3 белка US28 HCMV, например, он может содержать или состоять из 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или менее аминокислот ECD3 белка US28 HCMV, которые необязательно могут быть последовательными аминокислотами в ECD3 US28.

Аминокислотная последовательность, представленная в белке US28 в положениях, соответствующих положениям 167-183 белка US28, кодируемого цитомегаловирусом человека (HCMV), как указано в SEQ ID NO: 5, не обязательно может быть идентична последовательности, обнаруженной в этой области SEQ ID NO: 5, поскольку могут существовать межштаммовые вариации в последовательности ECD3 US28 среди разных штаммов HCMV. Соответственно, в данном контексте термин «соответствующий» относится к аминокислотам, обнаруженным в области, которая имеет соответствующее положение (то есть во 2-й внеклеточной петле, также обозначаемой областью ECD3) белка US28, кодируемого любым штаммом HCMV, представляющим интерес.

Однако после анализа последовательности белка US28 из многих различных клинических и лабораторных штаммов HCMV заявитель выявил наличие только одного полиморфизма в ECD3 кодируемого HCMV US28, представляя таким образом две альтернативные последовательности ECD3, которые обоазначаются в данном документе как 4D-вариант и 4N-вариант.

4D-вариант относится к вариации последовательности, присутствующей в ECD3 US28, кодируемой первой группой штаммов HCMV, и, по-видимому, является более распространенной формой; около 90% последовательностей US28, кодируемых различными штаммами HCMV, как было выявлено с помощью поиска BLAST, демонстрируют 4D-вариантную последовательность. 4D-вариант характеризуется включением последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7; положение 4 которой, как подчеркнуто, представляет собой D) в ECD3 US28. Иллюстративные штаммы HCMV первой группы, имеющие 4D-вариант US28, включают штаммы Towne, VR1814, TB40/E, VHL/E, Merlin, JP, Ad169, AF1, BL и DAVIS.

4N-вариант относится к альтернативному варианту последовательности, присутствующему в ECD3 US28, который кодируется второй группой штаммов HCMV, и, по-видимому, является менее распространенной формой. 4D-вариант характеризуется включением последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6; положение 4 которой, как подчеркнуто, представляет собой N) в ECD3 US28. Иллюстративные штаммы HCMV второй группы, имеющие 4N-вариант US28, включают штаммы Toledo, TR и DB. Эти и другие штаммы HCMV, демонстрирующие 4N-вариантную последовательность в ECD3 US28, показаны в таблице 1.

Эпитоп, по отношению к которому связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения, такая как агностическая в отношении штамма связывающая

молекула HMCV по первому аспекту настоящего изобретения, имеет специфичность связывания, предпочтительно представляет собой эпитоп, который является общим и присутствует как в последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6, соответствующая 4N-варианту ECD3 US28), так и в последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7, соответствующая 4D-варианту ECD3). Другими словами, эпитоп в ECD3 US28, в отношении которого связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения имеет специфичность связывания, предпочтительно исключает 4-й аминокислотный остаток каждой из SEQ ID NO: 6 и 7, что соответствует N в 4N-варианте и D в 4D-варианте.

В случае линейных эпитопов, необязательно эпитопы, которые являются общими и присутствуют как в 4N-, так и 4D-вариантах, и которые исключают вариант 4-го аминокислотного остатка, могут включать все 13 аминокислот последовательности NQCMTDYDYLEVS, или любые 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или менее ее аминокислот, которые необязательно могут быть последовательными аминокислотами указанной последовательности.

В дополнительном варианте, где эпитоп представляет собой прерывистый и/или конформационный эпитоп в пределах (предпочтительно полностью в пределах) ECD3 белка US28, прерывистый эпитоп может включать любые 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 , 11, 12, 13, 14, 15 или 16 из 17 аминокислот последовательности 4N-варианта ECD3 TKKNNQCMTDYDYLEVS и/или последовательности 4D-варианта ECD3 TKKDNQCMTDYDYLEVS.

Линейный, прерывистый или конформационный эпитоп в ECD3 может исключать одну или несколько аминокислот ECD3 US28, которые содержат положения 1-е-17-е, в последовательности, которая соответствует TKKNNQCMTDYDYLEVS в 4N-варианте и TKKDNQCMTDYDYLEVS в 4D-варианте.

В одном предпочтительном варианте осуществления линейный, прерывистый или конформационный эпитоп в ECD3 предпочтительно исключает 4-е положение (N/D), которое, как известно, варьируется между различными штаммами HCMV.

В качестве дополнения или в качестве альтернативы одна или несколько аминокислот ECD3 US28 могут быть исключены из линейного, прерывистого или конформационного эпитопа, который связывается связывающими молекулами по настоящему изобретению, такими как агностические в отношении штамма связывающие молекулы HMCV по первому аспекту настоящего изобретения.

Например, линейный, прерывистый или конформационный эпитоп в ECD3 может в качестве дополнения или в качестве альтернативы исключать 1-е положение. Линейный, прерывистый или конформационный эпитоп в ECD3 может в качестве дополнения или в качестве альтернативы исключать 2-е положение. Линейный, прерывистый или конформационный эпитоп в ECD3 может в качестве дополнения или в качестве альтернативы исключать 3-е положение. Линейный, прерывистый или конформационный эпитоп в ECD3 может в качестве дополнения или в качестве альтернативы исключать 5-е положение. Линейный, прерывистый или конформационный эпитоп в ECD3 может в качестве дополнения или в качестве альтернативы исключать 6-е положение. Линейный, прерывистый или конформационный эпитоп в ECD3 может в качестве дополнения или в качестве альтернативы исключать 7-е положение. Линейный, прерывистый или конформационный эпитоп в ECD3 может в качестве дополнения или в качестве альтернативы исключать 8-е положение. Линейный, прерывистый или конформационный эпитоп в ECD3 может в качестве дополнения или в качестве альтернативы исключать 9-е положение. Линейный, прерывистый или конформационный эпитоп в ECD3 может в качестве дополнения или в качестве альтернативы исключать 10-е положение. Линейный, прерывистый или конформационный эпитоп в ECD3 может в качестве дополнения или в качестве альтернативы исключать 11-е положение. Линейный, прерывистый или конформационный эпитоп в ECD3 может в качестве дополнения или в качестве альтернативы исключать 12-е положение. Линейный, прерывистый или конформационный эпитоп в ECD3 может в качестве дополнения или в качестве альтернативы исключать 13-е положение. Линейный, прерывистый или конформационный эпитоп в ECD3 может в качестве дополнения или в качестве альтернативы исключать 14-е положение. Линейный, прерывистый или конформационный эпитоп в ECD3 может в качестве дополнения или в качестве альтернативы исключать 15-е положение. Линейный, прерывистый или конформационный эпитоп в ECD3 может в качестве дополнения или в качестве альтернативы исключать 16-е положение. Линейный, прерывистый или конформационный эпитоп в ECD3 может в качестве дополнения или в качестве альтернативы исключать 17-е положение.

Эпитоп, в отношении которого связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения, такая как агностическая в отношении штамма связывающая

молекула HMCV по первому аспекту настоящего изобретения, имеет специфичность связывания, предпочтительно представляет собой эпитоп, который является общим и присутствует в более чем 90% известных клинических и/или лабораторных штаммов HCMV (включая по меньшей мере все штаммы HCMV, раскрытые в настоящей заявке), например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или по сути 100% (например, от 90% до 100%, от 91% до 100%, от 92% до 100%, от 93% до 100%, от 95 % до 100%, от 96% до 100%, от 97% до 100%, от 98% до 100%, от 99 до 100%) клинических и/или лабораторных штаммов HCMV (включая по меньшей мере все штаммы HCMV, раскрытые в настоящей заявке).

В одном предпочтительном варианте осуществления аминокислоты в эпитопе, по отношению к которым связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения имеет специфичность связывания, могут включать или быть идентичными аминокислотам в эпитопе в составе ECD3, который связывается любым одним или несколькими антителами US28-13-5G6-1D3, 13-1C10-1C10, 13-1H3-1A10, 13-1C10-1G9, 14-4E4-1E8 (обычно обозначаемыми в данном документе сокращенно «1D3», «1C10», «1A10», «1G9» и «1E8» соответственно), как описано в данном документе (в который включен также scFv, содержащий полипептидную последовательность V_H, имеющую последовательность V_H 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8, как определено SEQ ID NO: 12, 104, 122, 68 и 88 соответственно, и полипептидную последовательность V_L, имеющую последовательность V_L 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8, как определено SEQ ID NO: 18, 108, 126, 72 и 92 соответственно) или отличаться от указанного эпитопа не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту.

Связывающие свойства

Как сообщается в примерах настоящей заявки, многочисленные моноклональные антитела были созданы против ECD3 US28 с использованием способов, описанных в данном документе, и было показано, что они хорошо и специфически связываются как с генетическими вариантами пептидов US28 ECD3, так и с US28, сверхэкспрессирующими клетки US28-CHO-A1, и определенные иллюстративные антитела из них были дополнительно протестированы и показали, что они обеспечивают превосходные связывающие свойства с инфицированными HCMV Ad169 клетками MRC-5, первичными PBMC от HCMV серопозитивных индивидуумов, инфицированной HCMV легочной тканью человека и несколькими типами агрессивных опухолей человека, такими как различные виды рака пищевода, желудка, прямой кишки, печени, легких,

поджелудочной железы, рак шейки матки, злокачественная феохромоцитома и местно-распространенный рак толстой кишки, рак молочной железы и его метастазы и глиобластома 4 степени. Эти моноклональные антитела представляют собой иллюстративные варианты связывающих молекул в соответствии с настоящим изобретением.

Более конкретно, антитела 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8, описанные в данном документе (которые включают также scFv, содержащий полипептидную последовательность V_H, имеющую последовательность V_H 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8, как определено SEQ ID NO: 12, 104, 122, 68 и 88 соответственно, и полипептидную последовательность V_L, имеющую последовательность V_L 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и 1E8, как определено SEQ ID NO: 18, 108, 126, 72 и 92 соответственно) являются предпочтительными иллюстративными связывающими молекулами в соответствии с настоящим изобретением, хотя были получены и другие связывающие молекулы, и объем первого аспекта настоящего изобретения не ограничивается только 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8, а также не только связывающими молекулами, полученными из них (такими как другие связывающие молекулы, имеющие общие CDR 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8), хотя они могут представлять собой различные предпочтительные варианты осуществления. Тем не менее, антитела 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8 (которые включают также scFv, содержащий полипептидную последовательность V_H, имеющую последовательность V_H 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8, как определено SEQ ID NO: 12, 104, 122, 68 и 88 соответственно, и полипептидную последовательность V_L, имеющую последовательность V_L 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8, как определено SEQ ID NO: 18, 108, 126, 72 и 92. соответственно) могут обеспечивать полезный эталон, по которому можно охарактеризовать свойства связывания других связывающих молекул в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения.

Например, связывающая молекула в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, имеющая специфичность связывания в отношении эпитопа во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28, может демонстрировать связывающие свойства, которые аналогичны или по сути эквивалентны связывающим свойствам любого одного или нескольких из 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8 при тестировании в тех же условиях, что и 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8.

В данном контексте можно считать, что связывающая молекула в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения имеет «связывающие свойства, подобными или по сути эквивалентные» 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8, при тестировании в

тех же условиях, что и 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8 соответственно, если она демонстрирует аналогичную или по сути эквивалентную специфичность связывания, аналогичные или по сути эквивалентные агностические в отношении штамма связывающие свойства, и/или аналогичную или по сути эквивалентную аффинность связывания с 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8. Такие тесты могут, например, соответствовать любому одному или нескольким тестам, описанным в настоящей заявке, для оценки связывающих свойств 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8, например, любого одного или нескольких из тестов, проведенных для определения связывания с пептидами US28 ECD3 с US28-сверхэкспрессирующими клетками US28-CHO-A1, инфицированными Ad169 HCMV клетками MRC-5, первичными PBMC от HCMV серопозитивных индивидуумов, инфицированной HCMV легочной тканью человека и несколькими типами агрессивных опухолей человека, таких как различные виды рака пищевода, желудка, прямой кишки, печени, легких, поджелудочной железы, шейки матки, злокачественная феохромоцитома и местно-распространенный рак толстой кишки, рак молочной железы и его метастазы и глиобластома 4 степени.

Можно считать, что связывающая молекула в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения имеет аналогичную или по сути эквивалентную специфичность связывания с эталонной связывающей молекулой по настоящему изобретению, например, любой одной или несколькими из 1D3, 1C10, 1A10, 1G4 и/или 1E8, если в ходе любого одного или нескольких тестов для определения способности специфически связываться с пептидами US28 ECD3 (по сравнению с отрицательным контролем, таким как BSA), US28-экспрессирующими клетками (по сравнению с эквивалентными клетками, не экспрессирующими US28), инфицированными HCMV клетками (по сравнению с эквивалентными клетками без инфекции HCMV), первичными PBMC от HCMV серопозитивных индивидуумов (по сравнению с первичными PBMC от HCMV серонегативных индивидуумов), инфицированной HCMV легочной тканью человека (по сравнению с легочной тканью человека, которая не инфицирована HCMV) и/или типами инфицированных HCMV опухолей человека, в частности, агрессивных опухолей, таких как различные виды рака пищевода, желудка, прямой кишки, печени, легких, поджелудочной железы, шейки матки, злокачественная феохромоцитома и местно-распространенный рак толстой кишки, рак молочной железы и ее метастазы, а также глиобластома 4 степени (по сравнению с эквивалентными нераковыми клетками, которые не инфицированы HCMV), связывающая молекула демонстрирует по меньшей мере 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 или по сути 100% специфичность

связывания эталонной связывающей молекулы (например, любой из 1D3, 1C10, 1A10, 1G4 и/или 1E8). Определенные связывающие молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения могут иметь специфичность связывания, аналогичную или по сути эквивалентную специфичности связывания эталонной связывающей молекулы (например, любой одной или нескольких из 1D3, 1C10, 1A10, 1G4 и/или 1E8), которая тем не менее, ниже, чем специфичность связывания эталонной связывающей молекулы (например, любой одной или нескольких из 1D3, 1C10, 1A10, 1G4 и/или 1E8) в любом одном или нескольких из вышеуказанных тестов; тогда как некоторые другие связывающие молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения могут иметь более высокую специфичность связывания, чем эталонная связывающая молекула (например, любая одна или несколько из 1D3, 1C10, 1A10, 1G4 и/или 1E8) при любом одном или нескольких из вышеуказанных тестов.

Можно считать, что связывающая молекула в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения имеет сходные или по сути эквивалентные агностические в отношении штамма связывающие свойства с эталонной связывающей молекулой (например, любой одной или несколькими из 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8), если в ходе любого одного или нескольких тестов для определения способности специфически связываться с каждым из 4D- и 4N-вариантов пептидов US28 ECD3 (каждый по сравнению с отрицательным контролем, таким как BSA), с каждым из 4D- и 4N-вариантных US28-экспрессирующих клеток (каждый по сравнению с эквивалентными клетками, не экспрессирующими US28; и необязательно при этом 4D- и 4N-варианты US28 представляют собой соответственно последовательности US28, кодируемые штаммами HCMV TB40/E и DB, и/или дополнительно необязательно при этом клетки представляют собой клетки CHO), с каждым из 4D- и 4N-вариантных US28-кодирующих инфицированных штаммом HCMV клеток (каждый по сравнению с эквивалентными клетками без инфекции HCMV), с первичными PBMC от каждого из 4D- и 4N-вариантных US28-кодирующих штаммов от HCMV серопозитивных индивидуумов (по сравнению с первичными PBMC от HCMV серонегативных индивидуумов), с каждой из 4D- и 4N-вариантных US28-кодирующих инфицированных штаммом HCMV легочной тканью человека (по сравнению с не инфицированной HCMV легочной тканью человека) и/или с каждым из 4D- и 4N-вариантных US28-кодирующих инфицированных штаммом HCMV типов инфицированных HCMV опухолей человека, в частности, агрессивных опухолей, таких как различные виды рака пищевода, желудка, прямой кишки, печени, легких, поджелудочной железы, шейки матки, злокачественная

феохромоцитома и местно-распространенный рак толстой кишки, рак молочной железы и ее метастазы и глиобластома 4 степени (по сравнению с эквивалентными нераковыми клетками, которые не инфицированы HCMV), связывающая молекула демонстрирует одинаковое связывание с 4D- и 4N-вариантами, которые аналогичны или по сути идентичны (например, ± 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или менее) уравнению связывания, показанному эталонной связывающей молекулой (например, любой одной или более из 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8).

Можно считать, что связывающая молекула в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения имеет исходное связывание, эквивалентное или по сути эквивалентное 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8, если в ходе любого одного или нескольких тестов для определения исходного связывания в отношении клеток, которые не экспрессируют US28 (по сравнению с эквивалентными клетками, сконструированными для экспрессии US28), неинфицированных HCMV клеток (по сравнению с эквивалентными клетками с инфекцией HCMV), первичных PBMC от HCMV серонегативных индивидуумов (по сравнению с первичными PBMC от HCMV серопозитивных индивидуумов), неинфицированной HCMV легочной ткани человека (по сравнению с легочной тканью человека, которая инфицирована HCMV) и/или типов неинфицированных HCMV опухолей человека (по сравнению с эквивалентными раковыми клетками, которые инфицированы HCMV, в частности, агрессивными опухолями, такими как различные виды рака пищевода, желудка, прямой кишки, печени, легких, поджелудочной железы, шейки матки, злокачественная феохромоцитома и местно-распространенный рак толстой кишки, рак молочной железы и его метастазы и глиобластома 4 степени), исходная связывающая молекула демонстрирует по меньшей мере 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 или по сути 100% исходного связывания 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8. Определенные связывающие молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения могут иметь исходное связывание, аналогичное или по сути эквивалентное исходному связыванию 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8, которое, тем не менее, выше, чем исходное связывание 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8 в любом одном или нескольких из вышеуказанных тестов; тогда как некоторые другие связывающие молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения могут иметь более низкую специфичность связывания, чем 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8, в любом одном или нескольких из вышеуказанных тестов. В качестве альтернативы или в качестве дополнения определенные связывающие молекулы в соответствии с первым аспектом

настоящего изобретения могут иметь более низкое исходное связывание (например, менее чем 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 1% или менее чем 1%) по сравнению с исходным связыванием VUN100 (моновалентного VUN100 и/или бивалентного VUN100) в любом одном или нескольких из вышеуказанных тестов.

Можно считать, что связывающая молекула в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения имеет (например, ± 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или менее) по сути эквивалентную аффинность связывания в отношении эталонной связывающей молекулы (например, любой одной или нескольких из 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8), если в ходе любого одного или нескольких тестов для определения аффинности связывания с пептидами US28 ECD3, US28-экспрессирующими клетками, инфицированными HCMV клетками, первичными PBMC от HCMV серопозитивных индивидуумов, инфицированной HCMV легочной тканью человека и/или типами инфицированных HCMV опухолей человека, в частности, агрессивными опухолями, такие как различные виды рака пищевода, желудка, прямой кишки, печени, легких, поджелудочной железы, шейки матки, феохромоцитомой и местно-распространенным раком толстой кишки, раком молочной железы и его метастазами и глиобластомой 4 степени, связывающая молекула демонстрирует аффинность связывания, которая находится в пределах, например, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 порядка величины аффинности связывания эталонной связывающей молекулы (например, любой одной или нескольких из 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8), если она выражена как Kd. Определенные связывающие молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения могут иметь более низкую аффинность связывания, чем эталонная связывающая молекула (например, любая одна или несколько из 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8) в любом одном или нескольких из вышеуказанных тестов; тогда как некоторые другие связывающие молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения могут иметь более высокую аффинность связывания, чем эталонная связывающая молекула (например, любая одна или несколько из 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8) в любом одним или нескольких из вышеуказанных тестов. Следует отметить, что более высокая аффинность связывания не всегда желательна, например, в контексте CAR, где особенно высокая аффинность связывания может быть менее предпочтительной, а CAR с более высокой специфичностью связывания обычно приводят к большей терапевтической пользе, чем CAR с высокой аффинностью связывания.

Можно считать, что связывающая молекула в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения имеет любое одно или несколько из вышеупомянутых свойств.

Например, можно считать, что связывающая молекула имеет одно или несколько из следующих свойств (каждое из которых более подробно описано выше):

1. аналогичная или по сути эквивалентная специфичность связывания в отношении 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8;
2. аналогичные или по сути эквивалентные агностические в отношении штамма связывающие свойства в отношении 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8;
3. аналогичное или по сути эквивалентное исходное связывание с 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8;
4. более низкое исходное связывание, чем исходное связывание VUN100 (моновалентной VUN100 и/или бивалентной VUN100); и/или
5. по сути эквивалентная аффинность связывания в отношении 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8.

Например, связывающая молекула может иметь (i) аналогичные или по сути эквивалентные агностические в отношении штамма связывающие свойства в отношении 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8; и (ii) аналогичное или по сути эквивалентное исходное связывание с 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8. В других вариантах осуществления связывающая молекула может иметь (i) аналогичные или по сути эквивалентные агностические в отношении штамма связывающие свойства в отношении 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8; и (ii) более низкое исходное связывание по сравнению с исходным связыванием VUN100 (моновалентного VUN100 и/или бивалентного VUN100). В других вариантах осуществления связывающая молекула может иметь (i) аналогичные или по сути эквивалентные агностические в отношении штамма связывающие свойства в отношении 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8; (ii) аналогичное или по сути эквивалентное исходное связывание с 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8; и (iii) более низкое исходное связывание по сравнению с исходным связыванием VUN100 (моновалентного VUN100 и/или бивалентного VUN100). В других вариантах осуществления связывающая молекула может иметь (i) аналогичные или по сути эквивалентные связывающие свойства независимо от штамма с 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8; (ii) аналогичное или по сути эквивалентное исходное связывание с 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8; (iii) более низкое исходное связывание по сравнению с исходным связыванием VUN100 (моновалентного VUN100 и/или бивалентного VUN100); и (iv) аналогичную или по сути эквивалентную специфичность связывания в отношении 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8.

Дополнительные необязательные анализы для характеристики связывающих свойств связывающей молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения обсуждаются ниже.

(a) Анализ 1

Как показано на фиг. 5 настоящей заявки, иллюстративная связывающая молекула по настоящему изобретению, моноклональное антитело 1D3, которое было индуцировано против пептидной последовательности, полученной из ECD3 US28, имеет способность специфически связываться с пептидными последовательностями, полученными из ECD3 US28, по сравнению с отрицательным контролем BSA.

Пептидные последовательности, используемые в данном анализе, обозначали пептид-1, имеющий последовательность TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6, соответствующая 4N-варианту ECD3), и пептид-2, имеющий последовательность TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7, соответствующая 4D-варианту ECD3).

Как показано на фиг. 5, антитело 1D3 демонстрирует примерно в 27-28 раз более специфическое связывание с каждым из пептидов 1 и 2 по сравнению с контролем BSA; и уровни связывания, которые наблюдаются для 1D3 с пептидами 1 и 2, как в абсолютном уровне, так и при нормализации относительно соответствующих контролей BSA, по сути идентичны (например, разница составляет менее 5% и, вероятно, находится в пределах области экспериментальной ошибки). Эти результаты отчетливо показывают, что 1D3 является специфическим в отношении ECD3 US28, а также агностическим в отношении штамма.

В отличие от этого, связывающие свойства VUN100 из WO 2019/151865 (имеющего последовательность SEQ ID NO: 60 настоящей заявки) значительно отличаются. Сообщается, что оно связывается с эпитопом в N-концевой области US28, области US28, которая обладает высокими уровнями вариаций последовательностей между различными штаммами HCMV. Показано, что VUN100 имеет относительно низкий уровень специфичности связывания; оценка специфичности 4 была указана De Groof *et al*., 2019 (выше) в их вспомогательной информации, на фигуре S1.A и в таблице 2 настоящей заявки. Кроме того, VUN100 демонстрирует значительную разницу в связывании между штаммами VHL/E, Merlin и TB40/E HCMV, при этом связывание особенно снижается у штамма TB40/E (тип B1) примерно вдвое по сравнению с уровнем связывания, наблюдаемым против штамма Merlin (фигура 8D из WO 2019/151865). Дополнительная характеристика VUN100 представлена в предварительно напечатанной статье, доступной онлайн De Groof *et al*, 2020 (doi:

https://doi.org/10.1101/2020.05.12.071860), где на фиг. 2 дополнительных данных показаны результаты % индуцированных HCMV IE-положительных CD14+ моноцитов, связанных VUN100, от четырех различных HCMV серопозитивных доноров, при этом штамм(ы) HCMV у каждого донора не определен(ы). Уровень IE-позитивности, индуцированной связыванием VUN100 с этими клетками, варьировался у разных доноров до 14 раз. Это можно рассматривать как еще одно указание на то, что связывающая способность VUN100 значительно варьируется между клетками, инфицированными различными штаммами HCMV. Эти не являющиеся предпочтительными свойства VUN100 по сравнению со связывающими молекулами по настоящему изобретению дополнительно продемонстрированы в примерах настоящей заявки с конкретным обращением к фигурам 21A-E, фигуре 22 и фигуре 23.

Соответственно, в одном варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения может быть охарактеризована как имеющая специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, если она демонстрирует большее связывание с пептидом 1 и/или пептидом 2 (предпочтительно обоими) по сравнению с отрицательным контролем (таким как BSA) в анализе связывания в условиях, в которых эталонное антитело, где эталонное антитело представляет собой 1D3, демонстрирует более высокое связывание с пептидом 1 и/или пептидом 2 (предпочтительно с обоими), по сравнению с тем же отрицательным контролем. В другом варианте осуществления эталонная связывающая молекула может быть выбрана из группы, состоящей из 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8.

В дополнительном или альтернативном варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения может быть охарактеризована как имеющая агностическое в отношении штамма связывание с ECD3, если соответствующие уровни связывания, которые наблюдаются у связывающей молекулы с каждым из пептидов 1 и 2 в вышеупомянутых анализах, либо как абсолютный уровень, либо при нормализации относительно уровня связывания, наблюдаемого по отношению к соответствующему отрицательному контролю (например, BSA), по сути идентичны, например, в пределах 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее друг по отношению к другу.

Специфичность связывания связывающей молекулы с эпитопом в ECD3 белка US28 можно, например, оценить с помощью ELISA, такого как методология, описанная в примерах настоящей заявки, или с помощью варианта указанной методологии, такого как с помощью нанесения пептидов, полученных из ECD3 (таких как биопептид 1 и/или

биопептид-2), на первый набор лунок микротитровального планшета и нанесения отрицательного контроля (например, BSA) на второй набор лунок в микротитровальном планшете. Первый набор лунок может быть дополнительно разделен на первую подгруппу первого набора лунок, которая содержит последовательность 4N-варианта из ECD3 US28, и вторую подгруппу первого набора лунок, которая содержит последовательность 4D-варианта из ECD3 US28, что позволяет определить относительную специфичность связывания каждого варианта. После нанесения первого и второго наборов лунок связывающая молекула, представляющая интерес, может быть инкубирована в каждом из первого и второго наборов лунок, необязательно с дополнительным тестированием положительного контроля (например, любого одного или нескольких из 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8) в соответствующих первом и втором наборах лунок. После инкубации лунки можно промыть, а затем инкубировать с конъюгированными с ферментом вторичным антителом. После дополнительной промывки можно добавить субстрат для конъюгированного фермента, который подвергается измеримой реакции (например, изменение цвета, поглощения), которая коррелирует со степенью связывания связывающей молекулы и контроля, что указывает на специфичность связывания и/или агностические в отношении штамма характеристики связывания. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления связывающая молекула, представляющая интерес, имеет значение поглощения по результатам ELISA, которое указывает на положительное связывание с одним или несколькими (предпочтительно с обоими) пептидами 1 и/или 2, полученными из ECD3 в первом наборе лунок по сравнению со связыванием с отрицательным контролем (таким как BSA).

Под «положительным связыванием» подразумевается, что связывающая молекула, представляющая интерес, может иметь более высокий уровень связывания с одним или несколькими (предпочтительно с обоими) пептидами 1 и/или 2 по сравнению с уровнем связывания с отрицательным контролем (например, BSA), что указывает на более высокую специфичность связывания.

Например, оно может отображать по меньшей мере приблизительно 2-кратное, по меньшей мере приблизительно 5-кратное, по меньшей мере приблизительно 10-кратное, по меньшей мере 15-кратное, по меньшей мере 20-кратное, по меньшей мере 25-кратное, приблизительно 26-кратное, приблизительно 27-кратное или приблизительно 28-кратное связывание с пептидом 1 и/или пептидом 2 по сравнению с отрицательным контролем, таким как BSA, в условиях, в которых антитело 1D3 демонстрирует приблизительно 27-

28-кратное связывание с пептидом 1 и/или пептидом 2 по сравнению с отрицательным контролем, таким как BSA. Термин «приблизительно», используемый в данном контексте, может включать значения, которые составляют ± 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4 %, 3%, 2% или 1% от указанного значения (например, ±10% по меньшей мере приблизительно 10-кратного значения относится к диапазону от 9-кратного до 11-кратного значения). Например, условия для такого анализа могут быть выбраны такими же или эквивалентными условиям, используемым в анализе, используемом для получения результатов, показанных на фиг. 5.

В качестве альтернативы или в качестве дополнения «положительное связывание» может включать в себя то, что связывающая молекула, представляющая интерес, имеет аналогичный (например, по меньшей мере ± 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% или менее) или более высокий/повышенный/усиленный/улучшенный уровень поглощения по сравнению с положительным контролем (например, 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8).

(b) *Анализ 2*

В дополнительном варианте осуществления предпочтительно, чтобы связывающая молекула по настоящему изобретению связывалась преимущественно с US28-экспрессирующими клетками (такими как клетки CHO, сконструированные для экспрессии US28), по сравнению с ее связыванием с US28-отрицательными клетками (такими как клетки CHO дикого типа), например, в разведении 1:50 (масса/объем), например, как определяют с помощью анализа на основе проточной цитометрии. US28-экспрессирующие клетки предпочтительно представляют собой клетки, которые характеризуются экспрессией белка US28 на клеточной поверхности. Поверхностная экспрессия US28 обычно характеризуется отображением внеклеточных доменов US28 (ECD 1, 2, 3 и 4, соответствующих соответственно положениям 1-37, положениям 91-101, положениям 167-183 и положениям 250-273 белка US28, кодируемого штаммом DB HCMV, как определено последовательностью SEQ ID NO: 5, или эквивалентными последовательностями других штаммов HCMV) на клеточной поверхности.

На фиг. 4, 7 и в таблице 2 настоящей заявки демонстрируется, что иллюстративная связывающая молекула в соответствии в настоящим изобретением, моноклональное антитело 1D3, индуцированное против ECD3 US28, обладает способностью специфически связываться с US28-экспрессирующими клетками яичника китайского хомячка (CHO-US28-A1) по сравнению с US28-отрицательными контрольными клетками CHO с оценкой специфичности примерно от 15 до 21,5 в используемых

условиях связывания. Это можно проанализировать с использованием любого подходящего метода, например, с использованием анализа FACS, чтобы определить процент общего количества связанных клеток. Как дополнительно сообщается в примере 1 настоящей заявки, с конкретной ссылкой на таблицу 2, хотя клон US28-13-5G6-1D3 (кодирующий антитело 1D3) был охарактеризован наиболее полно, другие клонированные моноклональные антитела, индуцированные против ECD3 US28, показали превосходную специфичность связывания в отношении клеток CHO-US28-A1 по сравнению с их связыванием с US28-отрицательными контрольными клетками CHO. Как дополнительно сообщается в примере 2, другие дополнительные клонированные моноклональные антитела, индуцированные против ECD3 US28, показали превосходную специфичность связывания с клетками CHO-US28-A1 по сравнению с их связыванием с US28-отрицательными контрольными клетками CHO, в частности, имеющими очень низкое нецелевое связывание (например, по сравнению с гораздо более высокими уровнями нецелевого связывания, продемонстрированными VUN100), а также во многих случаях также демонстрирует более высокую специфичность связывания с клетками CHO-US28-A1 по сравнению с их связыванием с US28-отрицательными контрольными клетками CHO.

Эти данные отчетливо демонстрируют, что, следуя идеям настоящей заявки, обеспечивается последовательный путь получения антител, индуцированных против ECD3 US28, которые могут обеспечивать высокоспецифическое связывание с US28-экспрессирующими клетками (такими как клетки CHO) по сравнению со связыванием с US28-отрицательными клетками (такими как US28-отрицательные клетки CHO), предпочтительно с низкими уровнями нецелевого связывания, набор характеристик, не присущих VUN100.

В отличие от этого, связывающие свойства VUN100 из WO 2019/151865 (имеющего последовательность SEQ ID NO: 60 настоящей заявки) значительно отличаются. Сообщается, что оно связывается с эпитопом в N-концевой области US28, области US28, которая обладает высокими уровнями вариаций последовательностей между различными штаммами HCMV. Показано, что VUN100 имеет относительно низкий уровень специфичности связывания: оценка специфичности 4 была указан De Groof *et al.*, 2019 (выше) в их вспомогательной информации, на фигуре S1.A (и обобщена в таблице 2 настоящей заявки) при тестировании в отношении связывания либо с мембранами US28-экспрессирующих HEK293T (HEK+US28), либо с трансфицированными имитационным контролем мембранами HEK293T. VUN100 явно

не способно обеспечивать высокоспецифичное связывание с US28. Эти не являющиеся предпочтительными свойства VUN100 по сравнению со связывающими молекулами по настоящему изобретению дополнительно продемонстрированы в примерах настоящей заявки с конкретным обращением к фигурам 21A-E, фигуре 22 и фигуре 23.

Соответственно, в одном предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения будет проявлять специфическое связывание, характеризующееся тем, что ее специфичность связывания в отношении US28-экспрессирующих клеток (таких как клетки CHO-US28-A1, необязательно при этом последовательность US28 соответствует последовательности, кодируемой штаммом DB или TB40/E HCMV) по сравнению с US28-отрицательными клетками (такими как клетки CHO) превышает уровень специфичности, достигаемый VUN100. Например, уровень специфичности связывающей молекулы по первому аспекту настоящего изобретения может превышать уровень специфичности, достигаемый VUN100 в том же анализе, на по меньшей мере приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 100% (т.е. приблизительно 2 раза), приблизительно 150%, приблизительно 200% (т.е. приблизительно 3 раза), приблизительно 300% (т.е. приблизительно 4 раза), приблизительно 400% (т.е. приблизительно 5 раз) или приблизительно 500% (т.е. приблизительно 6 раз) при той же молярной концентрации. В данном контексте компаратор VUN100 может относиться к полипептиду, содержащему, состоящему по сути из или состоящему из последовательности любой одной или нескольких последовательностей SEQ ID NO: 60-64. В контексте SEQ ID NO: 61 и 63 они могут включать белки с указанными последовательностями сигнальных пептидов или без них.

В другом предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения будет проявлять специфическое связывание, характеризующееся тем, что ее специфичность связывания с US28-экспрессирующими клетками (такими как клетки CHO-US28-A1, необязательно при этом последовательность US28 соответствует последовательности, кодируемой штаммом DB или TB40/E HCMV) по сравнению с US28-отрицательными клетками (такими как клетки CHO) имеет по меньшей мере приблизительно тот же уровень специфичности, что и любое один или несколько из 1D3, 1C10, 1A10, 1G4 и/или 1E8 в том же анализе в той же молярной концентрации. Термин «приблизительно», используемый в данном контексте, может включать значения, которые составляют ± 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%,

15%, 10%, 9%, 8%, 7 %, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% уровня специфичности любого одного или нескольких из 1D3, 1C10, 1A10, 1G4 и/или 1E8 в том же анализе в той же молярной концентрации.

В данном контексте компаратор(ы) 1D3, 1C10, 1A10 и/или 1E8 может(гут) относиться к молекуле антитела, содержащей, состоящей по сути из или состоящей из:

полипептидной последовательности тяжелой цепи 1D3, как определено SEQ ID NO: 20 (после удаления указанной N-концевой лидерной последовательности), и полипептидной последовательности легкой цепи 1D3, как определено SEQ ID NO: 21 (после удаления указанной N-концевой лидерной последовательности);

полипептидной последовательности тяжелой цепи 1C10, как определено SEQ ID NO: 157 (после удаления указанной N-концевой лидерной последовательности), и полипептидной последовательности легкой цепи 1C10, как определено SEQ ID NO: 158 (после удаления указанной N-концевой лидерной последовательности);

полипептидной последовательности тяжелой цепи 1A10, как определено SEQ ID NO: 161 (после удаления указанной N-концевой лидерной последовательности), и полипептидной последовательности легкой цепи 1A10, как определено SEQ ID NO: 162 (после удаления указанной N-концевой лидерной последовательности); или

полипептидной последовательности тяжелой цепи 1E8, как определено SEQ ID NO: 153 (после удаления указанной N-концевой лидерной последовательности), и полипептидной последовательности легкой цепи 1E8, как определено SEQ ID NO: 154 (после удаления указанной N-концевой лидерной последовательности).

Такие анализы можно, например, проводить для определения относительного связывания с US28-экспрессирующими клетками (такими как клетки CHO-US28-A1, необязательно при этом последовательность US28 соответствует последовательности, кодируемой штаммом DB или TB40/E HCMV) и с US28-отрицательными клетками (таким как клетки CHO), например, в молярном соотношении, эквивалентном разведению 1:50 (масса/объем) 1D3, 1C10, 1A10 и/или 1E8, например, как определено с помощью анализа на основе проточной цитометрии.

(c) *Анализ 3*

В дополнительном варианте осуществления предпочтительно, чтобы связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения могла связываться преимущественно с инфицированными HCMV клетками (такими как клетки MRC-5; кат. № CCL-171, RRID: CVCL_0440, Американская коллекция типовых культур). (ATCC), Манассас, Вирджиния, 20110, США) по сравнению со связыванием эквивалентных

клеток без инфекции HCMV.. Как показано на фиг. 8 настоящей заявки, иллюстративная связывающая молекула по настоящему изобретению, моноклональное антитело 1D3, которое индуцировали против ECD3 US28, обладает способностью связываться с инфицированными HCMV клетками MRC-5, но не с неинфицированными (имитационный контроль) клетками, при анализе с использованием анализа на основе проточной цитометрии. В используемых условиях анализа 1D3 показало приблизительно 5,4% связывания с инфицированными HCMV клетками по сравнению с 0% связывания с неинфицированными (имитационный контроль) клетками. Дополнительное тестирование, как показано на фиг. 9, показало, что 1D3 специфически связывается (с примерно в 16 раз большей специфичностью) с поверхностью инфицированных HCMV клеток MRC-5 по сравнению с неинфицированными клетками.

Соответственно, в следующем предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения будет демонстрировать преимущественное связывание с инфицированными HCMV клетками (такими как клетки MRC-5), которое составляет или составляет по меньшей мере в 5 раз, в приблизительно 6 раз, в приблизительно 7 раз, в приблизительно 8 раз, в приблизительно 9 раз, в приблизительно 10 раз, в приблизительно 11 раз, в приблизительно 12 раз, в приблизительно 13 раз, в приблизительно 14 раз, в приблизительно 15 раз или в приблизительно 16 раз больше, чем при связывании эквивалентных клеток без инфекции HCMV. Такой анализ может, например, проводиться в соответствии с протоколом, используемым для получения результатов, показанных на фиг. 8 или 9 настоящей заявки, или с использованием эквивалентного протокола. Термин «приблизительно», используемый в данном контексте, может включать значения, которые составляют ± 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4 %, 3%, 2% или 1% от указанного значения.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения будет демонстрировать преимущественное связывание с инфицированными HCMV клетками (такими как клетки MRC-5), по сравнению с ее связыванием с эквивалентными клетками без инфекции HCMV, которое превышает уровень предпочтительного связывания, достигаемый VUN100. Например, уровень предпочтительного связывания связывающей молекулы по первому аспекту настоящего изобретения может превышать уровень предпочтительного связывания, достигаемый VUN100 в том же анализе, на по меньшей мере приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно

40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 100% (т.е. в приблизительно 2 раза), приблизительно 150%, приблизительно 200% (т.е. в приблизительно 3 раза), приблизительно 300% (т.е. в приблизительно 4 раза), приблизительно 400% (т.е. в приблизительно 5 раз) или приблизительно 500% (т.е. в приблизительно 6 раз) при той же молярной концентрации. В данном контексте компаратор VUN100 может относиться к полипептиду, содержащему, состоящему по сути из или состоящему из последовательности любой одной или нескольких последовательностей SEQ ID NO: 60-64. В контексте SEQ ID NO: 61 и 63 они могут включать белки с указанными последовательностями сигнальных пептидов или без них.

Связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения может, например, демонстрировать преимущественное связывание с инфицированными HCMV клетками по сравнению с ее связыванием с эквивалентными клетками без инфекции HCMV, которое составляет или составляет по меньшей мере приблизительно 20%, 30%, 40 %, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или по сути 100% предпочтительной связывающей активности эталонного антитела по настоящему изобретению (например, любого одного или нескольких из 1D3, 1C10, 1A10, 1G4, 1G9 и/или 1E8) при одинаковых условиях. Термин «приблизительно», используемый в данном контексте, может включать значения, которые составляют ± 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% от указанного значения (например, ±50% от 10% относится к диапазону от 5% до 15%). Например, условия для такого анализа могут быть выбраны такими же или эквивалентными условиям, используемым в анализе, используемом для получения результатов, показанных на фиг. 8 или 9.

Полипептиды

Связывающая молекула в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения содержит, состоит по сути из или состоит из одной или нескольких полипептидных цепей.

Термин «полипептид» используется в данном документе в самом широком смысле для обозначения соединения из двух или более субъединиц аминокислот, аналогов аминокислот или других пептидомиметиков. Таким образом, термин «полипептид» включает короткие пептидные последовательности, а также более длинные полипептиды и белки. Термин «аминокислота», используемый в данном

документе, включает двадцать стандартных генетически кодируемых аминокислот и их соответствующие стереоизомеры в форме «D» (по сравнению с природной формой «L»), омега-аминокислоты и другие встречающиеся в природе аминокислоты, нестандартные аминокислоты (например, α,α-дизамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты и т.д.) и химически модифицированные аминокислоты (см. ниже).

Аминокислоты в данном документе могут обозначаться полным названием, трехбуквенным кодом или однобуквенным кодом. Когда конкретно нумеруется аминокислота, такая как «аланин», «Ala» или «A», этот термин относится как к L-аланину, так и к D-аланину, если явно не указано иное. Другие нестандартные аминокислоты также могут быть подходящими компонентами полипептидов по настоящему изобретению при условии, что полипептид сохраняет требуемое функциональное свойство. Для показанных пептидов каждый кодируемый аминокислотный остаток, при необходимости, представлен однобуквенным обозначением, соответствующим тривиальному названию общепринятой аминокислоты.

В одном варианте осуществления полипептиды, определенные в данном документе, содержат или состоят из L-аминокислот.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что полипептиды по настоящему изобретению и/или полипептиды, используемые, как описано в данном документе, в связи с настоящим изобретением, могут содержать или состоять из одной или нескольких аминокислот, которые были модифицированы или дериватизированы.

Химические производные одной или нескольких аминокислот могут быть получены с помощью реакции с функциональной боковой группой. Такие дериватизированные молекулы включают, например, те молекулы, в которых свободные аминогруппы были модифицированы с образованием аминогидрохлоридов, *п*-толуолсульфонильных групп, карбоксибензоксигрупп, трет-бутилоксикарбонильных групп, хлорацетильных групп или формильных групп. Свободные карбоксильные группы могут быть преобразованы в соли, сложные метиловые и этиловые эфиры или другие типы сложных эфиров и гидразидов. Свободные гидроксильные группы могут быть преобразованы в производные О-ацила или О-алкила. В качестве химических производных также включены те пептиды, которые содержат встречающиеся в природе аминокислотные производные двадцати стандартных аминокислот. Например, пролин можно заменить 4-гидроксипролином; лизин можно заменить 5-гидроксилизином; гистидин можно заменить 3-метилгистидином; гомосерин можно заменить серином, а –

лизином. Производные также включают пептиды, содержащие одно или несколько добавлений или делеций, при условии сохранения необходимой активности. Другими включенными модификациями являются амидирование, аминоконцевое ацилирование (например, ацетилирование или амидирование тиогликолевой кислоты), концевое карбоксиламидирование (например, аммиаком или метиламином) и подобные концевые модификации.

Специалистам в данной области техники будет также понятно, что пептидомиметические соединения также могут быть применимы. Термин «пептидомиметик» относится к соединению, которое имитирует конформацию и требуемые свойства конкретного пептида в качестве терапевтического средства.

Например, указанный полипептид включает не только молекулы, в которых аминокислотные остатки соединены пептидными (-CO-NH-) связями, но и молекулы, в которых пептидная связь обращена в обратную сторону. Такие ретро-инверсо-пептидомиметики можно получить с использованием способов, известных в данной области техники, например, таких, как описано в Meziere *et al.* (1997, *J. Immunol.*, **159**(7): 3230-3237). Данный подход предполагает создание псевдопептидов, содержащих изменения, затрагивающие основную цепь, а не ориентацию боковых цепей. Ретро-инверсные пептиды, содержащие связи NH-CO вместо пептидных связей CO-NH, гораздо более устойчивы к протеолизу. В качестве альтернативы указанный полипептид может представлять собой пептидомиметическое соединение, в котором один или несколько аминокислотных остатков связаны -y(CH_2NH)- связью вместо обычной амидной связи.

В дополнительном альтернативном варианте от пептидной связи можно вообще отказаться при условии, что используется соответствующий линкерный фрагмент, который сохраняет расстояние между атомами углерода аминокислотных остатков; может быть предпочтительно, чтобы линкерный фрагмент имел по сути такое же распределение заряда и по сути такую же плоскостность, что и пептидная связь.

Также следует понимать, что указанный полипептид можно удобно блокировать на его N- или C-конце, чтобы способствовать снижению восприимчивости к экзопротеолитическому расщеплению.

Для модификации пептидов млекопитающих также использовали различные некодируемые или модифицированные аминокислоты, такие как D-аминокислоты и N-метиламинокислоты. Кроме того, предполагаемая биоактивная конформация может быть стабилизирована путем ковалентной модификации, такой как циклизация или

путем включения лактама или других типов мостиков, например, см. Veber *et al.* (1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**:2636) и Thursell *et al.* (1983, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **111**:166), которые включены в данный документ посредством ссылки.

Структуры связывающей молекулы

«Связывающая молекула» в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения обычно содержит один или несколько полипептидов, состоит по сути из них или состоит из них.

В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула (или ее часть) может быть образована посредством комбинации нескольких полипептидов. Например, полипептид V_H можно объединить с полипептидом V_L, при этом образуется Fab-фрагмент. Комбинация полипептидов может представлять собой полипептид V_H из одной иллюстративной ECD3-связывающей молекулы, объединенный с полипептидом V_L той же иллюстративной ECD3-связывающей молекулы или с полипептидом V_L другой иллюстративной ECD3-связывающей молекулы.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления связывающая молекула выбрана из группы, состоящей из антитела и химерного антигенного рецептора (CAR).

Как обсуждалось выше и дополнительно пояснялось в таблице 2 примера 1, а также в примере 2, в настоящей заявке описаны многочисленные антитела, индуцированные против ECD3 US28 в соответствии со способами, описанными в данном документе, с высоко предпочтительными свойствами связывания с US28, включая антитела 13-5G6-1D3 (обычно обозначаемые в данном документе «1D3»), 13-5C6-1B5, 14-1H3-1A6, 13-1C10-1C10 (обычно обозначаемые в данном документе «1C10»), 14-1H3-1A10 (обычно сокращенно обозначаемые в данном документе «1A10»), 14-2C2-1G4 (обычно сокращенно обозначаемые в данном документе «1G4»), 13-1C10-1G9 (обычно сокращенно обозначаемые в данном документе «1G9») и 14-4E4-1E8 (обычно сокращенно обозначаемые в данном документе «1E8»).

В настоящей заявке также представлен способ получения дополнительных антител, имеющих специфичность связывания в отношении эпитопа во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 HCMV, в соответствии с тридцать четвертым аспектом настоящего изобретения, как обсуждается далее в разделе N настоящей заявки. Например, способ может включать:

(a) получение одного или нескольких пептидов, соответствующих аминокислотной последовательности, присутствующей в ECD3 белка US28, например, одного или обоих пептидов, которые содержат, состоят по сути или состоят из полипептидной последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7) и/или TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), и/или иммуногенного фрагмента любого из них или обоих;

(b) получение одного или нескольких антител-кандидатов (которые необязательно индуцируются в ответ на один или оба указанных пептида); и

(c) определение специфичности связывания и/или аффинности связывания одного или нескольких антител-кандидатов с одним или обоими указанными пептидами.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей (CDR), соответствующих любому одному, двум, трем, четырем, пяти или всем шести из последовательности CDR антитела 1D3, как определено SEQ ID NO: 8, 9, 10, 14, 15 и 16 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1D3, и необязательно при этом связывающая молекула выбрана из антитела и CAR.

Последовательности и идентичности последовательностей CDR антитела 1D3, как определено SEQ ID NO: 8, 9, 10, 14, 15 и 16 являются следующими:

SEQ ID NO: 8	GFTFTDYY	Последовательность V_H-CDR1 1D3
SEQ ID NO: 9	IRSKANGYTT	Последовательность V_H-CDR2 1D3
SEQ ID NO: 10	ARDERRTAWLAY	Последовательность V_H-CDR3 1D3
SEQ ID NO: 14	QSIVHSNGNTY	Последовательность V_L-CDR1 1D3
SEQ ID NO: 15	KVS	Последовательность V_L-CDR2 1D3
SEQ ID NO: 16	FQGSHVPTWT	Последовательность V_L-CDR3 1D3

В другом варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей (CDR), соответствующих любому одному, двум, трем, четырем, пяти или всем шести из последовательности CDR антитела 1C10, как

определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83, 118 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1C10, и необязательно при этом связывающая молекула выбрана из антитела и CAR.

Последовательности и идентичности последовательностей CDR антитела 1C10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83, 118 являются следующими:

SEQ ID NO: 112	SHALS	Последовательность V_H-CDR1 1C10
SEQ ID NO: 113	SISSRGRTYYPDSVKG	Последовательность V_H-CDR2 1C10
SEQ ID NO: 114	GGTHYSYGNGFDF	Последовательность V_H-CDR3 1C10
SEQ ID NO: 117	SVSSSVSYMH	Последовательность V_L-CDR1 1C10
SEQ ID NO: 83	DTSKLAS	Последовательность V_L-CDR2 1C10
SEQ ID NO: 118	QQWSNNPPIT	Последовательность V_L-CDR3 1C10

В другом варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей (CDR), соответствующих любому одному, двум, трем, четырем, пяти или всем шести из последовательности CDR антитела 1A10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83, 118 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1A10, и необязательно при этом связывающая молекула выбрана из антитела и CAR.

Последовательности и идентичности последовательностей CDR антитела 1A10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83, 118 являются следующими:

SEQ ID NO: 112	SHALS	Последовательность V_H-CDR1 1A10
SEQ ID NO: 113	SISSRGRTYYPDSVKG	Последовательность V_H-CDR2 1A10
SEQ ID NO: 114	GGTHYSYGNGFDF	Последовательность V_H-CDR3 1A10
SEQ ID NO: 117	SVSSSVSYMH	Последовательность V_L-CDR1 1A10
SEQ ID NO: 83	DTSKLAS	Последовательность V_L-CDR2 1A10
SEQ ID NO: 118	QQWSNNPPIT	Последовательность V_L-CDR3 1A10

В другом варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей (CDR), соответствующих любому одному, двум, трем, четырем, пяти или всем шести из последовательности CDR антитела 1G9, как определено SEQ ID NO: 76, 77, 78, 82, 83 и 84 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1G9, и необязательно при этом связывающая молекула выбрана из антитела и CAR.

Последовательности и идентичности последовательностей CDR антитела 1G9, как определено SEQ ID NO: 76, 77, 78, 82, 83 и 84 являются следующими:

SEQ ID NO: 76	SYAMS	Последовательность V_H-CDR1 1G9
SEQ ID NO: 77	SISSGGSTYYPDSVKG	Последовательность V_H-CDR2 1G9
SEQ ID NO: 78	GGSTMITTGLGFAY	Последовательность V_H-CDR3 1G9
SEQ ID NO: 82	SASSSVSYMH	Последовательность V_L-CDR1 1G9
SEQ ID NO: 83	DTSKLAS	Последовательность V_L-CDR2 1G9
SEQ ID NO: 84	QQWSSNPPLT	Последовательность V_L-CDR3 1G9

В другом варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей (CDR), соответствующих любому одному, двум, трем, четырем, пяти или всем шести из последовательности CDR антитела 1E8, как определено SEQ ID NO: 76, 95, 96, 82, 99 и 100 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1E8, и необязательно при этом связывающая молекула выбрана из антитела и CAR.

Последовательности и идентичности последовательностей CDR антитела 1E8, как определено SEQ ID NO: 76, 95, 96, 82, 99 и 100 являются следующими:

SEQ ID NO: 76	SYAMS	Последовательность V_H-CDR1 1E8
SEQ ID NO: 95	SISSGGRTYYPDSVKG	Последовательность V_H-CDR2 1E8
SEQ ID NO: 96	GGTRHSYGNGFDY	Последовательность V_H-CDR3 1E8
SEQ ID NO: 82	SASSSVSYMH	Последовательность V_L-CDR1 1E8

SEQ ID NO: 99	DSSKLAS	Последовательность V_L-CDR2 1E8
SEQ ID NO: 100	QQWTSNPPIT	Последовательность V_L-CDR3 1E8

В других вариантах осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей (CDR), соответствующих любому одному, двум, трем, четырем, пяти или всем шести из последовательностей CDR (и/или функциональный вариант любой одной или нескольких указанных последовательностей CDR) любого другого антитела, имеющего специфичность связывания (и предпочтительно агностическую в отношении штамма специфичность связывания) в отношении ECD3 US28, например, любого из антител 13-5C6-1B5 и 14-1H3-1A6, как описано в данном документе, и/или любого антитела, полученного с помощью способа получения дополнительных антител, имеющих специфичность связывания в отношении эпитопа во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 HCMV), как описано выше.

Понятно, что молекулы, содержащие три или меньше областей CDR (в некоторых случаях только одну CDR или ее часть), могут быть способны сохранять антигенсвязывающую активность антитела, из которого получены CDR. Например, Gao *et al* (1994, *J Biol Chem* 269: 32389-93) описывают целую цепь V_L (включая все три CDR), имеющую высокую аффинность в отношении своего субстрата.

Молекулы, содержащие две области CDR, описаны, например, Vaughan & Sollazzo (2001, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 4: 417-430). На странице 418 (правый столбец – 3 «Стратегия разработки») описано минитело, содержащее только гипервариабельные области CDR H1 и H2, включенные в каркасные области. Минитело описывается как способное связываться с мишенью. Pessi *et al* (1993, Nature, 362: 367-9) и Bianchi *et al* (1994, *J. Mol. Biol.*, 236: 649-59) ссылаются на Vaughan & Sollazzo и описывают минитело H1 и H2 и их свойства подробнее. Qiu *et al* (2007, *Nature Biotechnology*, 25:921-9) демонстрируют, что молекула, состоящая из двух связанных CDR, способна связывать антиген (реферат и страница 926, правый столбец). Quiocho (1993, Nature, 362: 293-4) представляет краткое изложение исследований Pessi *et al.* касательно технологии «минитела». Ladner (2007, *Nature Biotechnology*, 25:875-7) делает обзор статьи Qiu *et al.* и комментирует, что молекулы, содержащие две CDR, способны сохранять антигенсвязывающую активность (страница 875, правый столбец).

Молекулы, содержащие одну область CDR, описаны, например, Laune *et al* (1997, *JBC*, 272: 30937-44), которые демонстрируют, что ряд гексапептидов, полученных из CDR, проявляют антигенсвязывающую активность (реферат) и отмечают, что синтетические пептиды полного единственного CDR проявляют выраженную связывающую активность (страница 30942, правый столбец). Monnet *et al* (1999, *JBC*, 274: 3789-96) показывают, что ряд 12-мерных пептидов и ассоциированных связанных с ними каркасных областей имеют антигенсвязывающую активность (реферат) и отмечают, что CDR3-подобный пептид сам по себе способен связывать антиген (стр. 3785, левый столбец). Heap *et al* (2005, *J. Gen. Virol.*, 86: 1791-1800) сообщают, что «микроантитело» (молекула, содержащая одиночную CDR) способно связывать антиген (реферат и страница 1791, левый столбец) и показывает, что циклический пептид из антитела к HIV имеет антигенсвязывающую активность и функцию. Nicaise *et al* (2004, *Protein Science*, 13:1882-91) показывают, что одиночная CDR может придавать антигенсвязывающую активность и аффинность в отношении своего лизоцимного антигена.

Когда упоминаются функциональные варианты конкретных последовательностей CDR антитела, следует понимать, что одна или несколько CDR в антителе, как они определены, могут быть изменены. Таким образом, если антитело определяется как содержащее CDR легкой цепи или тяжелой цепи (например, CDR 1-3), каждая из которых имеет определенную последовательность, можно варьировать до одной, двух или трех таких конкретных последовательностей. Аналогичным образом, если антитело определяется как содержащее CDR легкой цепи и тяжелой цепи (например, шесть CDR), каждая из которых имеет определенную последовательность, можно варьировать до одной, двух, трех, четырех, пяти или всех шести из этих конкретных последовательностей. Функциональные варианты обычно представляют собой консервативные аминокислотные замены, как описано ниже, и/или могут содержать делеции и/или вставки аминокислот.

Например, последовательность V_H-CDR1 1D3 представляет собой последовательность GFTFTDYY из 8 аминокислот (SEQ ID NO: 8). Ее функциональный вариант может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) консервативных аминокислотных замен, как описано далее ниже, и/или может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4 или 5) аминокислотных делеций и/или одну или несколько аминокислотных вставок. Последовательности V_H-CDR1 1C10, 1A10, 1G9 и 1E8 представляют собой последовательности из 5 аминокислот (SEQ

ID NO: 112, 112, 138, 76 и 76 соответственно). Их функциональные варианты могут содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4 или 5) консервативных аминокислотных замен, как описано далее ниже, и/или может содержать одну или несколько (например, 1 или 2) аминокислотных делеций и/или одну или несколько аминокислотных вставок.

Последовательность V_H-CDR2 1D3 представляет собой последовательность IRSKANGYTT из 10 аминокислот (SEQ ID NO: 9). Ее функциональный вариант может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных замен, как описано далее ниже, и/или может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) аминокислотных делеций и/или одну или несколько аминокислотных вставок. Последовательности V_H-CDR2 1C10, 1A10, 1G9 и 1E8 представляют собой последовательности из 16 аминокислот (SEQ ID NO: 113, 113, 77 и 95 соответственно). Их функциональные варианты могут содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16) консервативных аминокислотных замен, как описано далее ниже, и/или может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13) аминокислотных делеций и/или одну или несколько аминокислотных вставок.

Последовательность V_H-CDR3 1D3 представляет собой последовательность ARDERRTAWLAY из 12 аминокислот (SEQ ID NO: 10). Ее функциональный вариант может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12) консервативных аминокислотных замен, как описано далее ниже, и/или может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9) аминокислотных делеций и/или одну или несколько аминокислотных вставок. Последовательность V_H-CDR3 1G9 представляет собой последовательность из 14 аминокислот (SEQ ID NO: 78). Ее функциональный вариант может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14) консервативных аминокислотных замен, как описано далее ниже, и/или может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11) аминокислотных делеций и/или одну или несколько аминокислотных вставок. Последовательности V_H-CDR3 1C10, 1A10 и 1E8 представляют собой последовательности из 13 аминокислот (SEQ ID NO: 114, 114 и 96 соответственно). Их функциональные варианты могут содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13) консервативных аминокислотных замен, как описано далее ниже, и/или может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) аминокислотных делеций и/или одну или несколько аминокислотных вставок.

Последовательность V_L-CDR1 1D3 представляет собой последовательность QSIVHSNGNTY из 11 аминокислот (SEQ ID NO: 14). Ее функциональный вариант может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных замен, как описано далее ниже, и/или может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) аминокислотных делеций и/или одну или несколько аминокислотных вставок. Последовательности V_L-CDR1 1C10, 1A10, 1G9 и 1E8 представляют собой последовательности из 10 аминокислот (SEQ ID NO: 117, 117, 82 и 82 соответственно). Их функциональные варианты могут содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных замен, как описано далее ниже, и/или может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) аминокислотных делеций и/или одну или несколько аминокислотных вставок.

Последовательность V_L-CDR2 1D3 представляет собой последовательность KVS из 3 аминокислот (SEQ ID NO: 15). Ее функциональный вариант может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3) консервативных аминокислотных замен, как описано далее ниже, и/или может содержать одну или несколько аминокислотных делеций и/или одну или несколько аминокислотных вставок. Последовательности V_L-CDR2 1C10, 1A10, 1G9 и 1E8 представляют собой последовательности из 7 аминокислот (SEQ ID NO: 83, 83, 145, 83 и 99 соответственно). Их функциональные варианты могут содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) консервативных аминокислотных замен, как описано далее ниже, и/или может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3 или 4) аминокислотных делеций и/или одну или несколько аминокислотных вставок.

Последовательность V_L-CDR3 1D3 представляет собой последовательность FQGSHVPTWT из 10 аминокислот (SEQ ID NO: 16). Ее функциональный вариант может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных замен, как описано далее ниже, и/или может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) аминокислотных делеций и/или одну или несколько аминокислотных вставок. Последовательности V_L-CDR3 1C10, 1A10, 1G9 и 1E8 представляют собой последовательности из 10 аминокислот (SEQ ID NO: 118, 118, 84 и 100 соответственно). Ее функциональный вариант может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных замен, как описано далее ниже, и/или может содержать одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) аминокислотных делеций и/или одну или несколько аминокислотных вставок.

Функциональные варианты одного или нескольких из указанных CDR могут быть созданы с помощью любого из различных способов, хорошо известных в данной области техники. Например, связывающие свойства связывающей молекулы, которая содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR, могут развиться в процессе созревания. Например, аффинность связывания при условии, что CDR связывающей молекулы может быть модифицирована (увеличена или уменьшена) на стадиях созревания; и/или специфичность связывания при условии, что CDR связывающей молекулы может быть модифицирована (как правило, увеличена) на стадиях созревания. Следует понимать, что высокие или повышенные уровни аффинности связывания с US28 не всегда могут быть желательны, в частности, если это происходит за счет неприемлемо высоких уровней аффинности связывания с нецелевыми мишенями, такими как здоровые клетки человека. Связывающие молекулы, включая без ограничения CAR и клетки, экспрессирующие CAR, могут получать преимущество от более низких уровней аффинности связывания, но, как правило, всегда будут получать преимущество от оптимизированных уровней специфичности связывания.

В одном примере процесса созревания моновалентная дисплейная фагмидная система может быть использована для модификации эффектов авидности во время скрининга связывания антигенов. Два альтернативных или комбинированных метода, ненаправленный мутагенез и олигонуклеотид-направленный мутагенез, могут быть использованы для создания случайных или определенных подбиблиотек для введения большого количества мутантов исходной связывающей молекулы. Связывающие молекулы, которые связываются с US28-экспрессирующими клетками, и/или с инфицированными HCMV клетками, с требуемыми модифицированными свойствами (такими как повышенная специфичность и/или повышенная или пониженная аффинность), затем отбирают путем модификации условий скрининга, например, в анализе в отношении жестких условий реакции.

Связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения, которая содержит функциональные варианты любой из одной, двух, трех, четырех, пяти или всех шести последовательностей CDR антитела:

(a) 1D3, как определено SEQ ID NO: 8, 9, 10, 14, 15 и 16 соответственно;

(b) 1C10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83 и 118 соответственно;

(c) 1A10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83 и 118 соответственно;

(d) 1G9, как определено SEQ ID NO: 76, 77, 78, 82, 83 и 84 соответственно; и/или

(e) 1E8, как определено SEQ ID NO: 76, 95, 96, 82, 99 и 100 соответственно;

и предпочтительно обладает одним или несколькими свойствами связывания, которые аналогичны или по сути эквивалентны связывающим свойствам 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8 при тестировании в тех же условиях, что и 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8 соответственно, как дополнительно описано выше.

В одном варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения может содержать:

(a) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области тяжелой цепи (V_H) антитела:

i. 1D3, как определено SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR);

ii. 1C10, как определено SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR);

iii. 1A10, как определено SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR);

iv. 1G9, как определено SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR); и/или

v. 1E8, как определено SEQ ID NO: 76, 95 и 96 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR);

и/или

(b) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области легкой цепи (V_L) антитела:

i. 1D3, как определено SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR);

ii. 1C10, как определено SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR);

iii. 1A10, как определено SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR);

iv. 1G9, как определено SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR); и/или

v. 1E8, как определено SEQ ID NO: 82, 99 и 100 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR).

В качестве дополнения или в качестве альтернативы связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения может содержать:

(a) по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности:

i. SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно (и/или функциональный вариант любой одной, двух или трех указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 12 (или ее функциональный вариант);

ii. SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно (и/или функциональный вариант любой одной, двух или трех указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 104 (или ее функциональный вариант);

iii. SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно (и/или функциональный вариант любой одной, двух или трех указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 122 (или ее функциональный вариант);

iv. SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно (и/или функциональный вариант любой одной, двух или трех указанных последовательностей

CDR), и необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 68 (или ее функциональный вариант); и/или

v. SEQ ID NO: 76, 95 и 96 соответственно (и/или функциональный вариант любой одной, двух или трех указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 88 (или ее функциональный вариант);

и/или

(b) по меньшей мере один полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности:

i. SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно (и/или функциональный вариант любой одной, двух или трех указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом один полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 18;

ii. SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно (и/или функциональный вариант любой одной, двух или трех указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом один полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 108;

iii. SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно (и/или функциональный вариант любой одной, двух или трех указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом один полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 126;

iv. SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно (и/или функциональный вариант любой одной, двух или трех указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом один полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 72; и/или

v. SEQ ID NO: 82, 99 и 100 соответственно (и/или функциональный вариант любой одной, двух или трех указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом один полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 92.

Последовательности и идентичности полипептидной последовательности вариабельной области тяжелой цепи (V_H) и вариабельной легкой цепи (V_L) антитела 1D3, как определено SEQ ID NO: 12 и 18 соответственно, являются следующими:

SEQ ID NO: 12	EVKLVESGGG LVQPGGSLRL ACATSGFTFT DYYMSWVRQP PGKALEWLGF IRSKANGYTT EYSASVKGRF TISRDNSQSI LYLQMNTLRS EDSATYYCAR DERRTAWLAY WGQGTLVTVS A	Зрелая форма последовательности V_H 1D3, без лидерной последовательности
SEQ ID NO: 18	DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNGNTYLDW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP TWTFGGGTKL EIK	Зрелая форма последовательности V_L 1D3, без лидерной последовательности

Последовательности и идентичности полипептидной последовательности вариабельной области тяжелой цепи (V_H) и вариабельной легкой цепи (V_L) антитела 1C10, как определено SEQ ID NO: 104 и 108 соответственно, являются следующими:

SEQ ID NO: 104	EVKLVESGGV LVKPGGSLKF SCAASGFTFS SHALSWVRQT PEKRLEWVAS ISSRGRTYYP DSVKGRFTVS RDNARNILYL QVSSLRSEDT AMYYCTRGGT HYSYGNGFDF WGQGTTLTVS S	Зрелая форма последовательности V_H 1C10, без лидерной последовательности
SEQ ID NO: 108	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSVSSSVS YMHWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISTMEAE DAATYYCQQW SNNPPITFGA GTKLELK	Зрелая форма последовательности V_L 1C10, без лидерной последовательности

Последовательности и идентичности полипептидной последовательности вариабельной области тяжелой цепи (V_H) и вариабельной легкой цепи (V_L) антитела 1A10, как определено SEQ ID NO: 122 и 126 соответственно, являются следующими:

SEQ ID NO: 122	EVKLVESGGV LVKPGGSLKF SCAASGFTLS SHALSWVRQT PEKRLEWVAS ISSRGRTYYP DSVKGRFTVS RDNARNILYL QVSSLRSEDT AMYYCTRGGT HYSYGNGFDF WGQGTTLTVS S	Зрелая форма последовательности V_H 1A10, без лидерной последовательности
SEQ ID NO: 126	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSVSSSVS YMHWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISTMEAE DAATYYCQQW SNNPPITFGA GTKLELK	Зрелая форма последовательности VL 1A10, без лидерной последовательности

Последовательности и идентичности полипептидной последовательности вариабельной области тяжелой цепи (V_H) и вариабельной легкой цепи (V_L) антитела 1G9, как определено SEQ ID NO: 68 и 72 соответственно, являются следующими:

SEQ ID NO: 68	EVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYAMSWVRQT PEKRLEWVAS ISSGGSTYYP DSVKGRFTIS RDNARNILYL QMSSLRSEDT AMYYCARGGS TMITTGLGFA YWGQGTLVTV SA	Зрелая форма последовательности V_H 1G9, без лидерной последовательности
SEQ ID NO: 72	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMHWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYCQQW SSNPPLTFGA GTKLELK	Зрелая форма последовательности VL 1G9, без лидерной последовательности

Последовательности и идентичности полипептидной последовательности вариабельной области тяжелой цепи (V_H) и вариабельной легкой цепи (V_L) антитела 1E8, как определено SEQ ID NO: 88 и 92 соответственно, являются следующими:

SEQ ID NO: 88	EVKLVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYAMSWVRQT PEKRLEWVAS ISSGGRTYYP DSVKGRFTIS RDNARNILYL	Зрелая форма последовательности V_H 1E8, без лидерной последовательности

	QMSSLRSEDT AIYYCARGGT RHSYGNGFDY WGQGTTLTVS S	
SEQ ID NO: 92	QIVLSQSPTI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMHWYQQKSG TSPKRWIYDS SKLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYCQQW TSNPPITFGA GTKLELK	Зрелая форма последовательности V_L 1E8, без лидерной последовательности

В других вариантах осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения содержит (a) по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3 цепи V_H другого антитела, имеющего специфичность связывания (и предпочтительно агностическую в отношении штамма специфичность связывания) в отношении ECD3 US28 (и/или функционального варианта любой одной, двух или трех указанных последовательностей CDR), и/или (b) по меньшей мере один полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3 цепи V_L того же другого антитела, имеющего специфичность связывания (и предпочтительно агностическую в отношении штамма специфичность связывания) в отношении ECD3 US28 (и/или функционального варианта любой одной, двух или трех из указанных последовательностей CDR). Указанное другое антитело может, например, представлять собой любое из антител 13-5C6-1B5 и 14-1H3-1A6, как описано в данном документе, и/или другое антитело, которое получено с помощью способа получения дополнительных антител, имеющих специфичность связывания в отношении эпитопа во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 HCMV, как описано выше.

Когда антитело определяется как имеющее вариабельную область легкой цепи, содержащую конкретную аминокислотную последовательность, и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую конкретную аминокислотную последовательность, следует понимать, что до одной или двух из этих последовательностей можно варьировать, как определено. Вариация может находиться исключительно в пределах отличных от областей CDR последовательностей, исключительно в пределах последовательностей областей CDR или в пределах как отличных от CDR областей последовательностей, так и областей CDR последовательностей. Обычно вариация находится за пределами областей CDR, и поэтому варианты вариабельных областей

легкой цепи и вариабельных областей тяжелой цепи могут содержать любую из конкретных последовательностей CDR, определенных в данном документе.

Если антитело содержит вариант вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, как определено в данном документе (например, V_H, выбранная из SEQ ID NO: 12, 104, 122, 130, 68 и 88, и/или V_L, выбранная из SEQ ID NO: 18, 108, 126, 134, 72 и 92), вариант может иметь по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен. Обычно варианты содержат не более 30, 20 или 10 аминокислотных замен. Следовательно, варианты могут иметь по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, но не более 30, 20 или 10 аминокислотных замен.

Если антитело содержит вариант вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, как определено в данном документе (например, V_H, выбранную из SEQ ID NO: 12, 104, 122, 130, 68 и 88, и/или V_L, выбранную из SEQ ID NO: 18, 108, 126, 134, 72 и 92), вариант обычно имеет по меньшей мере 70% идентичности последовательности с определенной аминокислотной последовательностью, например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности последовательности и, как правило, имеет 95-99% идентичности последовательности с определенной аминокислотной последовательностью (например, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности). Уровень вариации может быть применим исключительно к отличной от CDR области. Например, вариант вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи, как определено в данном документе (например, V_H, выбранную из SEQ ID NO: 12, 104, 122, 130, 68 и 88, и/или V_L, выбранную из SEQ ID NO: 18, 108, 126, 134, 72 и 92), может иметь по меньшей мере 70% идентичности (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с определенной аминокислотной последовательностью, но содержат один или несколько (например, все) идентичных CDR, как определено в данном документе.

Процент идентичности последовательностей между двумя полипептидами можно определить с использованием подходящих компьютерных программ, например программы GAP Группы генетических вычислений Университета Висконсина (University of Wisconsin Genetic Computing Group), и следует понимать, что процент идентичности рассчитывается по отношению к полипептидам, последовательность которых оптимально выровнена. В качестве альтернативы выравнивание можно провести с использованием программы Clustal W (Thompson *et al.*, (1994) *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-80). Используемые параметры могут быть следующими: параметры

быстрого попарного выравнивания: размер участка максимального совпадения (слово); 1, размер окна; 5, штраф за гэп; 3, количество верхних диагоналей; 5. Метод оценки: x процентов. Несколько параметров выравнивания: штраф за гэп; 10, штраф за продление гэпа; 0,05. Матрица оценок: BLOSUM.

Связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения, которая содержит функциональные варианты полипептидной последовательности вариабельной области тяжелой цепи (V_H) и/или вариабельной области легкой цепи (V_L) антитела 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8, как определено SEQ ID NO: 12, 104, 122, 68 и 88 для V_H и 18, 108, 126, 72 и 92 для V_L соответственно, предпочтительно обладает одним или несколькими связывающими свойствами, которые аналогичны или по сути эквивалентны связывающим свойствам 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8, при тестировании в тех же условиях, что и 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8, соответственно, как дополнительно описано выше.

Обычно предпочтительно, чтобы аминокислотные замены вариантов, раскрытых в данном документе, представляли собой консервативные аминокислотные замены, например, когда аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Консервативные аминокислотные замены хорошо известны в данной области техники и включают (исходный остаток → замена) Ala (A) → Val, Gly или Pro; Arg (R) → Lys или His; Asn (N) → Gln; Asp (D) → Glu; Cys (C) → Ser; Gln (Q) → Asn; Glu (G) → Asp; Gly (G) → Ala; His (H) → Arg; Ile (I) → Leu; Leu (L) → Ile, Val или Met; Lys (K) → Arg; Met (M) → Leu; Phe (F) → Tyr; Pro (P) → Ala; Ser (S) → Thr или Cys; Thr (T) → Ser; Trp (W) → Tyr; Tyr (Y) → Phe или Trp; и Val (V) → Leu или Ala.

Антитела

В одном неограничивающем, но предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения может представлять собой антитело.

Термин «антитело», используемый в данном документе, необязательно включает антигенсвязывающие фрагменты указанного антитела. Термин «химерный антигенный рецептор (CAR)», используемый в данном документе, необязательно включает антигенсвязывающие фрагменты указанного CAR.

Под «антителом или его антигенсвязывающим фрагментом» подразумеваются по сути интактные молекулы антитела, а также химерные антитела, гуманизированные

антитела, выделенные человеческие антитела, одноцепочечные антитела, моноспецифические антитела, биспецифические антитела, тяжелые цепи антитела, легкие цепи антитела, гомодимеры и гетеродимеры тяжелых и/или легких цепей антитела, а также их антигенсвязывающие фрагменты и производные. Подходящие антигенсвязывающие фрагменты и производные включают фрагменты Fv (например, одноцепочечные Fv и Fv с дисульфидной связью), Fab-подобные фрагменты (например, Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты и фрагменты F(ab)2), одиночные вариабельные домены (например, VH- и VL-домены) и однодоменные антитела (dAb, включая одиночные и двойные форматы [т.е. dAb-линкер-dAb] и нанотела). Потенциальные преимущества использования фрагментов антител, а не целых антител, являются кратными. Меньший размер фрагментов может приводить к улучшению фармакологических свойств, таких как лучшее проникновение в твердые ткани. Кроме того, антигенсвязывающие фрагменты, такие как фрагменты антител Fab, Fv, ScFv и dAb, могут экспрессироваться и секретироваться из рекомбинантных источников (например, клеток CHO, *E. coli* и т.д.), что позволяет легко продуцировать большие количества указанных фрагментов.

Под «антителом» или «его антигенсвязывающим фрагментом» подразумеваются по сути интактные молекулы антитела, а также химерные антитела, гуманизированные антитела и выделенные человеческие антитела.

«Антитело», включая «его антигенсвязывающий фрагмент», CAR или его антигенсвязывающий фрагмент и/или другую связывающую молекулу в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения может, например:

i. иметь валентность «n», где n представляет собой целое число, равное одному или более, и поэтому, например, может быть одновалентным, бивалентным, тривалентным или мультивалентным; и/или

ii. иметь специфичность связывания в отношении одного антигена или двух или более различных антигенов, например, оно может иметь способность специфически связываться с «x» различными антигенами, где x представляет собой целое число, равное одному, двум или более, при условии, что по меньшей мере один антиген представляет собой ECD3 белка US28; например, оно может иметь моноспецифическую, биспецифическую, триспецифическую или мультиспецифическую специфичность связывания.

Иллюстративные формы антитела или его антигенсвязывающих фрагментов могут включать одно или несколько одноцепочечных антител, биспецифических антител, тяжелых цепей антитела, легких цепей антитела, гомодимеров и гетеродимеров

тяжелых и/или легких цепей антитела, а также их антигенсвязывающие фрагменты и производные. Подходящие антигенсвязывающие фрагменты и производные включают фрагменты Fv (например, одноцепочечные Fv и Fv с дисульфидной связью), Fab-подобные фрагменты (например, Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты и фрагменты F(ab)2), одиночные вариабельные домены (например, VH- и VL-домены) и однодоменные антитела (dAb, включая одиночные и двойные форматы [т.е. dAb-линкер-dAb] и нанотела). Потенциальные преимущества использования фрагментов антител, а не целых антител, являются кратными. Меньший размер фрагментов может приводить к улучшению фармакологических свойств, таких как лучшее проникновение в твердые ткани. Кроме того, антигенсвязывающие фрагменты, такие как Fab, Fv, одноцепочечные Fv (ScFv) и фрагменты антител dAb, могут экспрессироваться и секретироваться из рекомбинантных клеток-хозяев, таких как *E. coli*, что позволяет легко производить большие количества указанных фрагментов.

Термин «биспецифический», используемый в данном документе, означает, что полипептид способен специфически связывать по меньшей мере два объекта-мишени. Каждый из этих объектов-мишеней может относиться к эпитопам, полученным из одного и того же белка (например, связывание с первым эпитопом и вторым эпитопом одного и того же белка, например, US28). В качестве альтернативы объекты-мишени могут представлять собой эпитопы, полученные из разных белков (например, связывание с первым эпитопом первого белка и вторым эпитопом второй, другой мишени, такой как другой белок).

Под «молекулами ScFv» подразумевают молекулы, где домены партнеров V_H и V_L связаны посредством гибкого олигопептида. Сконструированные антитела, такие как антитела на основе ScFv, можно получить с использованием методик и подходов, давно известных в данной области техники. Преимущества использования фрагментов антител, а не целых антител, являются кратными. Меньший размер фрагментов может приводить к улучшению фармакологических свойств, таких как лучшее проникновение в целевой участок. Эффекторные функции целых антител, такие как связывание комплемента, устраняют. Фрагменты антител Fab, Fv, ScFv и dAb могут экспрессироваться в *E. coli* и секретироваться в ней, что позволяет легко получать большие количества фрагментов. Целые антитела и фрагменты $F(ab')_2$ являются «бивалентными». Под «бивалентным» подразумевается, что антитела и фрагменты $F(ab')_2$ имеют два антигенсвязывающих сайта. В отличие от этого, фрагменты Fab, Fv, ScFv и dAb являются моновалентными и имеют только один антигенсвязывающий сайт.

Фразы «антитело» или «его антигенсвязывающий фрагмент» также подразумевают миметики антитела (например, каркасные структуры, не являющиеся антителами, которые имеют высокую степень стабильности, но допускают введение вариабельности в определенных положениях). Специалисты в области биохимии знакомы со многими такими молекулами, как обсуждалось в Gebauer & Skerra, 2009. Иллюстративные аналоги антител включают в себя: аффитела (также обозначаемые тринектинами; Nygren, 2008, *FEBS J*, 275, 2668-2676); CTLD (также обозначаемые тетранектинами; *Innovations Pharmac. Technol.* (2006), 27-30); аднектины (также обозначаемые монотелами; *Meth. Mol. Biol.*, 352 (2007), 95-109); антикалины (*Drug Discovery Today* (2005), 10, 23-33); DARPin (анкирины; *Nat. Biotechnol.* (2004), 22, 575-582); авимеры (*Nat. Biotechnol.* (2005), 23, 1556-1561); микротельца (*FEBS J*, (2007), 274, 86-95); пептидные аптамеры (*Expert. Opin. Biol. Ther.* (2005), 5, 783-797); домены Кунитца (*J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2006) 318, 803-809); аффилины (*Trends. Biotechnol.* (2005), 23, 514-522); аффимеры (Avacta Life Sciences, Уэтерби, Великобритания).

Специалистам в данной области техники также будет понятно, что настоящее изобретение также охватывает модифицированные версии антител и их антигенсвязывающие фрагменты, существующие в настоящее время или в будущем, например, модифицированные путем ковалентного присоединения полиэтиленгликоля или другого подходящего полимера (см. ниже) и/или ковалентного или нековалентного присоединения (например, путем презентации в виде слитого белка) с другими полипептидными последовательностями.

Способы получения антител и фрагментов антител хорошо известны в данной области техники. Например, антитела могут быть получены с помощью любого из нескольких способов, которые используют индукцию продуцирования молекул антител *in vivo*, скрининг библиотек иммуноглобулинов (Orlandi *et al.*, 1989; Winter *et al.*, 1991) или создание молекул моноклональных антител с помощью клеточных линий в культуре. Они включают без ограничения методику гибридомы, методику гибридомы В-клеток человека и методику гибридомы вируса Эпштейна-Барра (EBV) (Kohler *at al.*, 1975. *Nature* **256**:4950497; Kozbor *et al.*, 1985. *J. Immund. Methods* **81**:31-42; Cote *et al.*, 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:2026-2030; Cole *et al.*, 1984. *Mol. Cell. Biol.* **62**:109-120)

Подходящие способы получения моноклональных антител также раскрыты в *"Monoclonal Antibodies: A manual of techniques"*, H Zola (CRC Press, 1988) и в *"Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications"*, J G R Hurrell (CRC Press, 1982).

Термин «моноклональное антитело», используемый в данном документе, включает ссылку на антитело, полученное из популяции по сути гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, при этом они направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов стандартных (поликлональных) антител, которые обычно содержат разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. Помимо своей специфичности, моноклональные антитела имеют преимущество в том, что они синтезируются гибридомной культурой, неконтаминированной другими иммуноглобулинами. Модификатор «моноклональный» указывает на то, что антитело получено из по сути гомогенной популяции антител, и его не следует рассматривать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены гибридомным методом, впервые описанным Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975), или могут быть получены методами рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567). «Моноклональные антитела» также можно выделить из библиотек фаговых антител с использованием методик, описанных в Clackson et at, Nature, 352:624-628 (1991), и Marks et at, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), в качестве примера.

Подобным образом фрагменты антител можно получить с использованием способов, хорошо известных в данной области техники (см., например, Harlow & Lane, 1988, “Antibodies: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Например, фрагменты антител в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены путем протеолитического гидролиза антитела или путем экспрессии в *E. coli* или клетках млекопитающих (например, культуре клеток яичника китайского хомячка [CHO] или других системах экспрессии белка) ДНК, кодирующей фрагмент. В качестве альтернативы фрагменты антител можно получить путем расщепления целых антител пепсином или папаином обычными методами.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что для терапии и/или диагностики человека предпочтительно использовать человеческие или гуманизированные антитела. Гуманизированные формы отличных от человеческих (например, мышиных) антител представляют собой генетически сконструированные

химерные антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты), предпочтительно содержащие минимальные части, полученные из отличных от человеческих антител. Гуманизированные антитела включают антитела, в которых комплементарно определяющие области (CDR) человеческого антитела (антитело-реципиент) заменены остатками из определяющей комплементарность области, представляющей интерес, отличного от человека вида (донорское антитело), такого как мышь, крыса или кролик, имеющих требуемую функциональность. В некоторых случаях остатки каркаса Fv человеческого антитела заменены соответствующими отличными от человеческих остатками. Гуманизированные антитела могут также содержать остатки, которые не обнаруживаются ни в антителе-реципиенте, ни в импортированной определяющей комплементарность области, или каркасных последовательностях. В общем, гуманизированное антитело будет содержать по сути все из по меньшей мере одного, а обычно двух вариабельных доменов, в которых все или по сути все определяющие комплементарность области соответствуют областям донорского антитела, представляющего интерес, такого как отличное от человеческого антитело, и все или по сути все каркасные области соответствуют областям соответствующей консенсусной последовательности человека. Гуманизированные антитела оптимально также включают по меньшей мере часть константной области антитела, такую как Fc-область, обычно полученную из человеческого антитела (см., например, Jones *et al.*, 1986. *Nature* **321**:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* **332**:323-329; Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* **2**:593-596, которая включена в данный документ посредством ссылки).

Способы гуманизации отличных от человеческих антител хорошо известны в данной области техники. Обычно гуманизированное антитело содержит один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из отличного от человеческого источника. Эти отличные от человеческих аминокислотные остатки, часто называемые импортированными остатками, обычно берут из импортированного вариабельного домена. Гуманизацию можно проводить по сути так, как описано (см., например, Jones *et al.*, 1986; Reichmann *et al.*, 1988; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science* **239**:1534-1536I; патент США 4816567, которые включены в данный документ посредством ссылки) путем замены определяющих комплементарность областей, человека, соответствующими определяющими комплементарность областями грызунов. Соответственно, такие гуманизированные антитела представляют собой химерные антитела, в которых существенно меньше, чем интактный вариабельный домен человека, заменено

соответствующей последовательностью из отличного от человека вида. На практике гуманизированные антитела обычно могут представлять собой человеческие антитела, в которых некоторые остатки определяющей комплементарность области, и, возможно, некоторые остатки каркасной области заменены остатками из аналогичных участков в антителах грызунов.

Человеческие антитела также можно идентифицировать с использованием различных методик, известных в данной области техники, включая библиотеки фагового дисплея (см., например, Hoogenboom & Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* **227**:381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* **222**:581; Cole *et al.*, 1985, In: *Monoclonal antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pp. 77; Boerner *et al.*, 1991. *J. Immunol.* **147**:86-95, Soderlind *et al.*, 2000, *Nat Biotechnol* **18**:852-6, и WO 98/32845, которые включены в данный документ посредством ссылки).

Специалистам в данной области техники будет понятно, что полипептиды, например, антитела по настоящему изобретению могут иметь любую подходящую структурную форму.

Антитела также могут состоять из Fc-области, для которой существуют Fc-специфичные рецепторы. Конструирование Fc-области терапевтического моноклонального антитела или Fc-слитого белка позволяет создавать молекулы, которые лучше подходят для требуемой от них фармакологической активности (Strohl, 2009, *Curr Opin Biotechnol* **20**(6):685-91, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки).

(a) *Сконструированные Fc-области для повышения периода полужизни*

Один из подходов к повышению эффективности терапевтического антитела заключается в повышении его персистенции в сыворотке крови, что позволяет обеспечивать более высокие циркулирующие уровни, менее частое введение и снижение доз.

Период полужизни IgG зависит от его pH-зависимого связывания с неонатальным FcRn-рецептором. FcRn, который экспрессируется на поверхности эндотелиальных клеток, связывает IgG в зависимости от pH и защищает его от расщепления.

Антитела, которые избирательно связывают FcRn при pH 6,0, но не при pH 7,4, обеспечивают более длительный период полужизни в различных моделях животных.

Несколько мутаций, расположенных на границе между доменами CH2 и CH3, такие как T250Q/M428L (Hinton *et al.*, 2004, *J Biol Chem.* **279**(8):6213-6, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки), и M252Y/S254T/T256E +

H433K/N434F (Vaccaro et *al.*, 2005, *Nat Biotechnol.* **23**(10):1283-8, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки), как было показано, повышают аффинность связывания с FcRn и период полужизни IgG1 *in vivo*.

(b) *Сконструированные Fc-области для измененной эффекторной функции*

Аффинность Fc-части антитела в отношении FcγRI, FcγRII и III можно сравнить с IgG1 дикого типа с помощью проточной цитометрии, чтобы определить, при какой концентрации достигается полумаксимальное связывание клеток, экспрессирующих FcγR (Hezareh *et al.*, 2001, *J Virol.*, **75**(24): 12161–12168, включено в данный документ посредством ссылки). В качестве альтернативы это можно определить с помощью иммуноферментных анализов FcγR (ELISA) (Shields *et al.*, 2001, *Mol. Basis Cell Dev. Biol.*, **276**(9): 6591-6604, включено в данный документ посредством ссылки).

Четыре изотипа IgG человека связываются с активирующими рецепторами Fcγ (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa), ингибирующим рецептором FcγRIIb и первым компонентом системы комплемента (C1q) с разными аффинностями, обеспечивая очень разные эффекторные функции (Bruhns *et al.*, 2009, *Blood.* **113**(16):3716-25, раскрытия которой включены в данный документ посредством ссылки). Молекулы IgG1 имеют наиболее высокую аффинность и способность индуцировать эффекторные функции, тогда как IgG2, IgG3 и IgG4 менее эффективны (Bruhns, 2012, Blood. 119(24):5640-9; Hogarth and Pietersz, 2012, Nature Reviews Drug Discovery 11, 311-331; Stewart et al. 2014 Journal for ImmunoTherapy of Cancer 2:29; Wang et al. 2015 Front Immunol; 6: 368; Vidarsson et al. 2014, Front Immunol. 5:520, включено в данный документ посредством ссылки). Кроме того, определенные мутации в Fc-области IgG1 резко снижают аффинность FcγR и эффекторную функцию, сохраняя при этом взаимодействие с неонатальным FcR (FcRn) (Ju and Jung, 2014, *Curr Opin Biotechnol.* **30**:128-39; Leabman et al. 2013, mAbs, 5:6, 896-903; Oganesyan et al. 2008 *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **64**(Pt 6): 700-704; Oganesyan et al. 2008 *Mol Immunol.* **45**(7):1872-82; Sazinsky et al., 2008 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**(51) 20167-20172, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки).

Наиболее широко используемыми мутантами IgG1 являются N297A отдельно или в комбинации с D265A, а также мутации в положениях L234 и L235, включая так называемый двойной мутант «LALA» L234A/L235A. Другое положение, описанное для дальнейшего подавления IgG1 путем мутации, представляет собой P329 (см. US 2012/0251531). Дополнительные мутации в Fc-области описаны в WO 2021/234402. Соответственно, связывающие молекулы по настоящему изобретению могут содержать

любую из Fc-областей, как описано в WO 2021/234402, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

В иллюстративных вариантах осуществления полипептид выбран из групп, состоящих из (любой из которых может быть моноспецифическим или биспецифическим):

(a) бивалентных антител, таких как антитела IgG-scFv (например, где первый связывающий домен представляет собой интактный IgG, а второй связывающий домен представляет собой scFv, прикрепленный к первому связывающему домену на N-конце легкой цепи и/или на C-конце легкой цепи, и/или на N-конце тяжелой цепи и/или на C-конце тяжелой цепи IgG, или наоборот);

(b) моновалентных антител, таких как *DuoBody*® (Genmab AS, Копенгаген, Дания) или биспецифическое антитело типа «выступ во впадине» (например, scFv-KIH, scFv-KIH^r, BiTE-KIH или BiTE-KIH^r (см. Xu *et al*., 2015, *mAbs* 7(1):231-242);

(c) антител на основе $scFv_2$-Fc (такие как биспецифические антитела *ADAPTIR*™ от Emergent Biosolutions Inc);

(d) антитела на основе BiTE/$scFv_2$;

(e) антител на основе DVD-Ig;

(f) антител на основе DART (например, $DART_2$-Fc или DART);

(g) антител на основе DNL-Fab_3; и

(h) антител на основе scFv-HSA-scFv.

Например, антитело может представлять собой антитело на основе IgG-scFv. Антитело на основе IgG-scFv может иметь ориентацию VH-VL или VL-VH. В одном варианте осуществления scFv может быть стабилизирован с помощью мостика S-S между VH и VL.

Первый связывающий домен и второй связывающий домен могут быть непосредственно слиты друг с другом. В качестве альтернативы первый связывающий домен и второй связывающий домен могут быть соединены посредством линкера, такого как полипептидный линкер. Например, полипептидный линкер может представлять собой короткий линкерный пептид, содержащий от приблизительно 10 до приблизительно 25 аминокислот. Линкер обычно богат глицином для обеспечения гибкости, а также серином или треонином для обеспечения растворимости и может либо соединять N-конец VH с C-концом VL, либо наоборот.

Термины «активность связывания» и «аффинность связывания» предназначены для обозначения тенденции полипептидной молекулы связываться или не связываться с

мишенью. Аффинность связывания может быть определена количественно путем определения константы диссоциации (Kd) полипептида и его мишени. Более низкая Kd указывает на более высокую аффинность в отношении мишени. Аналогично, специфичность связывания полипептида с его мишенью может быть определена с точки зрения сравнительных констант диссоциации (Kd) полипептида в отношении его мишени по сравнению с константой диссоциации по отношению к полипептиду и другой, нецелевой молекуле.

Значение этой константы диссоциации может быть определено непосредственно хорошо известными способами и может быть вычислено даже для сложных смесей такими способами, как те, которые изложены, например, в Cacecі *et al.*, 1984. Например, Kd может быть установлена с использованием анализа связывания нитроцеллюлозного фильтра с двойным фильтром, такого как анализ, который раскрыт Wong & Lohman, 1993. В данной области техники известны другие стандартные анализы для оценки способности связывания лигандов, таких как антитела, с мишенями, включая, например, ELISA, вестерн-блоттинг, RIA и анализ проточной цитометрии. Кинетику связывания (например, аффинность связывания) полипептида также можно оценить с помощью стандартных анализов, известных в данной области техники, таких как системный анализ Biacore™.

Можно провести анализ конкурентного связывания, в котором связывание полипептида с мишенью сравнивают со связыванием мишени другим известным лигандом этой мишени, таким как другой полипептид. Концентрация, при которой происходит 50% ингибирование, известна как Ki. В идеальных условиях Ki эквивалентно Kd. Значение Ki никогда не будет меньше, чем Kd, поэтому измерение Ki можно удобно заменить, чтобы получить верхний предел для Kd.

Альтернативные показатели аффинности связывания включают EC50 или IC50. В этом контексте EC50 указывает концентрацию, при которой полипептид достигает 50% максимального связывания с фиксированным количеством мишени. IC50 указывает концентрацию, при которой полипептид ингибирует 50% максимального связывания фиксированного количества конкурента с фиксированным количеством мишени. В обоих случаях более низкий уровень EC50 или IC50 указывает на более высокую аффинность в отношении мишени. Значения EC50 и IC50 лиганда в отношении его мишени можно определить с помощью хорошо известных способов, например, ELISA. Подходящие анализы для оценки EC50 и IC50 полипептидов представлены в разделе «Примеры».

Как уже упоминалось, антитела можно получать с помощью стандартных методик, например, путем иммунизации соответствующим (глико)полипептидом или его частью(ями) или с использованием библиотеки фагового дисплея.

Если требуются поликлональные антитела, выбранное млекопитающее (например, мышь, кролик, коза, лошадь и т.д.) иммунизируют иммуногенным полипептидом, несущим требуемый(е) эпитоп(ы), необязательно гаптенизированный(ы) до другого полипептида. В зависимости от вида хозяина для усиления иммунологического ответа можно использовать различные адъюванты. Такие адъюванты включают без ограничения адъюванты Фрейнда, минеральные гели, такие как гидроксид алюминия, и поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, плюроновые полиолы, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, гемоцианин лимфы улитки и динитрофенол. Сыворотку иммунизированного животного собирают и обрабатывают в соответствии с известными процедурами. Если сыворотка, содержащая поликлональные антитела к требуемому эпитопу, содержит антитела к другим антигенам, поликлональные антитела можно очистить с помощью иммуноаффинной хроматографии. Методики получения и обработки поликлональных антисывороток хорошо известны в данной области техники.

Моноклональные антитела, направленные против целых полипептидов или их конкретных эпитопов (например, в случае настоящей заявки против ECD3 US28), также могут быть легко получены специалистом в данной области техники. Общая методика получения моноклональных антител с помощью гибридом хорошо известна. Бессмертные клеточные линии, продуцирующие антитела, могут быть созданы путем слияния клеток, а также с помощью других методик, таких как прямая трансформация В-лимфоцитов онкогенной ДНК или трансфекция вирусом Эпштейна-Барра. Панели моноклональных антител, продуцируемых против перечисленных выше полипептидов, можно подвергать скринингу в отношении различных свойств; т.е. по изотипической и эпитопной специфичности и/или аффинности, а также по агностическим в отношении штамма связывающим свойствам. Моноклональные антитела можно получить с использованием любой из хорошо известных методик, которая обеспечивает получение молекул антител с помощью непрерывных клеточных линий в культуре.

В некоторых вариантах осуществления может быть предпочтительным, если антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых обстоятельствах, особенно если антитело необходимо повторно вводить пациенту-человеку, предпочтительно, если моноклональное антитело представляет собой человеческое

моноклональное антитело или гуманизированное моноклональное антитело, которые являются подходящими для введения людям, не вызывая иммунного ответа со стороны человека против введенного иммуноглобулина. Подходящим образом полученные отличные от человеческих антитела можно «гуманизировать» известными способами, например, путем вставки областей CDR мышиных антител в каркас человеческих антител. Гуманизированные антитела можно получить с использованием методик и подходов, описанных в Verhoeyen *et al.*, (1988) *Science*, 239, 1534-1536, и в Kettleborough *et al.*, (1991) *Protein Engineering*, 14(7), 773-783. В некоторых случаях остатки каркаса Fv человеческого иммуноглобулина заменяются соответствующими остатками отличного от человеческого происхождения. В общем, гуманизированное антитело будет содержать вариабельные домены, в которых все или большинство областей CDR соответствуют областям отличного от человеческого иммуноглобулина, и каркасные области, которые по сути или полностью являются областями консенсусной последовательности иммуноглобулина человека.

Полностью человеческие антитела могут быть получены с использованием рекомбинантных технологий. Обычно используются большие библиотеки, содержащие миллиарды различных антител. В отличие от предыдущих технологий, использующих химеризацию или гуманизацию, например, мышиных антител, эта технология не основана на иммунизации животных для получения специфического антитела. Вместо этого рекомбинантные библиотеки содержат огромное количество готовых вариантов антител, причем вполне вероятно, что библиотека будет содержать по меньшей мере одно антитело, специфическое в отношении любого антигена. Таким образом, используя такие библиотеки, можно идентифицировать существующее антитело, имеющее требуемые связывающие характеристики. Чтобы эффективно найти хорошее связывающее вещество в библиотеке, были разработаны различные системы, в которых фенотип, т.е. антитело или его фрагмент, связаны с его генотипом, т.е. кодирующим(ими) геном(ами). Наиболее часто используемой такой системой является так называемая система фагового дисплея, в которой фрагменты антител экспрессируются, отображаются в виде слияний с белками фаговой оболочки на поверхности нитчатых фаговых частиц, одновременно неся генетическую информацию, кодирующую отображаемую молекулу (McCafferty *et al.*, 1990, *Nature* 348: 552-554). Фаг, отображающий фрагменты антител, специфические для конкретного антигена, может быть выбран посредством связывания с рассматриваемым антигеном. Затем выделенный фаг может быть амплифицирован, и ген, кодирующий выбранные вариабельные домены

антитела, может быть необязательно перенесен в другие форматы антител, такие как, например, полноразмерный иммуноглобулин, и экспрессируется в больших количествах с использованием соответствующих векторов и клеток-хозяев, хорошо известных в данной области техники. В качестве альтернативы, «человеческие» антитела могут быть получены путем иммунизации трансгенных мышей, которые содержат по сути гены иммуноглобулинов человека (Vaughan *et al.*, (1998) *Nature Biotechnol.* 16, 535-539).

Понятно, что когда антитело предназначено для введения отличному от человека индивидууму, антитело может быть специально разработано/произведено для предполагаемого вида реципиента.

Формат отображения специфичности антител на фаговых частицах может отличаться. Наиболее часто используемыми форматами являются Fab (Griffiths *et al.*, 1994. *EMBO J.* 13: 3245-3260) и scFv (Hoogenboom *et al.*, 1992, *J Mol Biol.* 227: 381-388), оба содержат вариабельные антигенсвязывающие домены антител. Одноцепочечный формат состоит из вариабельного тяжелого домена (V_H), связанного с вариабельным легким доменом (V_L) посредством гибкого линкера (патент США 4946778). Перед использованием в качестве терапевтического средства антитело можно перевести в растворимый формат, например Fab или scFv и анализировать как таковое. На более поздних стадиях фрагмент антитела, имеющий требуемые характеристики, может быть переведен в другие форматы, такие как полноразмерные антитела.

В WO 98/32845 и Soderlind *et al.*, (2000) *Nature BioTechnol.* 18: 852-856 описывают технологию создания вариабельности в библиотеках антител. Все фрагменты антител, полученные из этой библиотеки, имеют одинаковые каркасные области и отличаются только своими CDR. Поскольку каркасные области имеют последовательность зародышевой линии, ожидается, что иммуногенность антител, полученных из библиотеки или аналогичных библиотек, полученных с использованием той же технологии, будет особенно низкой (Soderlind *et al.*, 2000, выше). Это свойство имеет большое значение для терапевтических антител, поскольку снижает риск образования у пациента антител к введенному антителу, тем самым снижая риски аллергических реакций, возникновения блокирующих антител и обеспечивая длительный период полужизни антитела из плазмы крови. Таким образом, при разработке терапевтических антител для применения у людей современную технологию рекомбинантных библиотек (Soderlind *et al.*, 2001, *Comb. Chem. & High Throughput Screen.* 4: 409-416) в настоящее время используют вместо более ранней гибридомной технологии.

К антителам также относятся антитела с тяжелой цепью, структурно полученные из антител верблюжьих, такие как Nanobodies® (Ablynx). Это терапевтические белки, полученные из антител, которые имеют структурные и функциональные свойства встречающихся в природе антител с тяжелой цепью. Технология Nanobody® была разработана после открытия того, что верблюжьи (верблюды и ламы) обладают полнофункциональными антителами, в которых отсутствуют легкие цепи. Эти антитела с тяжелой цепью содержат один вариабельный домен (VHH) и два константных домена (C_H2 и C_H3). Клонированный и выделенный домен VHH представляет собой совершенно стабильный полипептид, обладающий полной антигенсвязывающей способностью исходного антитела с тяжелой цепью. Эти домены VHH с их уникальными структурными и функциональными свойствами составляют основу Nanobodies®. Они сочетают в себе преимущества традиционных антител (высокая специфичность в отношении мишени, высокая аффинность в отношении мишени и низкая природная токсичность) с важными особенностями низкомолекулярных лекарственных средств (способность ингибировать ферменты и получать доступ к щелям рецепторов). Более того, они стабильны, их можно вводить иными способами, кроме инъекций, их легче производить, и их можно гуманизировать. (См., например, US 5840526; US 5874541; US 6005079, US 6765087; EP 1589107; WO 97/34103; WO97/49805; US 5800988; US 5874541 и US 6015695).

Предпочтительно, чтобы антитело или другая связывающая молекула, которая избирательно связывается с ECD3 US28, не связывало родственный полипептид, такой как CCR5, или чтобы антитело связывало US28 с более высокой аффинностью, чем для родственного полипептида, такого как CCR5. Предпочтительно антитело связывается с US28 с аффинностью в по меньшей мере 5, в по меньшей мере 10 или в по меньшей мере 50 раз большей, чем для родственного полипептида. Более предпочтительно, чтобы молекула антитела связывала US28 с аффинностью по в меньшей мере 100, или в по меньшей мере 1000, или в по меньшей мере 10000 раз большей, чем для родственного полипептида. Такое связывание можно определить способами, хорошо известными в данной области техники, такими как одна из систем Biacore®.

Биспецифические антитела и другие биспецифические связывающие молекулы

В одном варианте осуществления, представляющем особый интерес, связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения представляет собой или содержит биспецифическую связывающую молекулу.

Например, биспецифическая связывающая молекула в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения может содержать первый домен, способный рекрутировать активность эффекторной клетки путем специфического связывания с эффекторным антигеном, расположенным на эффекторной клетке; и второй домен, способный специфически связываться с ECD3 белка US28, кодируемого HCMV, в качестве целевого антигена, при этом указанный целевой антиген может располагаться на клетке-мишени, отличной от эффекторной клетки. Второй домен представляет собой или содержит связывающую молекулу в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения.

Все или часть первого и второго доменов необязательно могут быть соединены одной или несколькими линкерными последовательностями. Первый домен может содержать множество функциональных доменов, и каждый из этих функциональных доменов может быть связан с соседним доменом либо напрямую, либо через линкерную последовательность и/или может быть образован из более чем одной отдельной полипептидной последовательности. Второй домен может содержать множество функциональных доменов, и каждый из этих функциональных доменов может быть связан с соседним доменом либо напрямую, либо через линкерную последовательность и/или может быть образован из более чем одной отдельной полипептидной последовательности.

В тех случаях, когда одна или несколько линкерных последовательностей присутствуют в биспецифической связывающей молекуле по настоящему изобретению, каждая линкерная последовательность может быть независимо выбрана из любой подходящей линкерной последовательности. Например, каждая линкерная последовательность может представлять собой по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более аминокислотных остатков в длину. Каждая линкерная последовательность может содержать любую встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления каждая линкерная последовательность может содержать или состоять из аминокислот глицина и серина. В другом варианте осуществления последовательность линкера или каждая последовательность линкера может содержать или состоять из наборов повторов глицина и серина, таких как $(Gly_4Ser)_n$, где n представляет собой положительное целое число, равное или большее 1, например, 2, 3, 4, 5, 6 или больше. В одном варианте осуществления линкер представляет собой $(Gly_4Ser)_3$. Вариации длины линкера могут

сохранять или усиливать активность, что приводит к более высокой эффективности в исследованиях активности.

В одном варианте осуществления биспецифическая связывающая молекула представляет собой формат биспецифического антитела (bsAb), такой как описанный в Suurs *et al.*, 2019, Pharmacology & Therapeutics, 201: 103–119 (содержание которых включено в данный документ посредством ссылки) и, в частности, один или несколько форматов, показанных на фигуре 1C Suurs et al., 2019 (выше), таких как TriMab, IgG-подобное BsAb, CrossMab, CrossMab 2:1, CrossMab 2:2, DuoBody, DVD-Ig BsAb, scFv-IgG и IgG-IgG, Fab-scFv-Fc, TF, ADAPTIR, BiTE, BiTE-Fc, DART, DART-Fc, тетравалентный DART, TandAb, ImmTAC, TriKE и scFv-scFv-scFv или Tris-специфический формат нанотел.

В одном варианте осуществления первый и/или второй домен могут содержать по меньшей мере одну вариабельную область легкой цепи и/или по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи. В одном варианте осуществления первый и/или второй домен могут содержать по меньшей мере одну вариабельную область легкой цепи и по меньшей мере одну вариабельную область тяжелой цепи с образованием scFv. В одном варианте осуществления первый и/или второй домен содержат нековалентный димер scFv, соединенный линкером (например, небольшим пептидным линкером) с образованием диантитела. В одном варианте осуществления первый и/или второй домен могут содержать несколько диантител с образованием тандемного диатела (TandAb).

В одном варианте осуществления первый и/или второй домен могут дополнительно содержать по меньшей мере одну константную легкую цепь и/или по меньшей мере одну константную тяжелую цепь. Например, первый и/или второй домен может содержать scFv, который дополнительно содержит константную легкую цепь и константную тяжелую цепь с образованием Fab. В одном варианте осуществления первый и/или второй домен содержит несколько Fab (например, два Fab).

В одном варианте осуществления первый и/или второй домен могут дополнительно содержать по меньшей мере один Fc. Например, первый и/или второй домен могут содержать scFv, который дополнительно содержит Fc с образованием scFv-IgG. В качестве дополнения или в качестве альтернативы первый и/или второй домен могут содержать два домена Fab, которые дополнительно содержат Fc для образования IgG.

В одном варианте осуществления первый домен может представлять собой scFv, соединенный со вторым доменом, который представляет собой scFv, необязательно

через линкер, с образованием BiTE, необязательно при этом BiTE дополнительно содержит Fc с образованием BiTE-Fc.

В одном варианте осуществления VH или VL первого домена могут быть заменены на VH или VL второго домена соответственно с образованием DART, содержащего первый и второй домен, необязательно при этом DART дополнительно содержит Fc с образованием DART-Fc. В качестве дополнения или в качестве альтернативы несколько DART могут быть соединены с одним Fc с образованием тетравалентного DART.

В одном варианте осуществления первый и/или второй домен имеет форму Т-клеточного рецептора, который может быть объединен с первым и/или вторым доменом, имеющим форму scFv, с образованием ImmTAC. Например, первый домен может представлять собой scFv, а второй домен может представлять собой Т-клеточный рецептор, предпочтительно при этом scFv специфичен в отношении эпитопа CD3 (т.е. CD3-связывающего домена), что приводит к образованию ImmTAC.

В одном варианте осуществления эффекторная клетка первого домена представляет собой иммунную эффекторную клетку, например, иммунную эффекторную клетку, выбранную из группы, состоящей из Т-клетки (например, $CD4^+$ Т-клетки и/или $CD8^+$ Т-клетки), NK Т-клетки, NK-клетки, макрофага или любой их рекомбинантной клетки (например, клетки, экспрессирующие CAR, такие как CAR-Т-клетка, CAR-NK-клетка или CAR-M-клетка). В таких вариантах осуществления биспецифическая связывающая молекула может обозначаться «антителом на основе привлекающих иммунные клетки биспецифических активаторов», где «иммунная клетка» может быть заменена типом эффекторных клеток. Например, если эффекторная клетка первого домена представляет собой Т-клетку, такие варианты осуществления можно обозначать «антителом на основе привлекающих Т-клетки биспецифических активаторов» (BiTE, которое может, но не обязательно, иметь формат молекулы BiTE или BiTE-Fc, показанный на фиг. 1C Suurs et al, 2019, выше), и если эффекторная клетка первого домена представляет собой NK-клетку, такие варианты осуществления можно обозначать «антителом на основе привлекающих NK-клетки биспецифических активаторов» и так далее.

В одном варианте осуществления первый домен биспецифической связывающей молекулы специфичен в отношении эпитопа CD3, который может обозначаться CD3-связывающим доменом.

В одном варианте осуществления CD3-связывающий домен может содержать последовательность вариабельной области тяжелой цепи OKT3, например, как определено последовательностью SEQ ID NO: 48 настоящей заявки, или ее функциональный вариант или фрагмент, который по сути сохраняет CD3-связывающую специфичность и/или аффинность последовательности SEQ ID NO: 48. Функциональный вариант или его фрагмент может необязательно содержать один, два или три CDR, соответствующие любой одной, двум или всем трем последовательностям CDR вариабельной области тяжелой цепи OKT3, как определено SEQ ID NO: 48. Последовательности CDR вариабельной области тяжелой цепи OKT3 являются такими, как определено SEQ ID NO: 49, 50 и 51 соответственно, и/или функциональным вариантом любого одного или нескольких из указанных последовательностей CDR антитела OKT3.

В другом варианте осуществления CD3-связывающий домен может содержать последовательность вариабельной области легкой цепи OKT3, например, как определено последовательностью SEQ ID NO: 52 настоящей заявки, или ее функциональный вариант или фрагмент, который по сути сохраняет CD3-связывающую специфичность и/или аффинность последовательности SEQ ID NO: 52. Функциональный вариант или его фрагмент может необязательно содержать один, два или три CDR, соответствующие любой одной, двум или всем трем последовательностям CDR вариабельной области легкой цепи OKT3, как определено SEQ ID NO: 52. Последовательности CDR вариабельной области тяжелой цепи OKT3 являются такими, как определено SEQ ID NO: 53, 54 и 55 соответственно, и/или функциональным вариантом любого одного или нескольких из указанных последовательностей CDR антитела OKT3.

В другом варианте осуществления CD3-связывающий домен может содержать последовательности вариабельной области тяжелой цепи OKT3 и вариабельной области легкой цепи OKT3, например, как определено последовательностями SEQ ID NO: 48 и 52 настоящей заявки соответственно, или функциональным вариантом или фрагментом одного из них или обоих, например, функциональным вариантом или фрагментом, как описано выше.

В предпочтительном варианте осуществления CD3-связывающий домен может содержать последовательность вариабельной области тяжелой цепи OKT3 и вариабельной области легкой цепи OKT3, например, как определено последовательностями SEQ ID NO: 48 и 52 настоящей заявки, необязательно соединенную линкером, таким как линкер, имеющий последовательность

GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56). Данная комбинация вариабельной области тяжелой цепи OKT3 и вариабельной области легкой цепи OKT3, необязательно соединенных линкером, может образовывать scFv OKT3.

Соответственно, CD3-связывающий домен может представлять собой scFv OKT3, который содержит последовательности SEQ ID NO: 48, 56 и 52, соединенные вместе в таком порядке, где вариабельная область тяжелой цепи OKT3 SEQ ID NO: 48 соединена на своем С-конце с N-концом линкерной последовательности SEQ ID NO: 56, которая, в свою очередь, соединена на своем С-конце с N-концом вариабельной области легкой цепи OKT3 SEQ ID NO: 52. В качестве альтернативы порядок областей легкой и тяжелой цепей может меняться местами, так что CD3-связывающий домен содержит последовательности SEQ ID NO: 52, 56 и 48, соединенные вместе в этом порядке. Следует понимать, что можно использовать другие линкерные последовательности вместо иллюстративной последовательности SEQ ID NO: 56 ; другие линкерные последовательности могут необязательно содержать несколько повторов последовательности GGGGS (SEQ ID NO: 57) и, таким образом, могут иметь последовательность $[GGGGS]_n$, где n представляет собой целое число из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10 или более; или может содержать любые другие подходящие линкерные последовательности.

Необязательно CD3-связывающий домен содержит по меньшей мере один (предпочтительно два) scFv OKT3. Например, биспецифическая связывающая молекула может содержать первый домен, содержащий два scFv OKT3, необязательно при этом два scFv связаны непосредственно друг с другом или связаны опосредованно через второй домен.

В одном варианте осуществления второй домен биспецифической связывающей молекулы, который содержит связывающую молекулу в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения и имеет специфичность связывания с ECD3 белка US28 HCMV, имеет специфичность связывания с клеткой-мишенью, которая представляет собой US28-экспрессирующую клетку, и/или инфицированную HCMV клетка (которая может, например, быть латентно инфицированной или литически инфицированной).

В одном варианте осуществления второй домен биспецифической связывающей молекулы содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей (CDR), соответствующих любой одной, двум, трем, четырем, пяти или всем шести последовательностям CDR антитела:

(a) 1D3, как определено SEQ ID NO: 8, 9, 10, 14, 15 и 16 соответственно;

(b) 1C10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83 и 118 соответственно;

(c) 1A10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83 и 118 соответственно;

(d) 1G9, как определено SEQ ID NO: 76, 77, 78, 82, 83 и 84 соответственно; и/или

(e) 1E8, как определено SEQ ID NO: 76, 95, 96, 82, 99 и 100 соответственно;

и/или функциональный вариант любой одной или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8.

Необязательно US28-связывающий домен в соответствии с этим вариантом осуществления может содержать:

(a) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области тяжелой цепи (V_H) антитела:

i. 1D3, как определено SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно;

ii. 1C10, как определено SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR);

iii. 1A10, как определено SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR);

iv. 1G9, как определено SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR); и/или

v. 1E8, как определено SEQ ID NO: 76, 95 и 96 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR);

и/или

(b) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области легкой цепи (V_L) антитела:

i. 1D3, как определено SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR);

ii. 1C10, как определено SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR);

iii. 1A10, как определено SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR);

iv. 1G9, как определено SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR); и/или

v. 1E8, как определено SEQ ID NO: 82, 99 и 100 соответственно (и/или функциональный вариант любого одного, двух или трех указанных последовательностей CDR).

Предпочтительно, чтобы US28-связывающий домен в соответствии с этим вариантом осуществления содержал по меньшей мере 4 различных последовательности CDR, например, по меньшей мере 5 или 6 различных последовательностей CDR.

В качестве дополнения или в качестве альтернативы в дополнительном варианте второй домен биспецифической связывающей молекулы в соответствии с этим вариантом осуществления может содержать: (a) по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно, и необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, по сути состоит или состоит из последовательности SEQ ID NO:12; и/или (b) по меньшей мере один полипептид вариабельной области легкой цепи (VL), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно, и необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO:18.

В качестве дополнения или в качестве альтернативы в дополнительном варианте второй домен биспецифической связывающей молекулы в соответствии с этим вариантом осуществления может содержать: (a) по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно, и необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ

ID NO: 68; и/или (b) по меньшей мере один полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно, и необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 72.

В качестве дополнения или в качестве альтернативы в дополнительном варианте второй домен биспецифической связывающей молекулы в соответствии с этим вариантом осуществления может содержать: (a) по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 76, 95 и 96 соответственно, и необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 88; и/или (b) по меньшей мере один полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 82, 99 и 100 соответственно, и необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 92.

В качестве дополнения или в качестве альтернативы в дополнительном варианте второй домен биспецифической связывающей молекулы в соответствии с этим вариантом осуществления может содержать: (a) по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно, и необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 104; и/или (b) по меньшей мере один полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно, и необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 108.

В качестве дополнения или в качестве альтернативы в дополнительном варианте второй домен биспецифической связывающей молекулы в соответствии с этим вариантом осуществления может содержать: (a) по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно, и

необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 122; и/или (b) по меньшей мере один полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно, и необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 126.

В качестве дополнения или в качестве альтернативы в дополнительном варианте второй домен биспецифической связывающей молекулы в соответствии с этим вариантом осуществления может содержать: (a) по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 138, 139 и 140 соответственно, и необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 130; и/или (b) по меньшей мере один полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 144, 145 и 146 соответственно, и необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 134.

В одном варианте осуществления первый домен биспецифической связывающей молекулы представляет собой scFv, содержащий все шесть последовательностей CDR OKT3 (предпочтительно при этом первый домен представляет собой scFv OKT3), а второй домен биспецифической связывающей молекулы представляет собой scFv, содержащий все шесть CDR-последовательности 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8 (предпочтительно при этом второй домен представляет собой scFv 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8), необязательно при этом первый и второй домен соединены через линкер.

В одном варианте осуществления первый домен биспецифической связывающей молекулы содержит два scFv, каждый из которых содержит все шесть последовательностей CDR OKT3 (предпочтительно при этом первый домен содержит два scFv OKT3); и второй домен биспецифической связывающей молекулы содержит два Fab, каждый из которых содержит один, два, три, четыре, пять или шесть CDR, соответствующих любой одной, двум, трем, четырем, пяти или всем шести последовательностям CDR антитела:

(a) 1D3, как определено SEQ ID NO: 8, 9, 10, 14, 15 и 16 (предпочтительно при этом первый домен содержит два Fab из 1D3);

(b) 1C10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83 и 118 (предпочтительно при этом первый домен содержит два Fab из 1C10);

(c) 1A10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83 и 118 (предпочтительно при этом первый домен содержит два Fab из 1A10);

(d) 1G9, как определено SEQ ID NO: 76, 77, 78, 82, 83 и 84 (предпочтительно при этом первый домен содержит два Fab из 1G9); и/или

(e) 1E8, как определено SEQ ID NO: 76, 95, 96, 82, 99 и 100 (предпочтительно при этом первый домен содержит два Fab из 1E8);

и дополнительно содержит Fc, необязательно при этом Fc соответствует Fc IgG человека.

В некоторых вариантах осуществления два Fab идентичны. В некоторых вариантах осуществления два Fab соответствуют разным антителам, выбранным из группы, состоящей из 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и 1E8.

В одном конкретном варианте осуществления биспецифическая связывающая молекула представляет собой BiTE, имеющий CD3-связывающую область домена scFv OKT3 и содержит ECD3-связывающую область US28, имеющую последовательность антитела 1D3, и более конкретно предпочтительно содержит, состоит по сути из или состоит из:

(i) первой полипептидной последовательности, содержащей, состоящуей по сути из или состоящей из последовательности тяжелой цепи, которая содержит область V_H 1D3, необязательно одну или несколько последовательностей C_H (таких как последовательность C_H1, C_H2 и/или C_H3), необязательную линкерную последовательность и последовательность scFv OKT3, например, последовательность тяжелой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 58; и

(ii) вторую полипептидную последовательность, содержащую, состоящую по сути из или состоящую из последовательности легкой цепи, которая содержит область V_L 1D3, и необязательно последовательность C_L, например, последовательность легкой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 59.

В другом варианте осуществления последовательность антитела 1D3 может быть заменена в BiTE соответствующими последовательностями антитела, выбранного из группы, состоящей из 1C10, 1A10, 1G9 и 1E8.

CAR/CAR-Т-клетки и другие клетки, рекомбинантно экспрессирующие CAR

Виды лечения на основе иммунотерапии могут быть основаны на химерных антигенных рецепторах (CAR). CAR представляют собой рекомбинантные рецепторы антигена, которые в одной молекуле перенаправляют специфичность и функцию Т-лимфоцитов и других иммунных клеток (Sadelain *et al* 2013 *Cancer Discov* **3**(4): 388).

Общая предпосылка их применения в иммунотерапии рака заключается в быстрой генерации нацеленных на опухоль Т-клеток, в обход барьеров и дополнительной кинетики активной иммунизации. После экспрессии в Т-клетках CAR-модифицированные Т-клетки приобретают супрафизиологические свойства и действуют как «живые лекарственные средства», которые могут оказывать как незамедлительные, так и долгосрочный эффекты. Для разработки CAR в Т-клетках требуется культивирование Т-клеток для обеспечения трансдукции и размножения. Для трансдукции могут использоваться различные способы, но для обеспечения устойчивой экспрессии CAR в клонально размножающихся и персистирующих Т-клетках необходим стабильный перенос генов.

В принципе, любая молекула клеточной поверхности может быть нацелена через CAR, тем самым преодолевая толерантность к аутоантигенам и недостатки в распознавании антигена в физиологическом репертуаре Т-клеток, которые ограничивают объем реактивности Т-клеток.

Различные субпопуляции Т-клеток, а также предшественники Т-клеток и другие иммунные клетки, такие как естественные клетки-киллеры, могут быть нацелены на CAR.

Адоптивная иммунотерапия с использованием сконструированных с CAR клеток, таких как Т-клетки, является перспективным подходом к лечению рака (Han *et al* 2013 *J Hematol Oncol* **6**: 47). Значительные успехи, достигнутые за последние десятилетия, способствовали разработке более эффективной противоопухолевой иммунотерапии. Например, включение одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) специфического в отношении опухолевого антигена антитела и сигнальных доменов Т-клеточного рецептора придает CAR специфичность антитела и цитотоксичность цитотоксических Т-лимфоцитов. CAR обеспечивают специфическое распознавание антигена Т-клетками, активацию и пролиферацию независимым от MHC способом. Кроме того, CAR обходит многие механизмы, благодаря которым раковые клетки ускользают от иммунного распознавания. Эти механизмы включают подавление MHC,

снижение экспрессии костимулирующих молекул, индукцию супрессивных цитокинов и рекрутирование регуляторных Т-клеток. Помимо этих полезных эффектов, техническая осуществимость CAR делает их еще более привлекательными для разработки адоптивной иммунотерапии. Наблюдения в ходе доклинических и клинических исследований показали весьма обнадеживающую терапевтическую эффективность CAR-опосредованной иммунотерапии при различных видах рака, включая лимфому, хронический лимфоцитарный лейкоз, меланому и нейробластому.

В одном варианте осуществления связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения может представлять собой CAR, например CAR, содержащий:

(i) внеклеточный домен, где внеклеточный домен содержит или состоит из связывающей молекулы (такой как антитело), как определено выше, или функционального фрагмента указанной связывающей молекулы;

(ii) трансмембранный домен; и

(iii) внутриклеточный домен;

где внеклеточный домен CAR имеет специфичность связывания в отношении эпитопа внеклеточного домена 3 (ECD3) белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV), и

где ECD3 белка US28 содержит аминокислотную последовательность, представленную в белке US28 в положениях, соответствующих положениям 167-183 белка US28, кодируемого цитомегаловирусом человека (HCMV), как указано в SEQ ID NO: 5.

Необязательно:

(a) внеклеточный домен CAR имеет специфичность связывания в отношении эпитопа, полностью присутствующего во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 HCMV;

(b) внеклеточный домен CAR имеет специфичность связывания в отношении линейного эпитопа в ECD3 белка US28;

(c) внеклеточный домен CAR имеет специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, который является агностическим в отношении штамма HCMV, например, специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, который является агностическим в отношении двух или более (например, всех) штаммов HCMV, выбранных из группы, состоящей из DB, Towne, AD169, BL, DAVIS, JP, Merlin, PH, TB40/E, Toledo, TR, VHL/E и VR1814 (FIX); и/или

(d) внеклеточный домен CAR имеет специфичность в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, независимо от того, содержит ли ECD3 белка US28 последовательность:

- TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7), обнаруженную в ECD3 US28, кодируемую большинством штаммов HCMV, или
- TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), обнаруженную в ECD3 US28, кодируемую меньшинством штаммов HCMV.

В одном предпочтительном варианте осуществления внеклеточный домен CAR может содержать одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей (CDR), соответствующих любой одной, двум, трем, четырем, пяти или всем шести последовательностям CDR антитела:

(a) 1D3, как определено SEQ ID NO: 8, 9, 10, 14, 15 и 16 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1D3;

(b) 1C10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83 и 118 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1C10;

(c) 1A10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83 и 118 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1A10;

(d) 1G9, как определено SEQ ID NO: 76, 77, 78, 82, 83 и 84 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1G9; и/или

(e) 1E8, как определено SEQ ID NO: 76, 95, 96, 82, 99 и 100 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1E8.

В качестве дополнения или в качестве альтернативы внеклеточный домен CAR может содержать:

(a) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области тяжелой цепи (V_H) антитела:

i. 1D3, как определено SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно (или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR);

ii. 1C10, как определено SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно (или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR);

iii. 1A10, как определено SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно (или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR);

iv. 1G9, как определено SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно (или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR); и/или

v. 1E8, как определено SEQ ID NO: 76, 95 и 96 соответственно (или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR);

и/или

(b) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области легкой цепи (V_L) антитела:

i. 1D3, как определено SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно (или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR);

ii. 1C10, как определено SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно (или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR);

iii. 1A10, как определено SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно (или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR);

iv. 1G9, как определено SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно (или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR);

v. 1E8, как определено SEQ ID NO: 82, 99 и 100 соответственно (или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR).

В качестве дополнения или в качестве альтернативы внеклеточный домен CAR может содержать:

(a) по меньшей мере одну полипептидную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H), которая содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности:

i. SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно (или функциональный вариант любой одной или нескольких указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом по меньшей мере одна полипептидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 12 (или ее функциональный вариант);

ii. SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно (или функциональный вариант любой одной или нескольких указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом по меньшей мере одна полипептидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 104 (или ее функциональный вариант);

iii. SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно (или функциональный вариант любой одной или нескольких указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом по меньшей мере одна полипептидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 122 (или ее функциональный вариант);

iv. SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно (или функциональный вариант любой одной или нескольких указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом по меньшей мере одна полипептидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 68 (или ее функциональный вариант); и/или

v. SEQ ID NO: 76, 95 и 96 соответственно (или функциональный вариант любой одной или нескольких указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом по меньшей мере одна полипептидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 88 (или ее функциональный вариант);

и/или

(b) по меньшей мере одну полипептидную последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности:

i. SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно (или функциональный вариант любой одной или нескольких указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом один полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 18 (или ее функциональный вариант);

ii. SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно (или функциональный вариант любой одной или нескольких указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом по меньшей мере одна полипептидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 108 (или ее функциональный вариант);

iii. SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно (или функциональный вариант любой одной или нескольких указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом по меньшей мере одна полипептидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 126 (или ее функциональный вариант);

iv. SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно (или функциональный вариант любой одной или нескольких указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом по меньшей мере одна полипептидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 72 (или ее функциональный вариант); и/или

v. SEQ ID NO: 82, 99 и 100 соответственно (или функциональный вариант любой одной или нескольких указанных последовательностей CDR), и необязательно при этом по меньшей мере одна полипептидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 92 (или ее функциональный вариант).

Функциональный вариант эталонной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 12, 18, 68, 72, 88, 92, 104, 108, 122 или 126 необязательно может иметь по меньшей

мере 70% идентичность последовательности с определенной эталонной последовательностью, например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности, и в более общем случае имеет 95-99% идентичность последовательности с определенной аминокислотной последовательностью (например, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности). Вариация может находиться исключительно в пределах отличных от областей CDR последовательностей функционального варианта вариабельной области тяжелой или легкой цепи, исключительно в пределах как отличных от CDR областей последовательностей, так и в пределах областей CDR последовательностей. Следует понимать, что если вариация включена в области CDR функционального варианта, то вариация может находиться в пределах одной CDR, двух CDR или трех CDR соответственно вариабельной области тяжелой цепи или вариабельной области легкой цепи. Обычно вариация находится за пределами областей CDR.

В определенных вариантах осуществления внеклеточный домен CAR представляет собой или содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности антитела, необязательно гуманизированного антитела, например, одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) или его функционального варианта, где указанное антитело и его функциональный вариант представляют собой связывающую молекулу в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения.

scFv может содержать линкер по меньшей мере из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25. , 30, 35, 40, 45, 50 или более аминокислотных остатков между его областями VL и VH. Линкер может содержать любую встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность содержит аминокислоты глицин и серин. В другом варианте осуществления линкерная последовательность содержит наборы повторов глицина и серина, такие как $(Gly_4Ser)_n$, где n представляет собой положительное целое число, равное или большее 1, например, 2, 3, 4, 5, 6 или больше. В одном варианте осуществления линкер представляет собой $(Gly_4Ser)_3$. Вариации длины линкера могут сохранять или усиливать активность, что приводит к более высокой эффективности в исследованиях активности.

Вариабельная область легкой цепи и вариабельная область тяжелой цепи scFv могут находиться, например, в любой из следующих ориентаций: вариабельная область

легкой цепи-линкер-вариабельная область тяжелой цепи или вариабельная область тяжелой цепи-линкер-вариабельная область легкой цепи.

CAR, как описано в данном документе, содержит трансмембранный домен. Под трансмембранным доменом понимают любой фрагмент, способный встраиваться в липидную мембрану. Будучи встроенным в липидную мембрану, подразумевают значение трансмембранного домена, благоприятно взаимодействующего с гидрофобными частями липидов, составляющих липидную мембрану. Вставку в липидные мембраны можно оценить с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники, включая флуоресцентное мечение с помощью флуоресцентной микроскопии. Следовательно, следует понимать, что трансмембранный домен является доменом, который локализует молекулу CAR внутри липидной мембраны.

Необязательно трансмембранный домен содержит трансмембранный домен белка (например, трансмембранный белок), например, трансмембранный домен трансмембранного рецепторного белка. В варианте осуществления трансмембранный домен ассоциирован с одним из других доменов CAR. В одном варианте осуществления трансмембранный домен содержит трансмембранную часть внутриклеточного сигнального белка, который составляет по меньшей мере часть внутриклеточного сигнального домена. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран или модифицирован путем аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же или разных поверхностных мембранных белков, например, свести к минимуму взаимодействие с другими членами рецепторного комплекса. В некоторых случаях трансмембранный домен способен к гомодимеризации с другим CAR на клеточной поверхности.

Трансмембранный домен может быть получен либо из природного, либо из рекомбинантного источника. Домен может быть получен из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. В одном варианте осуществления трансмембранный домен способен передавать сигнал внутриклеточному(ым) домену(ам) всякий раз, когда CAR связывается с мишенью. Подходящий трансмембранный домен для применения в настоящем изобретении может содержать трансмембранную(ые) область(и) альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD8, CD45 и CD4.

Трансмембранный домен может, например, содержать одну или несколько дополнительных аминокислот, прилегающих к трансмембранной области, например, одну или несколько аминокислот, ассоциированных с внеклеточной областью белка, из

которого был получен трансмембранный домен (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10-15 аминокислот внеклеточной области) и/или одну или несколько дополнительных аминокислот, ассоциированных с внутриклеточной областью белка, из которого был получен трансмембранный белок (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10-15 аминокислот внутриклеточной области).

В определенных вариантах осуществления внеклеточный домен CAR соединен с трансмембранным доменом шарнирной областью. Шарнирная область может содержать один или несколько доменов иммуноглобулина. Конкретные примеры включают Fc-область IgG1 и иммуноглобулиноподобные внеклеточные области CD4 и CD8. Следует понимать, что когда антитело, которое избирательно связывает US28, представляет собой молекулу scFv, шарнирную область можно использовать для расширения зоны действия scFv, чтобы обеспечить возможность его прикрепления к трансмембранному домену, не влияя на его связывание с US28. Шарнир может происходить из человеческого белка, такого как иммуноглобулин человека. Шарнирная область может, например, представлять собой шарнирную область CD8α (например, как описано в An *et al*, 2016, *Oncotarget*, 7:10638-10649, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки).

Обычно трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные аминокислотные остатки, такие как лейцин и валин.

В одном варианте осуществления короткий олиго- или полипептидный линкер, например, длиной от 2 до 10 аминокислот, может образовывать связь между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом CAR. Линкер может, например, содержать остатки глицина и/или серина. Примером подходящего линкера является глицин-сериновый дублет.

Под внутриклеточным сигнальным доменом подразумевают домен, который способен активировать по меньшей мере одну из нормальных функций клетки, в которую введен CAR, например, по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций иммунной клетки (например, Т-клетки). Эффекторная функция относится к специализированной функции клетки. Например, эффекторная функция Т-клетки может представлять собой цитолитическую функцию или хелперную активность, включая секрецию цитокинов. Таким образом, внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой часть белка, который передает сигнал эффекторной функции и направляет клетку (например, Т-клетку) на выполнение специализированной функции.

Как правило, можно использовать весь внутриклеточный сигнальный домен; однако понятно, что необходимость использовать весь домен при условии, что любая часть используемого сигнального домена все еще способна преобразовывать сигнал эффекторной функции, отсутствует. Также следует понимать, что также можно использовать варианты таких внутриклеточных сигнальных доменов с по сути такими же или более высокими функциональными возможностями. Под этим подразумевают, что варианты должны иметь по сути одинаковую или более высокую трансдукцию эффекторного функционального сигнала. Обычно по сути такая же или более высокая передача сигнала включает по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 105%, 110%, 115% или 120% или более передачи сигнала немодифицированного внутриклеточного сигнальный домена, где передача сигнала немодифицированного внутриклеточного сигнального домена соответствует 100%.

Способы оценки трансдукции сигнала эффекторной функции хорошо известны специалистам в данной области техники и включают, например, оценку количеств и/или активности молекул (например, белков, таких как цитокины), которые указывают на трансдуцируемый сигнал. Таким образом, когда сигнал представляет собой цитолитическую функцию Т-клетки, способы могут включать измерение одного или нескольких цитокинов, секретируемых Т-клеткой, о которых известно, что цитокины обладают цитолитической активностью (например, IFN-гамма), и последующее измерение лизиса клеток-мишеней.

Примеры внутриклеточных сигнальных доменов для использования в CAR по настоящему изобретению включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR) и корецепторов, которые действуют согласованно, инициируя передачу сигнала после взаимодействия с антигенным рецептором, а также любое производное или вариант эти последовательности и любую рекомбинантную последовательность, которые имеют такую же функциональную способность.

Известно, что сигналов, генерируемых одним только TCR, обычно недостаточно для полной активации Т-клетки и что также может потребоваться вторичный и/или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что Т-клеточная активация опосредована двумя различными классами внутриклеточных сигнальных последовательностей: теми, которые инициируют антигензависимую первичную активацию через TCR (первичные внутриклеточные сигнальные домены), и теми, которые действуют антигеннезависимым образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал (вторичный внутриклеточный сигнальный домен, такой как

костимулирующий домен). Костимулирующие домены способствуют активации эффекторных функций, а также могут способствовать сохранению эффекторной функции и/или выживанию клетки.

Первичный внутриклеточный сигнальный домен регулирует первичную активацию комплекса TCR либо стимулирующим, либо ингибирующим путем. Первичные внутриклеточные сигнальные домены, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как мотивы активации иммунорецепторов на основе тирозина или ITAM (например, 2, 3, 4, 5 или более ITAM). Таким образом, внутриклеточный сигнальный домен может содержать один или несколько ITAM. Примеры ITAM, содержащих первичные внутриклеточные сигнальные домены, которые особенно применимы в настоящем изобретении, включают домены CD3-дзета, Fc-гамма-рецептора, Fc-бета-рецептора, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

В одном варианте осуществления CAR по настоящему изобретению содержит внутриклеточный сигнальный домен CD3-дзета.

Следует понимать, что один или несколько ITAM внутриклеточного сигнального домена могут быть модифицированы, например, путем мутации. Модификацию можно использовать для увеличения или уменьшения сигнальной функции ITAM по сравнению с нативным доменом ITAM.

Как упоминалось выше, внутриклеточный сигнальный домен сам по себе может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен или он может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен в комбинации с одним или несколькими вторичными внутриклеточными сигнальными доменами, такими как один или несколько костимулирующих сигнальных доменов. Таким образом, внутриклеточный сигнальный домен CAR может содержать дзета-сигнальный домен CD3 сам по себе или в комбинации с одним или несколькими другими внутриклеточными сигнальными доменами, такими как один или несколько костимулирующих сигнальных доменов.

Костимулирующий сигнальный домен относится к части CAR, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула может представлять собой молекулу клеточной поверхности, отличную от антигенного рецептора или его лигандов, которая необходима для эффективного ответа иммунных клеток (например, лимфоцитов) на антиген. Примеры таких молекул включают CD28, 4-1BB (CD137), OX40, ICOS, DAP10, CD27, CD30, CD40, PD1, ICOS, антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3

и лиганд, который специфически связывается с CD83, и т.п. Например, было продемонстрировано, что костимуляция CD27 усиливает размножение, эффекторную функцию и выживаемость CAR-Т-клеток человека *in vitro*, а также увеличивает персистенцию Т-клеток человека и противоопухолевую активность *in vivo* (Song *et al.*, *Blood*. 2012, **119**(3):696-706).

Внутриклеточные сигнальные последовательности внутри внутриклеточной части CAR по настоящему изобретению могут быть связаны друг с другом в случайном или заданном порядке. Необязательно короткий олиго- или полипептидный линкер, например, длиной от 2 до 10 аминокислот (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот) может образовывать связь между внутриклеточными сигнальными последовательности. В одном варианте осуществления в качестве подходящего линкера можно использовать глицин-сериновый дублет. В другом варианте осуществления в качестве подходящего линкера можно использовать одну аминокислоту, такую как аланин или глицин.

В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен сконструирован так, чтобы содержать два или более, например, 3, 4, 5 или более костимулирующих сигнальных доменов. В варианте осуществления два или более, например. 2, 3, 4, 5 или более костимулирующих сигнальных доменов разделены линкерной молекулой, такой как описанная в данном документе. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит два костимулирующих сигнальных домена. В некоторых вариантах осуществления линкерная молекула представляет собой остаток глицина. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой остаток аланина.

В предпочтительном варианте осуществления внутриклеточная часть CAR содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD28.

В другом варианте осуществления внутриклеточная часть CAR содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен 4-1BB.

В другом варианте осуществления внутриклеточная часть CAR содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен OX40.

В другом варианте осуществления внутриклеточная часть CAR содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен ICOS.

В другом варианте осуществления внутриклеточная часть CAR содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен DAP10.

В другом варианте осуществления внутриклеточная часть CAR содержит сигнальный домен CD3-дзета, сигнальный домен 4-1BB и сигнальный домен OX40.

Другие дополнительные компоненты CAR

В одном варианте осуществления CAR может дополнительно содержать лидерную последовательность. Под «лидерной последовательностью» подразумевают пептидную последовательность, которая может направлять CAR к клеточной мембране. Таким образом, когда CAR представляет собой химерный слитый белок, он может содержать лидерную последовательность на аминоконце (N-конце). Необязательно лидерная последовательность отщепляется от CAR во время клеточного процессинга и локализации CAR на клеточной мембране.

В дополнительном варианте осуществления CAR может содержать индуцибельный суицидный фрагмент. Под индуцибельным суицидным фрагментом подразумевают молекулу, которая обладает индуцируемой способностью приводить к гибели клетки, в клеточной мембране которой находится CAR (например, Т-клетки). Таким образом, эффект, который CAR оказывают на субъекта, можно строго контролировать путем избирательного удаления клеток, из которых они состоят. Удобно, что суицидный фрагмент содержит эпитоп антитела, которое является прямо или косвенно цитотоксичным. Антитела, которые обладают прямой цитотоксичностью, включают литические антитела, такие как ритуксимаб, которые связываются с CD20. Таким образом, в одном варианте осуществления CAR может содержать эпитоп CD20. Антитела также могут быть опосредованно цитотоксичными за счет конъюгации с одним или несколькими цитотоксическими фрагментами.

В одном предпочтительном варианте осуществления CAR содержит: (i) внеклеточный домен, где внеклеточный домен содержит, состоит по сути из или состоит из антитела в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, которое селективно связывается с ECD3 полипептида US28. (например, фрагмент scFv); (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточный сигнальный домен (например, внутриклеточный сигнальный домен, содержащий первичный сигнальный домен, такой как CD3-дзета, и необязательно один или несколько костимулирующих доменов, таких как CD28, 4-1BB, OX40, ICOS и DAP10).

Слитые полипептиды

В дополнительном варианте связывающая молекула, как определено первым аспектом настоящего изобретения, может содержать последовательность слитого

полипептида, где последовательность слитого полипептида содержит первую аминокислотную последовательность, слитую со второй аминокислотной последовательностью, и где первая аминокислотная последовательность содержит или состоит из по меньшей мере одной из полипептидных цепей связывающей молекулы или ее функционального фрагмента, а вторая аминокислотная последовательность является партнером по слиянию.

Может быть выбран любой партнер по слиянию, представляющий интерес. Специалисту в данной области техники хорошо известны последовательности партнера по слиянию, и любая из них может быть выбрана. Партнер по слиянию может, например, обеспечивать дополнительное или альтернативное свойство связывания; он может обеспечивать эффекторную часть, которая создает эффект в месте связывания связывающей молекулы (примеры включают последовательность, которая способна усиливать иммунный ответ или вызывать прямое повреждение любой клетки, которая связана связывающей молекулой, например, цитотоксическую последовательность); он может обеспечивать модуляцию (например, увеличение или уменьшение) периода полужизни циркулирующей связывающей молекулы; он может обеспечить последовательность, которая облегчает захват, извлечение или очистку связывающей молекулы; и/или он может обеспечивать последовательность, которая облегчает обнаружение связывающей молекулы.

Конъюгаты

Связывающие молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения могут включать и/или быть связаны с по меньшей мере одним средством с образованием конъюгата, такого как конъюгат антитела. Указанное средство необязательно может быть небелковым, таким как низкомолекулярные лекарственные средства или другие средства, которые, например, могут представлять собой низкомолекулярные (<900 дальтон) органические соединения.

Чтобы повысить эффективность молекул антител и других связывающих средств в качестве диагностических или терапевтических средств, обычно связывают или ковалентно связывают или образуют комплекс по меньшей мере с одной требуемой молекулой или фрагментом. Такая молекула или фрагмент может представлять собой без ограничения одну эффекторную или репортерную молекулу. Эффекторные молекулы могут включать молекулы, обладающие требуемой активностью, например, лекарственные средства, цитотоксические средства, иммунодепрессанты,

противовоспалительные средства и т.д. Такие молекулы необязательно могут быть присоединены к молекуле антитела или другому связывающему средства через расщепляемый линкер, предназначенный для обеспечения возможности молекулы, которые должны быть высвобождены в целевом сайте или рядом с ним.

Указанная требуемая молекула или фрагмент необязательно может быть избирательно активен во внеклеточной среде или избирательно активен во внутриклеточной среде. Как обсуждалось выше, US28 представляет собой GCPR, доставка которого к цитоплазматической мембране позволяет как его прямое нацеливание на связывающие молекулы, так и его использование в качестве переносчика полезной нагрузки благодаря его эндоцитозу, который либо является конститутивным, либо возникает в результате связывания лиганда. GCPR в целом составляют наиболее крупное семейство белков, на которые нацелены одобренные лекарственные средства (Sriram & Insel, *Mol Pharmacol*, 2018, **93**(4): 251-258). Соответственно, связывающие молекулы по настоящему изобретению, которые имеют специфичность связывания с ECD3 US28, можно использовать для интернализации US28-экспрессирующей клеткой (в частности, инфицированной HCMV клеткой) одной или нескольких требуемых молекул или фрагментов, таких как требуемая молекула или фрагмент, который избирательно активен во внутриклеточной среде, путем конъюгации указанной одной или более требуемых молекул или фрагментов со связывающей молекулой по настоящему изобретению.

В отличие от этого, репортерная молекула определяется как любой фрагмент, который можно обнаружить с помощью анализа. Неограничивающие примеры репортерных молекул, конъюгированных с антителами и другими связывающими средствами, включают ферменты, радиоактивные метки, гаптены, флуоресцентные метки, фосфоресцентные молекулы, хемилюминесцентные молекулы, хромофоры, фотоаффинные молекулы, окрашенные частицы или лиганды, такие как биотин.

Такие конъюгаты обычно используются в качестве диагностических средств. Эти диагностические средства обычно относятся к двум классам: те, которые предназначены для использования в диагностике *in vitro*, например, в различных иммуноанализах и/или иммуногистохимии (IHC), и те, которые предназначены для использования в диагностических протоколах *in vivo*, обычно известных как «направленная на антитела визуализация». В данной области техники известны многие подходящие средства визуализации, а также способы их прикрепления к антителам и другим подобным связывающим молекулам (см., например, патенты США 5021236, 4938948 и 4472509).

Используемые фрагменты для визуализации могут представлять собой парамагнитные ионы, радиоактивные изотопы, флуорохромы, вещества, обнаруживаемые с помощью ЯМР, и средства рентгеновской визуализации.

В случае парамагнитных ионов можно упомянуть в качестве примера ионы, такие как хром (III), марганец (II), железо (III), железо (II), кобальт (II), никель (II), медь (II), неодим (III), самарий (III), иттербий (III), гадолиний (III), ванадий (II), тербий (III), диспрозий (III), гольмий (III) и/или эрбий (III), при этом гадолиний является особенно предпочтительным. Ионы, применимые в других контекстах, таких как рентгеновская визуализация, включают без ограничения лантан (III), золото (III), свинец (II) и особенно висмут (III).

В случае радиоактивных изотопов для терапевтического и/или диагностического применения можно упомянуть астат^{211}, ^{14}углерод, ^{51}хром, ^{36}хлор, ^{57}кобальт, ^{58}кобальт, медь^{67}, ^{152}Eu, галлий^{67}, ^{3}водород, йод^{123}, йод^{125}, йод^{131}, индий^{111}, ^{59}железо, ^{32}фосфор, рений^{186}, рений^{188}, ^{75}селен, ^{35}сера, технеций^{99m} и/или иттрий^{90}. ^{125}I часто является предпочтительным для использования в определенных вариантах осуществления, а технеций^{99m} и/или индий^{111} также часто являются предпочтительными вследствие их низкой энергии и пригодности для обнаружения на больших расстояниях. Радиоактивно меченные моноклональные антитела могут быть получены хорошо известными в данной области техники способами. Например, моноклональные антитела и другие связывающие средства могут быть йодированы при контакте с йодидом натрия и/или калия и химическим окислителем, таким как гипохлорит натрия, или ферментативным окислителем, таким как лактопероксидаза. Моноклональные антитела и другие связывающие средства могут быть помечены технецием^{99m} с помощью процесса обмена лигандов, например, путем восстановления пертехната раствором олова, хелатирования восстановленного технеция на колонке с сефадексом и нанесения антитела на эту колонку. В качестве альтернативы можно использовать методики прямого мечения, например, путем инкубации пертехната, восстанавливающего средства, такого как $SNCl_2$, буферного раствора, такого как раствор фталата натрия-калия, и антитела. Промежуточные функциональные группы часто используют для связывания радиоизотопов с антителом или другим связывающим средством и существуют в виде ионов металлов, таких как диэтилентриаминпентауксусная кислота (DTPA) или этилендиаминтетрацетиновая кислота (EDTA).

Среди флуоресцентных меток, которые предполагается использовать в качестве конъюгатов, можно назвать Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY

650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5,6-FAM, изотиоцианат флуоресцеина, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, родамин зеленый, родамин красный, ренографин, ROX, TAMRA, TET, тетраметилродамин и/или Texas Red.

Другим типом рассматриваемых конъюгатов являются конъюгаты, предназначенные в первую очередь для использования *in vitro*, где антитело или другая связывающая молекула связана со вторичным связывающим лигандом и/или с ферментом (ферментной меткой), который будет генерировать окрашенный продукт при контакте с хромогенным субстратом. Примеры подходящих ферментов включают уреазу, щелочную фосфатазу, пероксидазу водорода (хрена) или глюкозоксидазу. Предпочтительными вторичными связывающими лигандами являются биотин и соединения авидина и стрептавидина. Использование таких меток хорошо известно специалистам в данной области техники и описано, например, в патентах США 3817837, 3850752, 3939350, 3996345, 4277437, 4275149 и 4366241.

В данной области техники известно несколько способов присоединения или конъюгации антитела или другой связывающей молекулы с его конъюгатным фрагментом. Некоторые способы прикрепления включают использование хелатного комплекса металла с использованием, например, органического хелатирующего средства, такого как ангидрид диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DTPA); этилентриаминтетрауксусная кислота; N-хлор-п-толуолсульфонамид; и/или тетрахлор-3α-6α-дифенилгликоурил-3, присоединенный к антителу (патенты США 4472509 и 4938948). Моноклональные антитела или другие связывающие молекулы также могут вступать в реакцию с ферментом в присутствии связующего средства, такого как глутаральдегид или периодат. Конъюгаты с флуоресцеиновыми маркерами получают в присутствии этих связующих средств или реакцией с изотиоцианатом. В патенте США 4938948 визуализация опухолей молочной железы достигается с использованием моноклональных антител, а обнаруживаемые фрагменты визуализации связываются с антителом с помощью линкеров, таких как метил-п-гидроксибензимидат или N-сукцинимидил-3-(4-гидроксифенил)пропионат.

В других вариантах осуществления рассматривается дериватизация иммуноглобулинов или других связывающих молекул путем селективного введения сульфгидрильных групп в Fc-область иммуноглобулина с использованием условий реакции, которые не изменяют сайт связывания антитела. Обнаружено, что конъюгаты антител, полученные в соответствии с этой методологией, демонстрируют повышенную

долговечность, специфичность и чувствительность (патент США 5196066, включенный в данный документ посредством ссылки). В литературе также раскрыто сайт-специфическое присоединение эффекторных или репортерных молекул, при котором репортерная или эффекторная молекула конъюгирована с углеводным остатком в Fc-области.

Пролекарства

Следует понимать, что связывающие молекулы по первому аспекту настоящего изобретения можно вводить в форме «пролекарства». Например, в форме пролекарства ECD3-связывающая часть связывающей молекулы, которая селективно связывается с ECD3 US28, может быть замаскирована таким образом, что избирательно демаскируется только в месте расположения клеток-мишеней (например, тех, которые экспрессируют US28 и/или латентно и/или литически инфицированы HCMV).

Термин «пролекарство», используемый в настоящей заявке, относится к предшественнику или производной форме биологически или фармацевтически активного вещества, которое менее активно по сравнению с исходным биологически или фармацевтически активным веществом и способно ферментативно активироваться или превращаться в более активную исходную форму (см., например, D. E. V. Wilman "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions 14, 375-382 (615th Meeting, Belfast 1986) и V. J. Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery" Directed Drug Delivery R. Borchardt *et al.*, (ed.) pages 247-267 (Humana Press 1985)).

B. Молекулы нуклеиновой кислоты

Во втором аспекте настоящего изобретения представлена молекула нуклеиновой кислоты или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты, где молекула нуклеиновой кислоты содержит или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты вместе содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, которые отдельно или в комбинации кодируют одну или несколько полипептидных цепей, обеспечиваемых связывающей молекулой по первому аспекту настоящего изобретения.

Указанная или каждая молекула нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения может, например, представлять собой ДНК (например, геномную ДНК или комплементарную ДНК) или РНК (например, молекулу

мРНК, транскрибируемую *in vitro* РНК или синтетическую РНК). В одном варианте осуществления указанная или каждая молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу cDNA. Она может содержать дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания и/или их аналоги или любой субстрат, который может быть включен в полимер с помощью ДНК- или РНК-полимеразы или посредством реакции синтеза. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. При наличии модификации структуры нуклеотида могут быть внесены до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. В данном документе описаны некоторые конкретные примеры молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитела по настоящему изобретению. Другие подходящие последовательности можно легко определить на основе знания структуры антитела и генетического кода.

Под термином «РНК, транскрибируемая *in vitro*» подразумевают РНК, включая мРНК, которая была синтезирована *in vitro*. Обычно транскрибируемую *in vitro* РНК получают из транскрипционного вектора *in vitro* или полинуклеотидной матрицы, полученной с помощью ПЦР. Вектор транскрипции *in vitro* содержит матрицу, которую используют для получения транскрибируемой *in vitro* РНК. Способ получения мРНК для использования при трансфекции может включать транскрипцию матрицы *in vitro* с помощью специально разработанных праймеров с последующим добавлением полиА для получения конструкции, содержащей 3'- и 5'-нетранслируемую последовательность («UTR»), 5'-кэп и/или участок внутренней посадки рибосомы (IRES), нуклеиновую кислоту, которая будет экспрессироваться, и полиА-хвост, обычно длиной 50-2000 оснований. Такую РНК можно использовать для эффективной трансфекции различных типов клеток, как описано ниже.

Молекула нуклеиновой кислоты или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения может быть выделенной. Под «выделенным» подразумевается необязательное значение, что молекула нуклеиновой кислоты не локализована и не обеспечивается иным образом внутри клетки.

Указанная или каждая молекула нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения может быть одноцепочечной. В качестве альтернативы указанная или каждая молекула нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения может быть двухцепочечной.

В случае, когда связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения образована из одной непрерывной аминокислотной последовательности, тогда она может кодироваться одной кодирующей последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением.

В случае, когда связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения образована из двух или более отдельных полипептидных последовательностей, тогда каждая отдельная полипептидная последовательность может кодироваться отдельной молекулой нуклеиновой кислоты, так что кодируется вся совокупность связывающей молекулы путем комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты; в качестве альтернативы две или более отдельные полипептидные последовательности связывающей молекулы могут кодироваться одной молекулой нуклеиновой кислоты, содержащей множество различных кодирующих последовательностей, где эти многочисленные различные кодирующие соответственно последовательности кодируют каждую из двух или более отдельных полипептидных последовательностей связывающей молекулы.

В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения кодирует связывающую молекулу или первый аспект настоящего изобретения или ее часть, содержащую тяжелую цепь антитела или ее вариабельную область.

В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения кодирует связывающую молекулу или первый аспект настоящего изобретения или его часть, содержащую легкую цепь антитела или ее вариабельную область.

В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения или комбинация множества отдельных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения в совокупности кодирует связывающую молекулу или первый аспект настоящего изобретения или его часть, содержащую как тяжелую цепь антитела или ее вариабельную область, так и легкую цепь антитела или ее вариабельную область.

Следовательно, следует понимать, что молекула нуклеиновой кислоты или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты может кодировать любую из связывающих молекул (таких как антитела, их фрагменты, слитые белки, CAR и т.д.) по первому аспекта настоящего изобретения, включая варианты конкретных аминокислотных последовательностей, как определено выше, или их частей.

В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения содержит (или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом изобретения в совокупности содержит):

a) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательности:

i. SEQ ID NO: 22, 23 и 24, кодирующие последовательности V_H-CDR1, V_H-CDR2 и V_H-CDR3 1D3 соответственно;

ii. SEQ ID NO: 109, 110 и 111, кодирующие последовательности V_H-CDR1, V_H-CDR2 и V_H-CDR3 1C10 соответственно;

iii. SEQ ID NO: 109, 110 и 111, кодирующие последовательности V_H-CDR1, V_H-CDR2 и V_H-CDR3 1A10 соответственно;

iv. SEQ ID NO: 73, 74 и 75, кодирующие последовательности V_H-CDR1, V_H-CDR2 и V_H-CDR3 1G9 соответственно; и/или

v. SEQ ID NO: 73, 93 и 94, кодирующие последовательности V_H-CDR1, V_H-CDR2 и V_H-CDR3 1E8 соответственно;

и

b) нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательности:

i. SEQ ID NO: 28, 29 и 30, кодирующие последовательности V_L-CDR1, V_L-CDR2 и V_L-CDR3 1D3 соответственно;

ii. SEQ ID NO: 115, 80 и 116, кодирующие последовательности V_H-CDR1, V_H-CDR2 и V_H-CDR3 1C10 соответственно;

iii. SEQ ID NO: 115, 80 и 116, кодирующие последовательности V_H-CDR1, V_H-CDR2 и V_H-CDR3 1A10 соответственно;

iv. SEQ ID NO: 79, 80 и 81, кодирующие последовательности V_H-CDR1, V_H-CDR2 и V_H-CDR3 1G9 соответственно; и/или

v. SEQ ID NO: 79, 97 и 98, кодирующие последовательности V_H-CDR1, V_H-CDR2 и V_H-CDR3 1E8 соответственно;

или функциональный вариант любой из этих последовательностей, например, вариант, содержащий 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидных замен в любой одной или нескольких указанных SEQ ID NO, и/или вариант, содержащий по меньшей мере 70%, 75% , 80%, 85%, 90% или 95 идентичность последовательности с указанными SEQ ID NO. Например, изменение указанного или каждого варианта нуклеиновой кислоты может

быть молчащей мутацией и, следовательно, не изменять последовательность аминокислотной последовательности, которую он кодирует.

В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения содержит (или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом изобретения в совокупности содержит):

a) нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 102, 120, 66 и 86, кодирующих последовательность вариабельной области тяжелой цепи 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и 1E8 соответственно, и

b) нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 32, 106, 124, 70 и 90, кодирующих последовательность вариабельной области легкой цепи 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и 1E8 соответственно,

или функциональный вариант любой из этих последовательностей, например вариант, имеющий по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичность последовательности с указанными SEQ ID NO.

В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения содержит (или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом изобретения в совокупности содержит):

a) нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность:

i. SEQ ID NO: 34 (с областью, кодирующей лидерную последовательность, или без нее, как указано, и, если она отсутствует, то необязательно содержит последовательность, кодирующую альтернативную лидерную последовательность), кодирующую полную зрелую последовательность тяжелой цепи 1D3, как определено SEQ ID NO: 20;

ii. SEQ ID NO: 155 (с областью, кодирующей лидерную последовательность, или без нее, как указано, и, если она отсутствует, то необязательно содержит последовательность, кодирующую альтернативную лидерную последовательность), кодирующую полную зрелую последовательность тяжелой цепи 1C10, как определено SEQ ID NO: 157;

iii. SEQ ID NO: 159 (с областью, кодирующей лидерную последовательность, или без нее, как указано, и, если она отсутствует, то необязательно

содержит последовательность, кодирующую альтернативную лидерную последовательность), кодирующую полную зрелую последовательность тяжелой цепи 1A10, как определено SEQ ID NO: 161;

iv. SEQ ID NO: 147 (с областью, кодирующей лидерную последовательность, или без нее, как указано, и, если она отсутствует, то необязательно содержит последовательность, кодирующую альтернативную лидерную последовательность), кодирующую полную зрелую последовательность тяжелой цепи 1G9, как определено SEQ ID NO: 149; и/или

v. SEQ ID NO: 151 (с областью, кодирующей лидерную последовательность, или без нее, как указано, и, если она отсутствует, то необязательно содержит последовательность, кодирующую альтернативную лидерную последовательность), кодирующую полную зрелую последовательность тяжелой цепи 1E8, как определено SEQ ID NO: 153;

и

b) нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность:

i. SEQ ID NO: 35 (с областью, кодирующей лидерную последовательность, или без нее, как указано, и, если она отсутствует, то необязательно содержит последовательность, кодирующую альтернативную лидерную последовательность), кодирующую полную зрелую последовательность легкой цепи 1D3, как определено SEQ ID NO: 21;

ii. SEQ ID NO: 156 (с областью, кодирующей лидерную последовательность, или без нее, как указано, и, если она отсутствует, то необязательно содержит последовательность, кодирующую альтернативную лидерную последовательность), кодирующую полную зрелую последовательность легкой цепи 1C10, как определено SEQ ID NO: 158;

iii. SEQ ID NO: 160 (с областью, кодирующей лидерную последовательность, или без нее, как указано, и, если она отсутствует, то необязательно содержит последовательность, кодирующую альтернативную лидерную последовательность), кодирующую полную зрелую последовательность легкой цепи 1A10, как определено SEQ ID NO: 162;

iv. SEQ ID NO: 148 (с областью, кодирующей лидерную последовательность, или без нее, как указано, и, если она отсутствует, то необязательно содержит последовательность, кодирующую альтернативную лидерную

последовательность), кодирующую полную зрелую последовательность легкой цепи 1G9, как определено SEQ ID NO: 150; и/или

v. SEQ ID NO: 152 (с областью, кодирующей лидерную последовательность, или без нее, как указано, и, если она отсутствует, то необязательно содержит последовательность, кодирующую альтернативную лидерную последовательность), кодирующую полную зрелую последовательность легкой цепи 1E8, как определено SEQ ID NO: 154;

или функциональный вариант любой из этих последовательностей, например вариант, имеющий по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичность последовательности с указанными SEQ ID NO (необязательно при этом идентичность последовательности определяют в отношении указанных последовательностей без областей, кодирующих лидерную последовательность, как указано).

Функциональный вариант указанных определенных последовательностей нуклеиновой кислоты в соответствии с вышеизложенными вариантами осуществления может, например, представлять собой вариант замены, делеции и/или добавления любой из вышеуказанных последовательностей нуклеиновой кислоты. Вариант полинуклеотида может содержать 1, 2, 3, 4, 5, до 10, до 20, до 30, до 40, до 50, до 75 или более замен и/или делеций нуклеиновых кислот в последовательностях, приведенных в перечне последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления варианты могут быть на по меньшей мере 70% гомологичны полинуклеотиду любой из последовательностей нуклеиновой кислоты, описанных в данном документе, предпочтительно на по меньшей мере 80% или 90% и более предпочтительно на по меньшей мере 95%, 97% или 99% гомологичны ему. Предпочтительно гомология и идентичность на этих уровнях присутствуют, по меньшей мере, в отношении кодирующих областей полинуклеотидов. Способы измерения гомологии хорошо известны в данной области техники, и специалистам в данной области техники будет понятно, что в данном контексте гомология рассчитывается на основе идентичности нуклеиновой кислоты. Такая гомология может существовать в области по меньшей мере 15, предпочтительно по меньшей мере 30, например по меньшей мере 40, 60, 100, 200 или более смежных нуклеотидов. Такая гомология может существовать по всей длине немодифицированной полинуклеотидной последовательности.

Необязательно в некоторых вариантах последовательностей нуклеиновой кислоты, описанных в данном документе, последовательности областей, кодирующих

любую одну или несколько из шести последовательностей CDR, присутствующих в вариабельной области тяжелой и вариабельной области легкой цепи, могут быть консервативными, и любые вариации последовательностей присутствуют где-либо еще; или в дополнительном варианте уровень и/или характер вариаций в областях, кодирующих любую одну или более из шести последовательностей CDR, присутствующих в вариабельной тяжелой и вариабельной легкой цепях, может быть минимизирован по сравнению с остальной частью или каждой молекулой нуклеиновой кислоты. Например, степень вариации внутри указанной или каждой из областей, кодирующих любую одну или несколько из шести последовательностей CDR, присутствующих в вариабельной области тяжелой и вариабельной области легкой цепи, может быть ограничена 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидными заменами, и/или представлять кодирующую область CDR, имеющую по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичность последовательности с соответствующей невариантной кодирующей областью CDR. Вариации изменения указанного или каждого варианта нуклеиновой кислоты могут, например, представлять собой молчащую мутацию и, следовательно, не изменять последовательность аминокислотной последовательности, которую она кодирует; это может быть (хотя и не обязательно) особенно предпочтительным в областях, которые кодируют любую одну или несколько последовательностей V_H-CDR1, V_H-CDR2 и V_H-CDR3 и/или последовательностей V_L-CDR1, V_L-CDR2 и V_L-CDR3.

Способы измерения гомологии или идентичности полинуклеотидов известны в данной области техники. Например, пакет UWGCG предоставляет программу BESTFIT, которую можно использовать для расчета гомологии (например, с настройками по умолчанию) (Devereux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Research* **12**: 387-395, раскрытия которой включены в данный документ посредством ссылки).

Алгоритмы PILEUP и BLAST также можно использовать для расчета гомологии или выравнивания последовательностей (обычно с настройками по умолчанию), например, как описано в Altschul, 1993, *J Mol Evol* **36**:290-300; Altschul *et al.*, 1990, J Mol Biol 215:403-10, раскрытия которой включены в данный документ посредством ссылки).

Программное обеспечение для проведения анализа BLAST общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Этот алгоритм включает в себя сначала идентификацию пары последовательностей с высокой оценкой (HSP) путем идентификации коротких слов длиной W в последовательности запроса, которые либо соответствуют, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому баллу T при выравнивании со словом той же

длины в последовательности базы данных. T обозначается порогом оценки слов соседства (Altschul *et al.*, выше). Эти начальные совпадения слов из соседства выступают в качестве затравок для начала поиска HSP, содержащих их. Совпадающие слова расширяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока может быть увеличиваться совокупный показатель выравнивания. Расширения совпадений слов в каждом направлении прекращаются, когда: совокупный показатель выравнивания становится равным нулю или ниже вследствие накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательной оценкой; или достигнут конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST W, T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLAST по умолчанию использует длину слова (W), составляющую 11, оценочную матрицу BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, 1992), выравнивание (B), составляющее 50, ожидание (E), составляющее 10, M=5, N=4 и сравнение обеих цепей.

Алгоритм BLAST выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями; см., например, Karlin & Altschul, 1993. Одной из мер сходства, обеспечиваемой алгоритмом BLAST, является вероятность наименьшей суммы (P(N)), которая указывает на вероятность того, что совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями произойдет случайно. Например, последовательность считается похожей на другую последовательность, если наименьшая суммарная вероятность по сравнению первой последовательности со второй последовательностью меньше чем приблизительно 1, предпочтительно меньше чем приблизительно 0,1, более предпочтительно меньше чем приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно меньше чем приблизительно 0,001.

Гомолог может отличаться от последовательности соответствующего полинуклеотида на менее чем 3, 5, 10, 15, 20 или более мутаций (каждая из которых может представлять собой замену, делецию или вставку). Эти мутации можно измерить на участке, состоящем по меньшей мере из 30, например, по меньшей мере 40, 60 или 100 или более смежных нуклеотидов гомолога.

В одном варианте осуществления вариантная последовательность может отличаться от конкретных последовательностей, приведенных в перечне последовательностей, вследствие избыточности генетического кода. Код ДНК состоит из 4 основных остатков нуклеиновых кислот (A, T, C и G) и использует их для «написания» трехбуквенных кодонов, которые представляют аминокислоты, белки, кодируемые в генах организма. Линейная последовательность кодонов вдоль молекулы

ДНК транслируется в линейную последовательность аминокислот в белке(ах), кодируемом(ых) этими генами. Код является значительно вырожденным, при этом 61 кодон кодирует 20 природных аминокислот, а 3 кодона представляют «стоп»-сигналы. Таким образом, большинство аминокислот кодируются более чем одним кодоном, фактически некоторые из них кодируются четырьмя или более разными кодонами. Таким образом, вариантный полинуклеотид по настоящему изобретению может кодировать ту же полипептидную последовательность, что и другой полинуклеотид по настоящему изобретению, но может иметь другую последовательность нуклеиновой кислоты вследствие использования разных кодонов для кодирования одних и тех же аминокислот.

Таким образом, один или несколько полипептидов, присутствующих в связывающей молекуле по первому аспекту настоящего изобретения, могут быть получены или доставлены в форме одного или нескольких полинуклеотидов, которые кодируют и способны экспрессировать их.

Полинуклеотиды по настоящему изобретению можно синтезировать с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, как описано в качестве примера в Green & Sambrook (2012, Molecular Cloning - a laboratory manual, 4th edition; Cold Spring Harbor Press).

Специалистам в данной области техники будет понятно, что молекула нуклеиновой кислоты может быть кодон-оптимизированной для экспрессии полипептида антитела в конкретной клетке-хозяине, например, для экспрессии в клетках человека (например, см. Angov, 2011).

Во избежание сомнений, когда упоминаются варианты нуклеиновых кислот, которые кодируют определенные последовательности CDR, следует понимать, что одна или несколько нуклеотидных последовательностей, кодирующих определенные CDR, могут варьироваться. Таким образом, если нуклеиновая кислота определяется как кодирующая CDR тяжелой цепи или легкой цепи (например, CDR 1-3), каждая из которых кодируется определенной последовательностью нуклеиновой кислоты, можно варьировать до одной, двух или трех из таких конкретных последовательностей и так далее. Аналогичным образом, если нуклеиновая кислота определяется как кодирующая CDR легкой цепи и тяжелой цепи (например, шесть CDR), каждая из которых кодируется определенной нуклеотидной последовательностью, можно варьировать до одной, двух, трех, четырех, пяти или всех шести из этих конкретных последовательностей. Варианты обычно приводят к консервативным аминокислотным заменам, как описано выше.

Если нуклеиновая кислота определяется как кодирующая вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, следует понимать, что можно варьировать до одной или двух из этих последовательностей, как определено. Вариация может находиться исключительно в пределах части последовательности, кодирующей отличные от CDR области, исключительно в пределах части последовательности, кодирующей области CDR, или в пределах обеих частей, которые кодируют области CDR, и частей, которые кодируют отличные от CDR области. Обычно вариация находится за пределами областей CDR, и поэтому нуклеиновая кислота может содержать любую из нуклеиновых кислот, которые кодируют конкретные CDR, определенные в данном документе (например, в SEQ ID NO: 8, 9, 10, 14, 15 и/или 16 для 1D3 или любой из соответствующих SEQ ID NO в 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8).

Следует понимать, что любой вариант специфических последовательностей нуклеиновой кислоты, описанных в данном документе, не должен существенно влиять на одно или несколько требуемых связывающий свойств, например, специфичность селективного связывания с ECD3 US28, способность связываться специфически, но агностически в отношении штамма, с ECD3 US28 и/или аффинности связывания в отношении ECD3 US28. Способы тестирования этих требуемых активностей описаны выше в отношении первого аспекта настоящего изобретения.

В особенно предпочтительном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует (или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты вместе кодирует) связывающую молекулу по первому аспекту настоящего изобретения, которая представляет собой scFv, который селективно связывается с ECD3 US28. Таким образом, нуклеиновая кислота (или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты) может содержать области последовательности, которые соответственно кодируют последовательность вариабельной области тяжелой (V_H) цепи и последовательность вариабельной области легкой (V_L) цепи, обычно в форме одной непрерывной области, кодирующей нуклеиновую кислоту, например, одной непрерывной области, кодирующей нуклеиновую кислоту, в которой области последовательности, кодирующие последовательности V_H и V_L, связаны последовательностью, кодирующей линкерную последовательность, так что scFv может экспрессироваться как одиночный полипептид, кодируемый одной последовательностью нуклеиновой кислоты.

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует (или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты

совместно кодирует) связывающую молекулу по первому аспекту настоящего изобретения, которая представляет собой антитело на основе привлекающих иммунные клетки биспецифических активаторов (BiTE). Например, нуклеиновая кислота (или одна или несколько комбинаций множества различных молекул нуклеиновой кислоты) может кодировать область, которая представляет собой область взаимодействия с клеткой, такую как область взаимодействия с Т-клетками, например, CD3-связывающий домен.

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует (или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты вместе кодирует) связывающую молекулу по первому аспекту настоящего изобретения, которая представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). Соответственно, молекула нуклеиновой кислоты или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты по второму аспекту настоящего изобретения может содержать одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих CAR, которая содержит:

(i) внеклеточный домен (например, антитело, такое как scFv), где внеклеточный домен содержит или состоит из связывающей молекулы по первому аспекту настоящего изобретения, как определено в данном документе, или функционального фрагмента указанной связывающей молекулы, как определено в данном документе;

(ii) трансмембранный домен (например, трансмембранный домен белка трансмембранного рецептора, и необязательно при этом трансмембранный домен содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD8, CD45 и CD4); и

(iii) внутриклеточный домен (например, внутриклеточный сигнальный домен, например, где: (a) внутриклеточный сигнальный домен содержит один или несколько мотивов активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM) ; и/или (b) внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета, Fc-гамма-рецептора, Fc-бета-рецептора, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d;

где внеклеточный домен CAR имеет специфичность связывания в отношении эпитопа внеклеточного домена 3 (ECD3) белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV), и

где ECD3 белка US28 содержит аминокислотную последовательность, представленную в белке US28 в положениях, соответствующих положениям 167-183 белка US28, кодируемого цитомегаловирусом человека (HCMV), как указано в SEQ ID NO: 5.

Необязательно внеклеточный домен CAR, кодируемый молекулой(ами) нуклеиновой кислоты по второму аспекту настоящего изобретения, может, например, быть соединен с трансмембранным доменом шарнирной областью. Соответственно, молекула(ы) нуклеиновой кислоты по второму аспекту настоящего изобретения может(гут) включать область последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующую указанную шарнирную область.

Внутриклеточный домен CAR, кодируемый молекулой(ами) нуклеиновой кислоты по второму аспекту настоящего изобретения, может, например, быть соединен с трансмембранным доменом шарнирной областью, например, содержать один или несколько костимулирующих доменов, например: (a) при этом один или несколько костимулирующих доменов содержит один или несколько функциональных сигнальных доменов, полученных из белка, выбранного из группы, состоящей из CD28, 41BB, OX40, ICOS, CD27 и DAP10; (b) при этом внутриклеточный домен содержит костимулирующий домен, проксимальный к внутриклеточному сигнальному домену, (c) при этом внутриклеточный домен содержит два или более костимулирующих домена, например, два последовательных костимулирующих домена, и/или (d) при этом внутриклеточный домен включает отдельные сигналы цитокинов. Соответственно, молекула(ы) нуклеиновой кислоты по второму аспекту настоящего изобретения может(гут) включать одну или несколько областей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующих указанный один или несколько костимулирующих доменов.

Указанная или каждая молекула нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения может также кодировать лидерные последовательности, трансмембранные домены, внутриклеточные сигнальные домены и шарнирные области, такие как любая одна или несколько таких последовательностей, как описано выше. Таким образом, указанная или каждая молекула нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения может содержать лидерную последовательность (например, SEQ ID NO: 13 или 19).

Необязательно молекула нуклеиновой кислоты или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения может быть представлена (совместно или отдельно в отдельной форме) в

форме кассеты экспрессии, которая содержит контрольные последовательности, функционально связанные с вставленной последовательностью, что обеспечивает экспрессию полипептида по настоящему изобретению *in vivo*. Такую кассету экспрессии можно вводить непосредственно субъекту-хозяину. Эти кассеты экспрессии, в свою очередь, обычно содержатся в векторах (например, плазмидах или рекомбинантных вирусных векторах), например, как обсуждается ниже.

C. Векторы

В третьем аспекте настоящего изобретения дополнительно представлен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения.

Термин «вектор» относится к нуклеиновой кислоте, которая содержит последовательность одной или нескольких выделенных последовательностей нуклеиновой кислоты и которую можно использовать для доставки указанной или каждой выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. В данной области техники известны многочисленные векторы, включая линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин «вектор» включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Этот термин также следует понимать как включающий неплазмидные и невирусные соединения, которые облегчают перенос нуклеиновой кислоты в клетки, такие как, например, полилизиновое соединение, липосома и т.п.

В контексте, используемом в данном документе, термин «вектор» включает один и/или несколько векторов. Например, он может включать несколько векторов в том контексте, что связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения кодируется комбинацией множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, при этом одна или несколько из нуклеиновых кислот, присутствующих в указанной комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты, могут быть представлены в первом векторе, и одна или несколько других нуклеиновых кислот, присутствующих в указанной комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты, могут быть представлены во втором отдельном векторе, и/или же другие нуклеиновые кислоты в указанной комбинации множества различных молекул нуклеиновых кислот могут быть представлены в третьем, четвертом, пятом и т.д. различных дополнительных векторах.

Таким образом, например, если связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения представляет собой антитело или CAR, которое содержит более одной различных полипептидных цепей, то необязательно одна форма вектора в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения может содержать все необходимые последовательности нуклеиновой кислоты для кодирования более чем одной отдельной полипептидной цепи, образующей связывающую молекулу. В качестве альтернативы в третьем аспекте настоящего изобретения также представлена комбинация множества различных векторов (например, двух векторов или больше), где комбинация множества различных векторов в совокупности представляет собой комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения. Таким образом, например, если связывающая молекула по первому аспекту настоящего изобретения представляет собой антитело или CAR, которое содержит более чем одной различной полипептидной цепи, тогда каждый из множества различных векторов может содержать одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует разные и отдельные полипептидные цепи, которые вместе образуют связывающую молекулу, так что связывающая молекула содержит одну или несколько отдельных полипептидных цепей, кодируемых первым вектором, и одну или несколько других отдельных полипептидных цепей, кодируемых одним или несколькими последующими различными векторами.

Для краткости, в целом, в настоящей заявке термин «вектор» используется в единственном числе, хотя следует понимать, что это может необязательно также охватывать «векторы», включая множество различных форм вектора, как описано выше, во множественном числе.

Необязательно указанный (или каждый) вектор может быть выбран из группы, состоящей из ретровирусного вектора, плазмиды, лентивирусного вектора и аденовирусного вектора.

Указанный или каждый вектор в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения, может быть введен субъекту-хозяину. Предпочтительно полинуклеотид получают и/или вводят с использованием генетического вектора. Подходящим вектором может быть любой вектор, который способен нести достаточное количество генетической информации и обеспечивать экспрессию одной или нескольких

полипептидных последовательностей, кодируемых вектором или каждым вектором, например, обеспечивая экспрессию связывающей молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения.

Экспрессия природных или синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих связывающие молекулы по первому аспекту настоящего изобретения (такие как антитела или их фрагменты, включая scFv, BiTE и т.п., а также CAR), обычно достигается путем функционального связывания одной или нескольких нуклеиновых кислот, каждая из которых независимо кодирует один или несколько полипептидов (или их частей) в промоторе и содержит указанную или каждую конструкцию в одном или нескольких векторах экспрессии. Таким образом, указанный (или каждый) вектор может представлять собой вектор экспрессии.

Таким образом, третий аспект настоящего изобретения включает векторы экспрессии, которые содержат такие полинуклеотидные последовательности. Под «вектором экспрессии» понимают вектор, содержащий рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. Такие векторы экспрессии обычно конструируют в области молекулярной биологии и могут, например, включать использование плазмидной ДНК и соответствующих инициаторов, промоторов, энхансеров и других элементов, таких как, например, сигналы полиаденилирования, которые могут быть необходимы и которые расположены в правильной ориентации, чтобы обеспечить экспрессию одной или нескольких полипептидных последовательностей, кодируемых указанным или каждым вектором, например, обеспечивая экспрессию связывающей молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения. Другие подходящие векторы будут очевидны специалистам в данной области техники (см. Green & Sambrook, выше).

Вектор экспрессии может содержать достаточное количество функционирующих в цис-положении элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть предоставлены клеткой-хозяином или системой экспрессии *in vitro*. Векторы экспрессии включают все векторы, известные в данной области техники, включая космиды, плазмиды (например, голые или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые включают рекомбинантный полинуклеотид. Типичные векторы клонирования содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы,

применимые для регуляции экспрессии требуемой последовательности нуклеиновой кислоты.

Кроме того, вектор экспрессии может быть представлен в форме вирусного вектора. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области техники и описана, например, в Sambrook *et al.*, 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY). Вирусы, которые можно использовать в качестве векторов, включают без ограничения ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы.

Для переноса генов в клетки млекопитающих был разработан ряд вирусных систем. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. Одну или несколько выбранных последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих одну или несколько полипептидных последовательностей, представляющих интерес, можно вставить в вектор и упаковать в ретровирусные частицы с использованием методик, известных в данной области техники. Затем рекомбинантный вирус можно выделить и доставить в клетки *in vivo* или *ex vivo*. В данной области техники известен ряд ретровирусных систем.

Термин «лентивирус» относится к роду семейства Retroviridae. Лентивирусы уникальны среди ретровирусов, поскольку способны инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, поэтому являются одним из наиболее эффективных методов векторной доставки генов. HIV, SIV и FIV являются примерами лентивирусов. Лентивирусные векторы являются особенно подходящими инструментами для достижения долговременного переноса генов, поскольку они обеспечивают долговременную и стабильную интеграцию трансгена и его распространение в дочерних клетках.

Термин «лентивирусный вектор» относится к вектору, полученному из по меньшей мере части генома лентивируса, включая, в частности, самоинактивирующийся лентивирусный вектор, как представлено Milone *et al.*, Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Другие примеры лентивирусных векторов, которые можно использовать в клинике, включают без ограничения, например, технологию доставки генов LENTIVECTOR® от Oxford BioMedica, векторную систему LENTIMAX™ от Lentigen и т.п. Доклинические типы лентивирусных векторов также доступны и известны специалисту в данной области техники.

Также можно использовать аденовирусные векторы, и в данной области техники известен ряд аденовирусных векторов.

Также можно использовать гибридные векторы, и в данной области техники известен ряд гибридных векторов. Гибридные векторы обычно включают векторные вирусы, которые генетически модифицированы так, чтобы иметь качества более чем одного вектора. Вирусы изменяются, чтобы избежать недостатков типичных вирусных векторов, которые могут иметь ограниченную нагрузочную способность, иммуногенность, генотоксичность и не поддерживать долговременную адекватную трансгенную экспрессию.

Экспрессию нуклеиновых кислот, кодирующих связывающую молекулу в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, также можно осуществлять с использованием транспозонов, таких как «спящая красавица», CRISPR, CAS9 и нуклеазы с цинковыми пальцами.

Вектор может быть подходящим для репликации и интеграции в эукариотах и/или он может быть подходящим для экспрессии в прокариотах, например, в видах бактерий. Предпочтительно указанный или каждый вектор способен экспрессировать связывающую молекулу в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения в продуцирующей клетке (например, клетке CHO, клетке *E. coli* и т.д.) или в клетке субъекта, например, в клетках млекопитающих (например, клетках человека), таких как иммунные клетки млекопитающих (например, человека) (например, Т-клетки, NK-клетки, макрофаги и т.д.).

Молекула нуклеиновой кислоты или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения также может быть клонирована в ряд типов векторов, включая плазмиду, фагемиду, производное фага, вирус животного и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают векторы экспрессии, векторы репликации, векторы генерации зондов и векторы секвенирования.

В общем, подходящий вектор необязательно будет содержать точку начала репликации, функциональную по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, функционально связанную с указанной или каждой кодирующей последовательностью нуклеиновой кислоты, удобные сайты эндонуклеазы рестрикции и/или один или несколько селектируемых маркеров (например, WO 01/96584; WO 01/29058 и патент США № № 6326193).

Следует понимать, что вектор в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения может содержать дополнительные промоторные элементы, например энхансеры, которые регулируют частоту инициации транскрипции. Обычно они

расположены в районе 30-110 п.н. выше старт-сайта, хотя было показано, что ряд промоторов содержат функциональные элементы и ниже старт-сайта. Расстояние между промоторными элементами часто является гибким, так что функция промотора сохраняется, когда элементы инвертируются или перемещаются относительно друг друга. В промоторе тимидинкиназы (tk) расстояние между элементами промотора может быть увеличено до 50 п.н. друг от друга, прежде чем активность начнет снижаться. В зависимости от промотора отдельные элементы могут функционировать либо совместно, либо независимо, активируя транскрипцию.

Примером промотора, который способен экспрессировать трансген, представляющий интерес, в Т-клетке млекопитающего, является промотор EFla. Нативный промотор EFla управляет экспрессией альфа-субъединицы комплекса фактора элонгации-1, который отвечает за ферментативную доставку аминоацил-тРНК к рибосоме. Промотор EFla широко использовался в плазмидах экспрессии млекопитающих, и было показано, что он эффективен в стимулировании экспрессии трансгенов (например, CAR-кодирующих трансгенов), клонированных в лентивирусный вектор. См., например, Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009).

Другим примером промотора является последовательность немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV). Эта промоторная последовательность представляет собой сильную конститутивную промоторную последовательность, способную обеспечивать высокие уровни экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с ней.

В качестве альтернативы или в качестве дополнения могут быть использованы другие конститутивные промоторные последовательности, включая без ограничения ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), вирус опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор длинного концевого повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (HIV), промотор MoMuLV, промотор вируса птичьего лейкоза, промотор немедленно-раннего вируса Эпштейна-Барра, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, такие как без ограничения промотор актина, промотор миозина, промотор фактора элонгации la, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы.

Кроме того, настоящее изобретение не ограничивается использованием конститутивных промоторов. Индуцибельные промоторы также рассматриваются как часть настоящего изобретения. Использование индуцибельного промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный включать экспрессию полинуклеотидной

последовательности, с которой она функционально связана, когда такая экспрессия требуется, или выключать экспрессию, когда экспрессия не требуется. Примеры индуцибельных промоторов включают без ограничения металлотиониновый промотор, глюкокортикоидный промотор, прогестероновый промотор и тетрациклиновый промотор. Таким образом, следует понимать, что в любом из способов или вариантов применения настоящего изобретения, описанных в данном документе, экспрессия связывающей молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, кодируемой нуклеиновой(ыми) кислотой(ами) по второму аспекту настоящего изобретения, или вектором(ами) по третьему аспекту настоящего изобретения, может быть условной или индуцибельной, например, посредством стимула окружающей среды или посредством действия второй молекулы. Таким образом, возможно ограничить или свести к минимуму нежелательные нецелевые эффекты (например, в тканях, которые не экспрессируют или экспрессируют низкие уровни US28).

Для оценки экспрессии полипептида(ов), представляющего(их) интерес, в клетке (например, связывающей молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения) вектор может содержать либо селектируемый маркерный ген, либо репортерный ген, либо и то, и другое, чтобы облегчить идентификацию и отбор экспрессирующих клеток. В других вариантах осуществления селектируемый маркер может быть перенесен на отдельный участок ДНК и использован в процедуре совместной трансфекции. Как селектируемые маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Применимые селектируемые маркеры включают, например, гены устойчивости к антибиотикам, такие как neo и тому подобные.

Репортерные гены используются для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. В общем, репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует и не экспрессируется организмом или тканью-реципиентом и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется каким-либо легко обнаруживаемым свойством, например, ферментативная активность. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящее время после введения ДНК в клетки-реципиенты. Подходящие репортерные гены могут включать гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, секретируемую щелочную фосфатазу или ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) (например, Ui-Tei

et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены с использованием известных методик или получены коммерческим путем. В общем, в качестве промотора идентифицируют конструкцию с минимальной 5'-фланкирующей областью, показывающую самый высокий уровень экспрессии репортерного гена. Такие области промотора могут быть связаны с репортерным геном и использоваться для оценки способности средств модулировать управляемую промотором транскрипцию.

Конструкции экспрессии по настоящему изобретению также можно использовать для иммунизации нуклеиновыми кислотами и генной терапии с использованием стандартных протоколов доставки генов (см., например, патент США 5399346). Следовательно, вектор может представлять собой вектор генной терапии. В этом случае может быть желательно связать нуклеиновую кислоту и/или вектор с подходящим нацеливающим фрагментом, чтобы его можно было направить в соответствующую клетку, ткань или орган для экспрессии. Таким образом, следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты и/или вектор по настоящему изобретению могут быть использованы в терапевтических аспектах по настоящему изобретению посредством подхода генной терапии с использованием составов и способов, описанных ниже и известных в данной области техники.

D. Трансформированные клетки

В четвертом аспекте настоящего изобретения представлена клетка или популяция клеток (необязательно гомогенная или гетерогенная популяция клеток), содержащие молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения, и/или вектор в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, необязательно при этом клетка экспрессирует одну или несколько связывающих молекул соответствии с первым аспектом настоящего изобретения (например, одно или несколько антител, например, моноклональное антитело, и/или один или несколько CAR), при этом указанная одна или несколько связывающих молекул и/или CAR, кодируемых молекулой нуклеиновой кислоты или комбинацией множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения, или вектор в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения. Указанные клетки необязательно могут быть выбраны из выделенных клеток, клеток *ex vivo* и клеток *in vitro*.

Такие клетки включают временные или предпочтительно стабильные линии высших эукариотических клеток, таких как клетки млекопитающих или клетки насекомых, низшие эукариотические клетки, такие как дрожжи, или прокариотические клетки, такие как бактериальные клетки. Конкретные примеры клеток, которые могут быть модифицированы путем вставки векторов или кассет экспрессии, кодирующих связывающую молекулу в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, включают клетки млекопитающих HEK293T, CHO, HeLa, NS0 и COS. Предпочтительно выбранная клеточная линия должна быть не только стабильной, но также обеспечивать зрелое гликозилирование и/или экспрессию полипептида на клеточной поверхности.

Такие клеточные линии по настоящему изобретению можно культивировать с использованием обычных способов для получения связывающей молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или можно использовать терапевтически или профилактически для доставки субъекту связывающей молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения.

В качестве альтернативы полинуклеотиды, кассеты экспрессии или векторы по настоящему изобретению можно вводить в клетку от субъекта *ex vivo*, а затем клетку возвращать в организм субъекта.

В том варианте осуществления, в котором указанную(ые) клетку(и) используют в терапевтических или профилактических целях у субъекта, клетка необязательно может быть «аутологичной» или «аллогенной» по отношению к субъекту, как описано далее ниже.

Клетка в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения может, например, содержать: (a) молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения, где кодируемая связывающая молекула представляет собой антитело, функциональный фрагмент указанного антитела или антитело его функционального фрагмента, который содержит слитую полипептидную последовательность в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения; и/или (b) вектор в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, где указанный вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты, как определено вариантом (a) данного параграфа.

Клетка в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения может, например, содержать: (a) молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего

изобретения, где кодируемая связывающая молекула представляет собой CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения; и/или (b) вектор в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, где указанный вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты, как определено частью (a) данного параграфа. Без ограничения указанная клетка может быть выбрана, например, из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK) и макрофага. Соответственно, клетка может необязательно представлять собой CAR-Т-клетку, CAR-NK-клетку или CAR-макрофаг, и необязательно, когда клетка представляет собой CAR-Т-клетку, тогда, например, Т-клетка может быть выбрана из группы, состоящей из CD8+ Т-клеток, CD4+ Т-клеток, эффекторных Т-клеток, Т-клеток-хелперов, Т-клеток памяти, цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), EBV-специфического Т-клеточного рецептора (TCR) или подтипов γδ-Т-клеток.

В четвертом аспекте настоящего изобретения также представлена клетка, содержащая связывающую молекулу в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанную связывающую молекулу, необязательно, где указанная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту или вектор, как определено вторым или третьим аспектами настоящего изобретения соответственно. Например, связывающая молекула может представлять собой антитело в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, функциональный фрагмент указанного антитела в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения или антитело его функционального фрагмента, который содержит слитую полипептидную последовательность в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, и необязательно при этом антитело представляет собой моноклональное антитело, и, кроме того, например, при этом клетка представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка CHO, которая рекомбинантно экспрессирует моноклональное антитело.

В четвертом аспекте настоящего изобретения также представлена клетка, содержащая CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный CAR, необязательно, где указанная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту или вектор, как определено вторым или третьим аспектами настоящего изобретения соответственно. Без ограничения указанная клетка может быть выбрана, например, из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK) и макрофага (M). Соответственно, клетка

может необязательно представлять собой CAR-T-клетку, CAR-NK-клетку или CAR-M-клетку, и необязательно, когда клетка представляет собой CAR-T-клетку, тогда, например, Т-клетка может быть выбрана из группы, состоящей из CD8+ Т-клеток, CD4+ Т-клеток, эффекторных Т-клеток, Т-клеток-хелперов, Т-клеток памяти, цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), EBV-специфического Т-клеточного рецептора (TCR) или подтипов γδ-Т-клеток.

В пятом аспекте настоящего изобретения представлен способ получения клетки, более конкретно рекомбинантной клетки или популяции таких клеток (необязательно гомогенной или гетерогенной популяции клеток), при этом способ включает введение молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения и/или вектор в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения в клетку.

Способы введения и экспрессии генов в клетку известны в данной области техники. В контексте вектора экспрессии вектор можно легко вводить в клетку-хозяина, например. клетку млекопитающих, бактерий, дрожжей или насекомых любым известным в данной области техники способом. Например, вектор экспрессии можно перенести в клетку-хозяина физическими, химическими или биологическими способами.

Физические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают осаждение фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и тому подобное. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области техники. См., например, Sambrook *et al.*, 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY). Предпочтительным способом введения полинуклеотида в клетку-хозяина является трансфекция фосфатом кальция.

Биологические способы введения полинуклеотида, представляющего интерес, в клетку-хозяина включают использование ДНК- и РНК-векторов. Вирусные векторы, и особенно ретровирусные векторы, стали наиболее широко используемым способом вставки генов млекопитающему, например, в клетки человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивирусов, поксвирусов, вируса простого герпеса I, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т.п. См., например, пат. №№ 5350674 и 5585362. Полинуклеотид, представляющий интерес, может быть доставлен в клетку посредством вирусной трансдукции.

Химические средства введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают коллоидные дисперсионные системы, такие как комплексы макромолекул, нанокапсулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии масло в воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Обычно липосому (например, искусственную мембранную везикулу) можно использовать в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo*. Доступны другие современные способы целевой доставки нуклеиновых кислот, такие как доставка полинуклеотидов с помощью нацеленных наночастиц или другой подходящей системы доставки субмикронного размера.

В случае использования невирусной системы доставки средством доставки может быть липосома. Предполагается использование липидных составов для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*). Нуклеиновая кислота, ассоциированная с липидом, может быть инкапсулирована в водную часть липосомы, рассеяна внутри липидного бислоя липосомы, прикреплена к липосоме посредством связывающей молекулы, которая связана как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, захвачена липосомой, образующий комплекс с липосомой, диспергирована в растворе, содержащем липид, смешана с липидом, объединена с липидом, содержащимся в виде суспензии в липиде, содержащемся или образующем комплекс с мицеллой или иным образом связанна с липидом. Композиции, ассоциированные с липидом, липидом/ДНК или липидом/экспрессирующим вектором, не ограничены какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в двухслойной структуре в виде мицелл или в виде «свернутой» структуры. Они также могут быть просто перемешаны в растворе, возможно, образуя агрегаты, неоднородные по размеру и форме. Липиды представляют собой жировые вещества, которые могут представлять собой встречающиеся в природе или синтетические липиды. Например, липиды включают жировые капли, которые естественным образом встречаются в цитоплазме, а также класс соединений, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминоспирты и альдегиды.

Липиды, подходящие для использования, можно получить из коммерческих источников. Например, димиристилфосфатидилхолин («DMPC») можно получить от Sigma, Сент-Луис, Миссури; дицетилфосфат («DCP») можно получить от K&K Laboratories (Плейнвью, Нью-Йорк); холестерин («Choi») можно получить от Calbiochem-Behring; димиристилфосфатидилглицерин («DMPG») и другие липиды можно получить от Avanti Polar Lipids, Inc. (Бирмингем, Алабама).

«Липосома» представляет собой общий термин, охватывающий множество одно- и многослойных липидных носителей, образующихся в результате образования закрытых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы можно охарактеризовать как имеющие везикулярные структуры с двухслойной фосфолипидной мембраной и внутренней водной средой. Мультиламеллярные липосомы имеют несколько липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно, когда фосфолипиды суспендируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоперегруппировке до образования закрытых структур и захватывают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh *et al.*, 1991 Glycobiology 5: 505-10). Однако также включены композиции, которые имеют в растворе структуру, отличную от нормальной везикулярной структуры. Например, липиды могут иметь мицеллярную структуру или просто существовать в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также рассматриваются комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота.

Одну или несколько молекул РНК, кодирующих связывающую молекулу по первому аспекту настоящего изобретения, можно ввести в клетку с использованием формы временной трансфекции. Другие способы введения кодирующей РНК в клетку включают без ограничения электропорацию (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Кельн, Германия)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Бостон) Массачусетс) или Gene Pulser II (BioRad, Денвер, Колорадо), Multiporator (Эппендорт, Гамбург, Германия), опосредованную катионными липосомами трансфекцию с использованием липофекции, полимерную инкапсуляцию, опосредованную пептидами трансфекцию или системы доставки биолистических частиц, таких как «генные пушки» (см., например, Nishikawa, *et al.*, Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001).

Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина или иного воздействия на клетку нуклеиновой кислоты или вектора по настоящему изобретению, для подтверждения присутствия нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине могут быть проведены различные анализы. Такие анализы включают, например, «молекулярно-биологические» анализы, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как саузерн- и нозерн-блоттинг, RT-PCR и ПЦР; «биохимические» анализы, такие как обнаружение присутствия или отсутствия конкретного пептида, например, иммунологическими средствами (ELISA и вестерн-блоттинг) или с помощью анализов, описанных в данном документе, для идентификации средств, подпадающих под объем настоящего изобретения.

Указанный способ необязательно дополнительно включает стадию выбора клеток в соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения; например, отбор указанных клеток из гетерогенной популяции клеток, чтобы тем самым создать обогащенную и/или гомогенную популяцию клеток. Указанная стадия отбора может включать отбор на наличие одного или нескольких селектируемых маркеров, присутствующих в молекуле нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты, в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения, и/или векторе в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения.

Указанный способ необязательно включает культивирование указанных клеток. Указанные культивируемые клетки могут, следовательно, продуцировать одну или несколько связывающих молекул в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, и указанный способ может включать выделение и/или очистку одной или нескольких связывающих молекул из указанных культивируемых клеток. Необязательно выделенная и/или очищенная одна или несколько связывающих молекул могут быть составлены, например, в фармацевтически приемлемом составе, и/или введены субъекту, нуждающемуся в этом.

E. CAR-экспрессирующие клетки

Как обсуждалось выше, в предпочтительном варианте осуществления клетка в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения может содержать:

(a) молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения, где кодируемая связывающая молекула представляет собой CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения; и/или

(b) вектор в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, где указанный вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты, как определено частью (a) этого параграфа.

Без ограничения указанная клетка может быть выбрана, например, из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK) и макрофага (M). Соответственно, клетка необязательно может представлять собой CAR-Т-клетку, CAR-NK-клетку или CAR-M-клетку.

Если клетка представляет собой CAR-Т-клетку, то Т-клетка может быть любой из альфа-бета-Т-клетки, гамма-дельта-Т-клетки, Т-клетки памяти (например, Т-клетки памяти со свойствами, подобными стволовым клеткам). Например, Т-клетка может быть выбрана из группы, состоящей из $CD8^+$ Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток, эффекторных Т-клеток,

Т-клеток-хелперов, Т-клеток памяти, цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), EBV-специфического Т-клеточного рецептора (TCR). или подтипов γδ-Т-клеток. В особенно предпочтительном варианте осуществления иммунная клетка может представлять собой Т-клетку памяти со свойствами, подобными стволовым клеткам.

Если клетка представляет собой CAR-NK-клетку, то NK-клетка необязательно может представлять собой инвариантную NK-клетку.

Если клетка представляет собой CAR-клетку-макрофаг (CAR-M), то макрофаг необязательно может представлять собой макрофаг типа M1. Как обсуждалось в Mukhopadhyay (Nature Methods, 2020, **17**: 559–565), хотя экспрессия CAR на Т-клетках показала огромные перспективы в лечении злокачественных новообразований, терапия CAR-Т-клетками может быть затруднена вследствие неспособности Т-клеток проникать в солидные опухоли, а также в ингибирующее опухолевое микроокружение (TME), тогда как было показано, что введение CAR в макрофаги (CAR-M) может эффективно способствовать противоопухолевому ответу.

Однако в более общем смысле следует понимать, что CAR-экспрессирующая клетка может представлять собой клетку любого типа (например, иммунную клетку, такую как Т-клетка), полученную от субъекта (например, человека) или из любой клеточной линии. Такие клетки можно модифицировать, чтобы они содержали нуклеиновую кислоту или вектор по настоящему изобретению и тем самым экспрессировали CAR по настоящему изобретению. Таким образом, настоящее изобретение включает способ получения клетки, экспрессирующей CAR по настоящему изобретению, при этом способ включает получение клетки, полученной от субъекта, или получение клетки, полученной от субъекта, или получение клеточной линии, и введение одной или нескольких полинуклеотидных молекул в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, или вектора в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, в указанную клетку или клеточную линию.

Примеры субъектов включают млекопитающих, людей, собак, кошек, мышей, крыс и их трансгенные виды.

Клетка может быть «аутологичной» или «аллогенной», как описано далее ниже.

Под «аутологичным» подразумевают то, что CAR-экспрессирующая клетка, получена из клеток, которые происходят от индивидуума, у которого должны быть использованы CAR-экспрессирующие клетки в соответствии с различными аспектами настоящей заявки.

Под «аллогенным» подразумевают то, что CAR-экспрессирующая клетка, получена из клеток, которые не происходят от индивидуума, у которого должны быть использованы CAR-экспрессирующие клетки в соответствии с различными аспектами настоящей заявки. Обычно клетки получают из клеток того же вида, что и индивидуум, в отношении которого будут осуществляться способы или варианты применения.

Иммунные клетки, такие как Т-клетки, могут быть получены из ряда источников: мононуклеарных клеток периферической крови, костного мозга, ткани лимфатических узлов, пуповинной крови, ткани тимуса, ткани из участка инфекции, асцита, плеврального выпота, ткани селезенки и опухолей. Также можно использовать любое количество клеточных линий (например, линий иммунных клеток, таких как линии Т-клеток), доступных в данной области техники.

В варианте осуществления иммунные клетки (например, Т-клетки) получают из единицы крови, взятой у субъекта, с использованием любых подходящих методик, известных в данной области техники, таких как разделение с помощью Ficoll™. В другом варианте осуществления клетки из циркулирующей крови субъекта получают путем афереза. Продукт афереза обычно содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. Следует понимать, что клетки, собранные с помощью афереза, можно промывать с удалением фракции плазмы и помещать клетки в соответствующий буфер или среду для последующих стадий обработки. Например, клетки можно промывать фосфатно-солевым буфером (PBS). В качестве альтернативы в растворе для промывания отсутствует кальций и может отсутствовать магний или может отсутствовать множество, если не все, двухвалентные катионы. Начальные стадии активации в отсутствие кальция могут приводить к усилению активации. Стадию промывания можно выполнить способами, известными специалистам в данной области техники, например, с использованием полуавтоматической «проточной» центрифуги (например, клеточного процессора Cobe 2991, Baxter CytoMate или Haemonetics Cell Saver 5) в соответствии с инструкциями производителя. После промывания клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах, таких как, например, не содержащий Ca, не содержащий Mg PBS, PlasmaLyte A или другой солевой раствор с буфером или без него. В качестве альтернативы нежелательные компоненты образца афереза могут быть удалены, а клетки непосредственно ресуспендированы в культуральной среде.

В одном варианте осуществления Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови путем лизиса эритроцитов и истощения моноцитов, например,

центрифугированием в градиенте PERCOLLTM или противоточным центрифугированием. Специфические субпопуляции Т-клеток, такие как CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и CD45RO+ Т-клетки, могут быть дополнительно выделены с помощью методик положительного или отрицательного отбора, известных в данной области техники. Например, Т-клетки можно выделить путем инкубации с гранулами, конъюгированными с антителом к Cd3/антителом к CD28 (например, 3x28), такими как DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, в течение периода времени, достаточного для положительного отбора требуемых Т-клеток. В качестве дополнения или в качестве альтернативы популяция Т-клеток может быть обогащена путем отрицательного отбора, например, за счет комбинации антител, направленных к поверхностным маркерам, уникальным для отрицательно отобранных клеток. Можно использовать сортировку и/или отбор клеток посредством отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии.

Понятно, что клетки, полученные от субъектов, которые должны быть модифицированы для экспрессии CAR (и/или другой связывающей молекулы) по настоящему изобретению, могут храниться в течение определенного периода времени до их использования (см., например, терапевтические способы ниже). Например, клетки можно заморозить, необязательно после промывки, или инкубировать в подходящих условиях, чтобы они оставались жизнеспособными до тех пор, пока они не понадобятся (например, на ротаторе при 2-10 °C или при комнатной температуре). Таким образом, клетки можно хранить до тех пор, пока они не потребуются. Они могут храниться в неизмененном состоянии (т.е. в котором они не экспрессируют CAR по настоящему изобретению) или в модифицированном состоянии (т.е. в котором они были модифицированы для экспрессии CAR по настоящему изобретению).

Перед использованием в терапевтических целях, описанных ниже, клетки можно активировать и размножать, как правило, с использованием способов, известных в данной области техники. Например, Т-клетки можно размножать путем контакта с поверхностью, к которой прикреплено средство, которое стимулирует сигнал, ассоциированный с комплексом CD3/TCR, и лиганд, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В частности, популяции Т-клеток можно стимулировать, как описано в данном документе, например, путем контакта с антителом к CD3 или его антигенсвязывающим фрагментом, или с антителом к CD2, иммобилизованным на поверхности, или путем контакта с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с ионофором кальция. Для

костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток используется 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. Примеры антител к CD28 включают 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Безансон, Франция), которые можно использовать, как и другие способы, широко известные в данной области техники (Berg *et al.*, Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen *et al.*, J. Exp. Med. 190(9): 13191328, 1999; Garland *et al.*, J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

В варианте осуществления клетка, которая экспрессирует CAR (и/или другое связывающее средство) по настоящему изобретению, дополнительно модифицируется, чтобы содержать или экспрессировать одно или несколько других средств, которые усиливают активность клетки (например, Т-клетки).

Например, другое средство может представлять собой средство, которое ингибирует ингибирующую молекулу, которая, как известно, снижает способность CAR-экспрессирующей клетки вызывать эффективный иммунный ответ. Примеры ингибирующих молекул включают PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и рецептор TGF-бета. Средство, которое ингибирует ингибирующую молекулу, может содержать первый полипептид, например, ингибирующую молекулу, ассоциированную с вторым полипептидом, который передает клетке положительный сигнал, например, внутриклеточным сигнальным доменом, описанным в данном документе.

В качестве дополнения или в качестве альтернативы другое средство может представлять собой провоспалительный или пролиферативный цитокин. Целью таких цитокинов может быть обеспечение аутокринной поддержки для усиления функции, пролиферации и/или персистенции CAR-экспрессирующих клеток и/или благоприятное изменение микроокружения опухоли и рекрутирование эндогенных врожденных и когнатных иммунных эффектов.

Следует понимать, что в настоящем изобретении представлена популяция клеток, которая содержит один или несколько полинуклеотидов в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения и/или один или несколько векторов в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения. Таким образом, в настоящем изобретении представлена популяция клеток, которые экспрессируют CAR (и/или другую связывающую молекулу) по настоящему изобретению (например, иммунные клетки, такие как Т-клетки). В некоторых вариантах осуществления популяция CAR-

экспрессирующих клеток содержит смесь клеток, экспрессирующих разные CAR. Например, популяция клеток может содержать первую клетку, экспрессирующую CAR, имеющий связывающий домен со специфичностью в отношении ECD3 US28, как описано в данном документе, и вторую клетку, экспрессирующую CAR, имеющую другой связывающий домен, такой как связывающий домен, направленный против US28, например, другой CAR, который имеет специфичность в отношении ECD3 US28, как описано в данном документе. В качестве другого примера популяция CAR-экспрессирующих клеток может содержать первую клетку, экспрессирующую CAR, которая содержит связывающий домен со специфичностью в отношении ECD3 US28, как описано в данном документе, и вторую клетку, экспрессирующую CAR, которая содержит антигенсвязывающий домен в отношении другой мишени, чем US28. В качестве еще одного примера популяция CAR-экспрессирующих клеток может содержать первую клетку, экспрессирующую CAR, которая содержит связывающий домен со специфичностью в отношении ECD3 US28, как описано в данном документе, и вторую клетку, экспрессирующую одно или несколько средств, которые усиливают активность CAR-экспрессирующей клетки (например, Т-клетки).

Анализ активности CAR

Настоящее изобретение также включает способы изготовления CAR по настоящему изобретению. Например, настоящее изобретение включает экспрессию в подходящей клетке-хозяине рекомбинантного вектора, кодирующего CAR, и извлечение CAR. Способы экспрессии и очистки полипептидов (например, антител) очень хорошо известны в данной области техники.

После создания CAR по настоящему изобретению можно использовать различные анализы для оценки его активности, включая анализ способности размножать Т-клетки после стимуляции антигеном, поддерживать размножение Т-клеток в отсутствие повторной стимуляции и противораковой активности в соответствующих (например, животных) моделях *in vitro* и *in vivo*.

Размножение *in vitro* CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток) после стимуляции антигеном можно измерить с помощью проточной цитометрии. Например, клетки могут экспрессировать CAR вместе с флуоресцентным репортером, и флуоресценцию измеряют в присутствии и в отсутствие US28 и/или в присутствии или в отсутствие одного или нескольких пептидов в соответствии с тринадцатым и/или четырнадцатым аспектами настоящего изобретения. Подходящие способы описаны в Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009).

Животные модели также можно использовать для измерения активности CAR-экспрессирующей клетки (например, иммунной клетки, такой как Т-клетка). Например, модель ксенотрансплантата с использованием US28-специфических CAR-экспрессирующих Т-клеток может быть использована для лечения первичного US28-экспрессирующего рака человека у мышей с иммунодефицитом, как это было сделано для CD19-специфических CAR-экспрессирующих Т-клеток при лечении пре-В-клеточного ALL у иммунодефицитных мышей (см., например, Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)).

Также активность CAR можно определить путем оценки пролиферации клеток и продукции цитокинов (см., например, Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)).

Технологии визуализации также могут использоваться для оценки конкретного перемещения и распространения CAR в моделях с животными-опухоленосителями. Такие анализы были описаны, например, в Barrett *et al.*, Human Gene Therapy 22: 1575-1586 (2011).

Другие анализы, включая те, которые известны в данной области техники, также можно использовать для оценки конструкций CAR по настоящему изобретению.

Средства, применимые в комбинации с видами терапии на основе CAR-экспрессирующих клеток

Настоящее изобретение также предполагает использование CAR-экспрессирующих клеток в комбинации со средством, которое увеличивает эффективность, и/или пролиферацию, и/или персистентность указанной CAR-экспрессирующей клетки. Предпочтительно средство, которое увеличивает эффективность, и/или пролиферацию, и/или персистентность CAR-экспрессирующей клетки, представляет собой цитокин.

Дополнительное терапевтическое средство может представлять собой цитокин для повышения эффективности/персистенции/размножения CAR-экспрессирующих клеток (например, Т-клеток).

Дополнительное терапевтическое средство может представлять собой средство, который ослабляет один или несколько побочных эффектов, ассоциированных с введением CAR-экспрессирующей клетки. Например, дополнительное терапевтическое средство можно использовать для лечения «цитокинового шторма» (например, антитело к IL6). Под «цитокиновым штормом» (также известным как цитокиновый каскад и гиперцитокинемия) подразумевают потенциально фатальное гипервысвобождение

медиаторов воспаления (цитокинов) в ответ на стимуляцию Т-клеток и макрофагов патогенами и иммунные нарушения.

Дополнительное терапевтическое средство может представлять собой антитело или комбинацию антител, которые блокируют CTLA-4 (например, ипилимумаб и тремелимумаб), PD-1 (например, ниволумаб, пембролизумаб и пидилизумаб) и/или PD-L1 (например, MDX-1105 и MPDL3280A).

Было подтверждено, что терапия CAR-T-клетками может быть направлена на опухолевые ткани посредством коэкспрессии хемокиновых рецепторов (CXCR2 или CCR4) или посредством комбинации с хемокинами (Di Stasi et al., 2009, *Blood*, **113**:6392–6402; Kershaw et al., 2002, *Hum Gene Ther.*, **13**:1971–1980). Она может представлять собой вариант выбора, поскольку US28 также связывается с несколькими хемокинами CC, а также с CX3CR1.

Xia et al., 2016, *Cancer Res.* **76**:6747–6759 предположили, что комбинация онколитического вируса с терапией CAR-T-клетками может быть особенно эффективной в инактивированных белком генов интерферона опухолях и опухолях с нарушением IFN типа I. В отличие от этого, Ajina and Maher (*J Immunother Cancer.*, 2017; **5**:90), Kim (*Nat Commun.* 2017; **8**:344) и Scott et al (*Macromol Biosci.*, 2018 Jan; **18**) указали, что инфекция онколитическим вирусом может усиливать проникновение и мобилизацию CAR-T-клеток, а также смягчать или обращать местную иммуносупрессию и усиливать функцию и персистенцию эффекторов CAR-T-клеток.

F. Получение и очистка связывающих молекул

В шестом аспекте настоящего изобретения представлен способ получения связывающей молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, например антитела или CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, при этом способ включает: экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения и/или вектора в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения в клетке, более конкретно рекомбинантной клетке или популяции таких клеток (необязательно гомогенной или гетерогенной популяции клеток). Указанная клетка или клетки могут представлять собой клетку по пятому аспекту настоящего изобретения, например, как описано выше.

Необязательно способ в соответствии с шестым аспектом настоящего изобретения может также включать стадию выделения или очистки полученной таким образом связывающей молекулы из клетки; например, при этом связывающая молекула

представляет собой антитело в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, функциональный фрагмент указанного антитела или антитело его функционального фрагмента, который содержит последовательность слитого полипептида в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы по настоящему изобретению могут быть очищены. Термин «очищенный», используемый в данном документе, предназначен для обозначения композиции, которую можно выделить из других компонентов, в которой связывающие молекулы очищены в любой степени относительно состояния, в котором они могут быть получены после первоначального продуцирования, например, в состоянии, при котором они продуцируются в клетке или культуре клеток. Если используется термин «по сути очищенный», это обозначение будет относиться к композиции, в которой связывающая молекула образует основной компонент композиции, например, составляющая приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95% или больше (по массе) от белкового содержания в композиции.

Методики очистки белков хорошо известны специалистам в данной области техники. Эти методики включают, на одном уровне, грубое фракционирование клеточной среды на полипептидные и неполипептидные фракции. Отделив полипептид, представляющий интерес (например, связывающую молекулу по настоящему изобретению), от других белков, полипептид, представляющий интерес, можно дополнительно очистить с использованием хроматографических и электрофоретических методик для достижения частичной или полной очистки (или очистки до гомогенности). Аналитические методы, особенно подходящие для получения чистого пептида, включают ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию; электрофорез в полиакриламидном геле; изоэлектрическое фокусирование. Другие способы очистки белка включают осаждение сульфатом аммония, PEG, антителами и т.п. или термическую денатурацию с последующим центрифугированием; гель-фильтрацию, обращенно-фазовую, гидроксилапатитную и аффинную хроматографию; и комбинации таких и других методик.

При очистке антитела или другой связывающей молекулы по настоящему изобретению может оказаться желательным экспрессировать полипептид в прокариотической или эукариотической системе экспрессии и экстрагировать белок с использованием денатурирующих условий. Полипептид можно очистить от других

клеточных компонентов с использованием аффинной колонки, которая связывается с меченой частью полипептида. Как общеизвестно в данной области техники, считается, что порядок проведения различных стадий очистки может быть изменен или что определенные стадии можно опустить, и все же в результате получится подходящий способ получения по сути очищенного белка или пептида.

Обычно полные антитела фракционируют с использованием средств (т.е. белка A), которые связывают Fc-часть антитела. В качестве альтернативы антигены можно использовать для одновременной очистки и отбора подходящих антител. Например, в контексте связывающих молекул в соответствии с настоящим изобретением, которые обладают специфичностью связывания в отношении ECD3 US28, подходящие антигены могут включать один или несколько пептидов или полипептидов, выбранных из одного или обоих из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинацию по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, слитый белок в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения и/или комбинацию по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения, конъюгат в соответствии с восемнадцатым аспектом настоящего изобретения и/или комбинацию по меньшей мере двух различных конъюгатов в соответствии с девятнадцатым аспектом настоящего изобретения.

В таких методах часто используется средство отбора, связанное с подложкой, такой как колонка, фильтр или гранула. Антитело или другая связывающая молекула может быть связана с подложкой, примеси удаляются (например, смываются), а антитело (или другая связывающая молекула) высвобождается путем применения условий (соль, тепло и т.д.).

В свете настоящего изобретения специалистам в данной области техники будут известны различные способы количественного определения степени очистки белка или пептида. К ним относятся, например, определение специфической активности активной фракции или оценка количества полипептида во фракции с помощью анализа SDS/PAGE. Другой способ оценки чистоты фракции состоит в расчете удельной активности фракции, сравнении ее с удельной активностью исходного экстракта и, таким образом, расчете степени чистоты. Фактические единицы, используемые для представления количества активности, будут, безусловно, зависеть от конкретной методики анализа, выбранной для последующей очистки, и от того, проявляет ли экспрессируемый белок или пептид обнаружимую активность.

В седьмом аспекте настоящего изобретения представлена выделенная и/или очищенная связывающая молекула, которую получают или можно получить с помощью способа по шестому аспекту настоящего изобретения, необязательно при этом выделенную связывающую молекулу дополнительно составляют для введения субъекту.

В одном варианте осуществления связывающие молекулы по настоящему изобретению могут быть составлены в виде фармацевтической композиции; указанная композиция содержит фармацевтически эффективное количество одной или нескольких связывающих молекул по настоящему изобретению, как определено в данном документе. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически или ветеринарно приемлемый адъювант, разбавитель или носитель, который обычно выбирают с учетом предполагаемого пути введения и стандартной фармацевтической практики. Композиция может быть представлена в форме препаратов с немедленным, отсроченным или контролируемым высвобождением. Предпочтительно состав представляет собой разовую дозу, содержащую суточную дозу или единичную, ежедневную субдозу или соответствующую часть активного ингредиента.

Фразы «фармацевтически или ветеринарно приемлемые» включают ссылку на композиции, которые не вызывают побочных, аллергических или других нежелательных реакций при введении животному или человеку, в зависимости от обстоятельств. Получение таких фармацевтических или ветеринарных композиций известно специалистам в данной области техники в свете настоящего изобретения, как показано на примере Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, включенной в данный документ посредством ссылки. Кроме того, для введения животным или человеку следует понимать, что препараты должны соответствовать стерильности, пирогенности, общим стандартам безопасности и чистоты, как того требует Управление по биологическим стандартам FDA.

Используемый в данном документе термин «фармацевтически или ветеринарно приемлемый носитель» включает любые растворители, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные средства, противогрибковые средства), изотонические средства, соли, консерванты, лекарственные средства, стабилизаторы лекарственных средств, наполнители, средства дезинтеграции, такие как материалы и их комбинации, которые известны среднему специалисту в области медицины. За исключением случаев, когда

какой-либо традиционный носитель несовместим с активным ингредиентом, предусмотрено его применение в терапевтических или фармацевтических композициях.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит дополнительное лекарственное средство и/или другое терапевтическое, профилактическое или диагностическое средство.

В одном варианте осуществления связывающие молекулы по настоящему изобретению, как описано в данном документе, композиция, описанная в данном документе, или фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, составлены для перорального, парентерального, внутривенного, внутриартериального, внутрибрюшинного, внутримышечного, внутриглазного, внутричерепного, внутримозгового, внутрикостного, внутрицеребровентрикулярного, интратекального или подкожного введения.

Стерильные растворы для инъекций можно приготовить путем включения связывающих молекул по настоящему изобретению в необходимом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией. Фармацевтические композиции лучше всего использовать в форме стерильного водного раствора, который может содержать другие вещества, например, достаточное количество солей или глюкозы, чтобы сделать раствор изотоничным крови. При необходимости водные растворы могут быть соответствующим образом забуферены (предпочтительно до pH от 3 до 9). Приготовление подходящих фармацевтических составов в стерильных условиях легко осуществляется стандартными фармацевтическими методиками, хорошо известными специалистам в области медицины.

Фармацевтические или ветеринарные композиции в соответствии с настоящим изобретением в качестве альтернативы могут быть составлены в форме порошка, такого как стерильный порошок, который может представлять собой лиофилизированный порошок.

G. Борьба с HCMV и/или заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV

В одиннадцатом аспекте настоящего изобретения представлен способ борьбы с HCMV или заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV.

В этом контексте термин «борьба» может необязательно включать любую одну или несколько мер из профилактики, вакцинации, снижения риска, предупреждения, лечения, облегчения, замедления или предупреждения прогрессирования, обращения

и/или излечения инфекции HCMV или заболевания или состояния, ассоциированного с инфекцией HCMV.

В одном варианте термин «борьба» может относиться к терапевтическому лечению. Такое терапевтическое лечение может привести к уменьшению тяжести симптомов заболевания и/или увеличению частоты или продолжительности периодов отсутствия симптомов. Количество, достаточное для достижения этого, определяется как «терапевтически эффективное количество».

При профилактических вариантах применения у субъекта способа может еще не проявляться симптомов инфекции HCMV или заболевания или состояния, ассоциированного с инфекцией HCMV, и способ можно использовать для предупреждения или задержки развития симптомов. Количество, достаточное для достижения этого, определяется как «профилактически эффективное количество». Субъект мог быть идентифицирован как имеющий риск развития заболевания или состояния любым подходящим способом.

Способ по одиннадцатому аспекту настоящего изобретения включает введение субъекту или клеточному материалу *ex vivo* или *in vitro* любого одного или нескольких средств, выбранных из группы, состоящей из:

i. связывающей молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения,

ii. функционального фрагмента указанной связывающей молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения,

iii. выделенной связывающей молекулы в соответствии с седьмым аспектом настоящего изобретения,

iv. молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения,

v. вектора в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения,

vi. клетки в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения,

vii. конъюгата в соответствии с восьмым аспектом настоящего изобретения, и

viii. выделенного конъюгата в соответствии с десятым аспектом настоящего изобретения.

Другими словами, в одиннадцатом аспекте настоящего изобретения представлен один или несколько из указанных средств для применения в борьбе с заболеванием или

состоянием, ассоциированным с HCMV, у субъекта или в клеточном материале *ex vivo* или *in vitro*.

Кроме того, в одиннадцатом аспекте настоящего изобретения представлено применение одного или нескольких из указанных средств при производстве лекарственного средства для борьбы с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, у субъекта или в клеточном материале *ex vivo* или *in vitro*.

Субъектом предпочтительно является человек. Однако также следует понимать, что субъект может быть отличным от человека, таким как любое отличное от человека млекопитающее, например, лошадь, собака, свинья, корова, овца, крыса, мышь, морская свинка или примат, например, где отличное от человека животное, представляет собой гуманизированную животную модель, которой трансплантировали человеческие клетки, которые могут быть носителями HCMV.

Субъектом может необязательно быть мужчина, например, человек мужского пола.

Субъектом может необязательно быть женщина, например, человека женского пола.

Субъектом может быть, например, взрослый, подросток, несовершеннолетний, ребенок, младенец, новорожденный, плод или эмбрион; такой как взрослый человек, подросток, подросток, ребенок, младенец, новорожденный, плод человека или эмбрион человека.

Субъектом может быть, например, младенец в возрасте менее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев.

Субъектом может быть, например, человек (например, человек мужского пола и/или человек женского пола) в возрасте по меньшей мере или более 1 года, например, по меньшей мере или старше 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 лет; и необязательно моложе 100, 90, 85, 80, 75, 65, 60, 55, 50, 45 или 40 лет.

Субъектом может быть, например, человек (например, человек мужского пола и/или человек женского пола) в возрасте по меньшей мере или более 20 лет, например, по меньшей мере или старше 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или 80 лет; и необязательно моложе 100, 90 или 85 лет.

Указанный субъект может быть субъектом с фактической (включая положительно диагностированную), подозреваемой или потенциальной инфекцией HCMV. Таким образом, можно определить фактическое наличие у субъекта инфекции HCMV путем

прямого обнаружения вируса HCMV в биологическом образце (например, крови, слюне и/или моче), взятом у указанного субъекта.

Указанный субъект необязательно может быть субъектом, который получал, продолжает получать или впоследствии будет получать одно или несколько других видов лечения инфекции HCMV и/или любого состояния или симптома, ассоциированного с ним. Двумя лекарственными средствами, известными в данной области техники, которые можно использовать для ингибирования прогрессирования инфекции HCMV, являются ганцикловир и фоскарнет. Обычно их вводят внутривенно, и лечение обычно продолжается в течение длительного периода времени. Появилась таблетированная форма ганцикловира, одобренная для лечения инфекций CMV глаз. Кроме того, ганцикловир, доставляемый в виде интравитреального имплантата (например, Vitrasert Implant), доступен как средство, обеспечивающее долговременную доставку лекарственного средства в глаз. Эта система доставки обычно требует незначительной операции на глазу(ах) для имплантации системы доставки. Эта форма доставки обычно длится от 3 до 6 месяцев, прежде чем ее необходимо повторить. У детей с признаками врожденной инфекции CMV при рождении противовирусные лекарственные препараты, в первую очередь валганцикловир, могут улучшить слух и результаты развития. Валганцикловир может иметь серьезные побочные эффекты и изучался только у младенцев с признаками врожденной инфекции CMV. Также использовался внутривенный (человеческий) иммуноглобулин HCMV (CMV IGIV). CMV IGIV представляет собой внутривенный иммуноглобулин, обогащенный антителами против цитомегаловируса (CMV); он одобрен FDA США в качестве профилактической меры (профилактики) против заболеваний CMV, ассоциированных с трансплантацией почек, легких, печени, поджелудочной железы и сердца.

Субъект с подозрением на инфекцию HCMV не обязательно прошел непосредственное тестирование на носитель вируса HCMV, но может иметь один или несколько симптомов инфекции HCMV. Например, симптомы, ассоциированные с инфекцией HCMV (в частности, литической инфекцией HMCV) у здоровых взрослых, могут включать симптомы, сходные с инфекционным мононуклеозом, включая, например, любой один, два, три или все четыре из утомляемости; высокой температуры; больного горла; и/или мышечных болей. Дополнительными симптомами, особенно у индивидуумов со сниженным иммунитетом и/или ослабленным иммунитетом, могут быть проблемы с любым одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или всеми семью из глаз, легких, печени, пищевода, желудка, кишечника и /или головногом мозга.

Симптомами, ассоциированными с HCMV у младенцев с врожденной инфекцией HCMV (в частности, литической инфекцией HMCV), могут быть, например, любые один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или все девять из следующих характеристик: преждевременные роды; низкий вес при рождении; желтая кожа и глаза (желтуха); увеличенная и слабо функционирующая печень; фиолетовые пятна на коже или сыпь, или и то, и другое; аномально маленькая голова (микроэнцефалия); увеличенная селезенка; пневмония; и/или судороги.

HCMV может передаваться от инфицированного человека к неинфицированному многими путями, в том числе через жидкости организма, такие как кровь, слюна, моча, сперма и грудное молоко. Например, передача может произойти в результате прикосновения субъекта к глазам или внутренней части носа или рта после контакта с жидкостями организма инфицированного человека; при половом контакте с инфицированным человеком; при контакте (в том числе употреблении) грудного молока инфицированной матери; при контакте (например, имплантации или трансплантации) биологического материала (трансплантации органов, тканей, костного мозга или стволовых клеток) или при переливании крови инфицированного человека; или во время беременности и/или родов, когда инфицированная мать может передать вирус своему ребенку до или во время родов. Субъект с потенциальной инфекцией HCMV может не проходить непосредственное тестирование на носитель вируса HCMV и/или может не иметь одного или нескольких симптомов инфекции HCMV, но, тем не менее, может иметь анамнез (например, в течение предыдущих 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2 или 1 года, предыдущих 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 месяца или недавнего анамнеза, например, в течение предыдущих 4, 3, 2 или 1 недели или в течение предыдущих 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 дня), что подвергает их риску заражения HCMV от одного или нескольких инфицированных индивидуумов, например, любым одним или несколькими путями, определенными выше, и поэтому может быть охарактеризован как субъект с потенциальной инфекцией HCMV в соответствии с настоящим изобретением.

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, с которым необходимо бороться в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может представлять собой инфекцию HCMV или быть ассоциировано с инфекцией HCMV. Инфицированные HMCV различные виды рака представляют особый интерес для настоящего изобретения, как обсуждается далее ниже, хотя инфекции HCMV в любом контексте и любые заболевания или состояния, ассоциированные с инфекцией HCMV,

представляют интерес, с которыми необходимо бороться в соответствии с настоящим изобретением.

Необязательно заболевание, нарушение или состояние, с которым необходимо бороться, в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может быть связано с экспрессией US28, включая, в частности, поверхностную экспрессию US28 и воздействие ECD3 US28 на поверхности клетки. Оно может включать, например, любое заболевание или состояние, ассоциированное с клетками, которые экспрессируют US28. Например, клетки могут быть нежелательными клетками. Нежелательными клетками могут быть любые клетки, присутствие которых в хозяине нежелательно. Соответственно, заболевание или состояние, ассоциированное с экспрессией US28, может представлять собой любое состояние, характеризующееся наличием клеток, которые экспрессируют US28 и которые являются нежелательными, например, любое биологическое или медицинское состояние или нарушение, при котором по меньшей мере часть патологии опосредована наличием таких нежелательных клеток, экспрессирующих US28. Состояние может быть вызвано присутствием нежелательных клеток или же присутствие нежелательных клеток может быть следствием состояния.

Под экспрессией US28 подразумевают, что белок US28 можно обнаружить на клетке или в ней, или в экстрактах, полученных из клеток, или об экспрессии полипептида можно судить путем обнаружения US28-кодирующей мРНК. Для подтверждения экспрессии US28 на клетке или внутри нее, можно провести различные анализы. Такие анализы включают, например, биохимические анализы, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как обнаружение присутствия конкретного белка (т.е. US28) с помощью иммунологических средств (ELISA и вестерн-блоттинг), или молекулярно-биологические анализы, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как нозерн-блоттинг, RT-PCR и ПЦР для обнаружения присутствия мРНК US28. Однако, как описано дополнительно в данном документе, обнаружение US28 может быть осложнено различиями на уровне аминокислот между различными штаммами HCMV и/или полиморфизмом на генетическом уровне, а некоторые способы могут быть чувствительными и/или позволять обнаруживать экспрессию белка US28 из ограниченного числа штаммов HCMV. Это может приводить к невозможности обнаружения инфекций HCMV, вызванных другими штаммами. Может быть предпочтительным, чтобы экспрессию US28 определяли с использованием агностического в отношении штамма подхода. Связывающие молекулы по настоящему изобретению могут обеспечивать агностическое в отношении штамма связывание с

ECD3 US28 и могут быть особенно предпочтительным подходом для оценки экспрессии US28 на или в одной или нескольких клетках или в экстрактах, полученных из клеток субъекта.

Необязательно, инфекция HCMV может протекать бессимптомно и/или не диагностироваться. Необязательно инфекция HCMV может представлять собой латентную инфекцию, например, она может характеризоваться низким уровнем или отсутствием репликации вируса, при этом вирусный геном находится преимущественно в популяции $CD34^+$ гемопоэтических клеток-предшественников, находящихся в костном мозге.

Субъект, у которого необходимо бороться с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, может быть пациентом с ослабленным иммунитетом, например, пациентом, у которого первичная инфекция HCMV, реинфекция или реактивация могут вызвать заболевание, такое как опасное для жизни заболевание, которое влияет на один или несколько органов. Человек с ослабленным иммунитетом может, например, характеризоваться наличием одного или нескольких серьезных проблем, которые затрагивают любые один, два, три, четыре, пять, шесть или все семь его органов: глаза, легкие, печень, пищевод, желудок, кишечник и/или головной мозг. Субъектом с ослабленным иммунитетом может, например, быть человек, которому является, являлся или намереваются стать реципиентом трансплантата биологического материала, такого как трансплантат органа, стволовой клетки или костного мозга; в качестве дополнения или в качестве альтернативы в одном варианте биологический материал, подлежащий трансплантации, может представлять собой клеточный материал *ex vivo* или *in vitro*, который подлежит обработке в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения.

HCMV является одной из наиболее распространенных врожденных вирусных инфекций и наиболее важной причиной врожденных дефектов. Младенцы также могут заразиться во время рождения или вскоре после него (перинатальный HCMV); в эту группу входят дети, инфицированные через грудное молоко. Соответственно, состояние, ассоциированное с HCMV, может представлять собой врожденную инфекцию HCMV или врожденный ассоциированный HCMV врожденный дефект или может представлять собой перинатальную инфекцию HCMV или перинатальное ассоциированное с HCMV заболевание или состояние. Врожденные инфекции HCMV у младенцев могут, например, характеризоваться состояниями, которые проявляют любую одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или все девять из следующих характеристик:

преждевременные роды; низкий вес при рождении; желтая кожа и глаза (желтуха); увеличенная и слабо функционирующая печень; фиолетовые пятна на коже или сыпь, или и то, и другое; аномально маленькая голова (микроэнцефалия); увеличенная селезенка; пневмония; и/или судороги; в любом случае прямое обнаружение инфекции HCMV у указанных детей может быть использовано для подтверждения врожденной инфекции.

Субъектом может быть, например, младенец. Указанный младенец может быть новорожденным, рожденным от матери с фактической (включая положительно диагностированную), подозреваемой или потенциальной инфекцией HCMV. Указанный младенец может быть младенцем, у которого один из родителей (в частности, мать) имеет фактическую (включая положительно диагностированную), подозреваемую или потенциальную инфекцию HCMV. Указанный младенец может быть младенцем, которого кормит грудью мать с фактической (включая положительно диагностированную), подозреваемой или потенциальной инфекцией HCMV. Субъектом может быть плод или эмбрион, вынашиваемый матерью, у которой имеется фактическая (в том числе положительно диагностированная), подозреваемая или потенциальная инфекция HCMV. Субъектом может быть мать, беременная женщина или будущая мать с фактической (включая положительно диагностированную), подозреваемой или потенциальной инфекцией HCMV. Субъектом может быть кормящая мать с фактической (в том числе положительно диагностированной), подозреваемой или потенциальной инфекцией HCMV. Субъектом может быть женщина, у которой до зачатия была фактическая (в том числе положительно диагностированная), подозреваемая или потенциальная инфекция HCMV.

Состоянием, ассоциированным с HCMV, может быть, например, сердечно-сосудистое заболевание, такое как атеросклероз, или аутоиммунное заболевание.

Серостатус HCMV может дополнительно влиять на клиническое течение ожогов, травм, сепсиса и инфекции такими патогенами, как бактерии и/или вирусы, отличные от HCMV; и субъект, у которого необходимо бороться с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, может быть субъектом, страдающим от ожога, травмы, сепсиса и/или патогенной инфекции (например, бактериальной инфекции или инфекции вирусом, отличным от HCMV), и/или указанное заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, может включать любое одно или несколько из ожогов, травм, сепсиса и/или патогенной инфекции (например, бактериальной инфекции или инфекции вирусом, отличным от HCMV). Состояние, ассоциированное с HCMV, особенно у

индивидуумов со слабым иммунитетом и/или ослабленным иммунитетом, может представлять собой, например, одно или несколько из следующего: потеря зрения вследствие воспаления светочувствительного слоя глаза (ретинит); проблемы пищеварительной системы, включая воспаление толстой кишки (колит), пищевода (эзофагит) и/или печени (гепатит); проблемы нервной системы, включая воспаление головного мозга (энцефалит); и/или пневмонию.

Состояниями, ассоциированными с HCMV, у детей с врожденной инфекцией HCMV может быть, например, одно или несколько из следующего: потеря слуха, умственная отсталость, проблемы со зрением, судороги, отсутствие координации, слабость и/или проблемы с использованием мышц.

В одном варианте осуществления инфекция HCMV может представлять собой инфекцию одного штамма.

В альтернативном варианте осуществления инфекция HCMV включает мультиштаммовую инфекцию HCMV, где мультиштаммовая инфекция HCMV включает инфицирование более чем одним различным штаммом HCMV, например, двумя или более различными штаммами HCMV. Такие мультиштаммовые инфекции являются обычным явлением, и следует понимать, что средство, способное воздействовать только на некоторые, но не на все штаммы HCMV при мультиштаммовой инфекции, может подвергаться риску создания селективного давления, которое может стимулировать нецелевой(ые) штамм(ы) при мультиштаммовой инфекции HCMV путем ингибирования или удаления одного или нескольких конкурирующих штаммов HCMV, на которые нацелено указанное средство. Соответственно, в случае выбора подхода к борьбе с реальными, предполагаемыми или потенциальными мультиштаммовыми инфекциями HCMV, особенно предпочтительно использовать средство лечения, которое обеспечивает агностический в отношении штамма эффект. Таким образом, применение агностического в отношении штамма средства в соответствии с настоящим изобретением может быть использовано для предупреждения создания у пролеченного субъекта условий, которые избирательно способствуют развитию инфекции одним или несколькими штаммами HCMV, присутствующими при мультиштаммовой инфекции HCMV, поскольку все штаммы HCMV при мультиштаммовой инфекции HCMV являются мишенью агностического в отношении штамма средства.

Необязательно, два или более различных штамма HCMV при мультиштаммовой инфекции кодируют разные последовательности, которые кодируют белок US28. Указанные два или более штамма могут кодировать белки US28, которые различаются в

одной или нескольких внеклеточных областях, таких как N-концевая область (ECD1), первая область внеклеточной петли (ECD2), вторая область внеклеточной петли (ECD3), и/или третья область внеклеточной петли (ECD4). В одном варианте осуществления, представляющем интерес, каждый из двух или более штаммов HCMV при мультиштаммовой инфекции HCMV кодирует белок US28, который отличается от другого по меньшей мере в одном или нескольких положениях N-концевой (ECD1) области; например, они могут различаться в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 или более аминокислотных положениях в N-концевой (ECD1) области. В качестве дополнения или в качестве альтернативы в другом варианте осуществления, представляющем интерес, каждый из двух или более штаммов HCMV при мультиштаммовой инфекции HCMV кодирует белок US28, который отличается от другого в одном или нескольких положениях области второй внеклеточной петли (ECD3), например, один или несколько штаммов HCMV при инфекции, состоящей из нескольких штаммов HCMV, могут кодировать белок US28, который кодирует 4N-вариант ECD3, а один или несколько других штаммов HCMV при инфекции, состоящей из нескольких штаммов HCMV, могут кодировать белок US28, который кодирует 4D-вариант ECD3. Например, два или более штамма HCMV, которые кодируют различные последовательности, которые кодируют белок US28, могут быть выбраны из любых двух или более штаммов DB HCMV (номер доступа KT959235), штамма Toledo HCMV (номер доступа GU937742), штамма Towne HCMV (номер доступа FJ616285), штамма VR1814 HCMV (номер доступа GU179289), штамма TB40/E HCMV (номер доступа KF297339), штамма Merlin HCMV (номер доступа AY446894), штамма JP HCMV (номер доступа GQ221975), штамма Ad169 HCMV (номер доступа X17403.1), штамма AF1 HCMV (номер доступа GU179291.1), штамма VHL/E HCMV (номер доступа L20501.1), штамма BL HCMV (номер доступа MW980585), штамма DAVIS (номер доступа JX512198.1), штамма TR HCMV (номер доступа KF021605.1).

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, с которым необходимо бороться в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может представлять собой латентную инфекцию HCMV (например, одноштаммовую или мультиштаммовую латентную инфекцию HCMV) или быть ассоциировано с латентной инфекцией HCMV (необязательно мультиштаммовой латентной инфекцией HCMV).

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, с которым необходимо бороться в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может представлять собой литическую инфекцию HCMV (необязательно мультиштаммовую

литическую инфекцию HCMV) или быть ассоциировано с литической инфекцией HCMV (необязательно мультиштаммовой литической инфекцией HCMV).

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, с которым необходимо бороться в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может представлять собой врожденную инфекцию HCMV (например, одноштаммовую или мультиштаммовую инфекцию), такую как латентная врожденная одноштаммовая или мультиштаммовая инфекция HCMV или литическая врожденная одноштаммовая или мультиштаммовая инфекция HCMV.

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, с которым необходимо бороться в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может представлять собой рак, например инфицированный HCMV рак (необязательно одноштаммовый или мультиштаммовый инфицированный HCMV рак), такой как латентный инфицированный HCMV рак (необязательно одноштаммовый или мультиштаммовый латентный инфицированный HCMV рак).

Рак необязательно может находиться в участке первичной, вторичной или любой другой опухоли в организме субъекта.

Опухолям часто присваивают степень и стадию. Стадия солидной опухоли относится к ее размеру или распространению, а также к тому, распространилась ли она на другие органы и ткани. Степень опухоли (степень рака) является показателем того, насколько быстро она будет расти и распространяться.

Например, рак может находиться на стадии 0, стадии I, стадии II, стадии III или стадии IV или подразделении любой из них или нескольких из них. Характеристики этих различных стадий и их подразделений хорошо известны в данной области техники. Однако в общих чертах: стадия 0 указывает на то, что рак находится там, где он начался (*in situ*), и не распространился. Стадия I указывает на то, что рак имеет незначительную степень и больше никуда не распространился. Стадия II указывает на то, что рак характеризовался ростом, но не распространился. Стадия III указывает на то, что рак имеет большие размеры и может распространиться на окружающие ткани и/или лимфатические узлы (часть лимфатической системы). Стадия IV указывает на то, что рак распространился с того места, где он начался, по меньшей мере, на один другой орган; также известный как «вторичный» или «метастатический» рак.

В одном варианте осуществления рак может представлять собой стадию рака, классифицированную системой стадирования TNM. Эта система была разработана и поддерживается AJCC и Международным союзом по борьбе с раком (UICC). Это

наиболее часто используемая система стадирования медицинскими работниками во всем мире. Система классификации TNM была разработана как инструмент, позволяющий врачам определять стадии различных типов рака на основе определенных стандартизированных критериев. Система стадирования TNM основана на распространении опухоли (T), степени распространения на лимфатические узлы (N) и наличии метастазов (M).

- Категория T описывает исходную (первичную) опухоль. TX относится к первичной опухоли, которую невозможно оценить. T0 означает отсутствие признаков первичной опухоли. Это относится к карциноме *in situ* (раннему раку, который не распространился на соседние ткани). T1, T2, T3 и T4 относятся к размеру и/или распространенности первичной опухоли.
- Категория N описывает, достиг ли рак близлежащих лимфатических узлов. NX указывает на то, что регионарные лимфатические узлы не могут быть оценены. N0 указывает на отсутствие поражения регионарных лимфатических узлов (рак в лимфатических узлах не обнаружен). N1, N2 и N3 указывают на поражение регионарных лимфатических узлов (количество и/или степень распространения).
- Категория M говорит о наличии отдаленных метастазов (распространение рака на другие части тела). M0 указывает на отсутствие отдаленных метастазов (рак не распространился на другие части тела). M1 указывает на отдаленные метастазы (рак распространился на отдаленные части тела).

Поскольку каждый тип рака имеет свою собственную систему классификации, буквы и цифры не всегда означают одно и то же для каждого вида рака. После определения T, N и M они объединяются, и можно присвоить общую стадию 0, I, II, III, IV. Иногда эти стадии также подразделяются с использованием таких букв, как IIIA и IIIB. Дополнительные рекомендации можно найти на https://cancerstaging.org.

При некоторых типах рака для определения анатомической стадии/прогностической группы могут учитываться неанатомические факторы. Они четко определены в каждой главе Руководства AJCC по стадированию рака (например, показатель Глисона при исследовании предстательной железы). Эти факторы собираются отдельно от T, N и M, которые остаются чисто анатомическими и используются для определения групп стадий. Если в группах используются неанатомические факторы, существует определение группировок, предусмотренное для

случаев, когда неанатомический фактор недоступен (X) или когда желательно назначить группу, игнорирующую неанатомический фактор.

Различные виды рака I стадии наименее распространен и часто имеет лучший прогноз. Рак на более высоких стадиях часто протекает на более поздних стадиях, но во многих случаях его все же можно успешно лечить.

В дополнительном и/или альтернативном варианте рак может иметь определенную степень. Классификация обычно основана на дифференциации клеток (степень сходства с нормальными клетками). Указанная степень рака может, например, представлять собой рак I степени, II степени, III или IV степени или комбинацию двух или трех категорий. Характеристики этих различных степеней хорошо известны в данной области техники. Однако в общих чертах: рак I степени представляет собой тип рака, при котором клетки напоминают нормальные клетки и не растут быстро; рак II степени представляет собой тип рака, при котором раковые клетки не похожи на нормальные клетки и растут быстрее, чем нормальные клетки; а степени III и IV представляют собой тип рака, при котором раковые клетки выглядят ненормально и могут расти или распространяться более агрессивно. Характеристики роста можно, например, оценить при некоторых видах рака на основе частоты деления клеток.

Рак может, например, представлять собой тип рака, выбранный из группы, состоящей из карциномы, саркомы, миеломы, лейкоза, лимфомы и смешанного типа рака.

Карцинома относится к злокачественному новообразованию эпителиального происхождения или раку внутренней или внешней оболочки тела. Карциномы, злокачественные новообразования эпителиальной ткани, составляют от 80 до 90 процентов всех случаев рака. Эпителиальная ткань встречается по всему телу. Она присутствует в коже, а также в покровах и слизистой оболочке органов и внутренних проходов, таких как желудочно-кишечный тракт, как обсуждалось выше.

Карциномы можно разделить на два основных подтипа: аденокарциному, которая развивается в железистом органе, и плоскоклеточную карциному, которая возникает в плоском эпителии.

Аденокарциномы обычно возникают в слизистых оболочках и сначала проявляются в виде утолщенной белой слизистой оболочки, напоминающей бляшки. Они часто легко распространяются через мягкие ткани, где возникают. Плоскоклеточный рак встречается во многих областях тела.

Большинство карцином поражают органы или железы, способные к секреции, например, молочные железы, вырабатывающие молоко, легкие, выделяющие слизь, толстую кишку, предстательную железу или мочевой пузырь.

В одном варианте осуществления карцинома может представлять собой рак, возникающий из эпителиальных клеток, выбранных из рака молочной железы, базальноклеточной карциномы, аденокарциномы, рака желудочно-кишечного тракта, рака губы, рака ротовой полости, рака пищевода, рака тонкой кишки и рака желудка, рака толстой кишки, рак печени, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака легких и рака кожи, такого как плоскоклеточный и базальноклеточный рак, рака предстательной железы, почечно-клеточного рака и других известных видов рака, поражающих эпителиальные клетки по всему организму.

Саркома относится к раку, который возникает в поддерживающих и соединительных тканях, таких как кости, сухожилия, хрящи, мышцы и жир. Чаще всего саркома возникает у молодых людей и часто развивается в виде болезненного образования на кости. Саркомы обычно напоминают ткань, в которой они растут.

Примерами сарком являются: остеосаркома или остеогенная саркома (кости), хондросаркома (хрящ), лейомиосаркома (гладкие мышцы), рабдомиосаркома (скелетные мышцы), мезотелиальная саркома или мезотелиома (мембранная оболочка полостей тела), фибросаркома (фиброзная ткань), ангиосаркома или гемангиоэндотелиома (кровеносные сосуды), липосаркома (жировая ткань), глиома или астроцитома (нейрогенная соединительная ткань головного мозга), миксосаркома (примитивная эмбриональная соединительная ткань), мезенхимная или смешанная мезодермальная опухоль (смешанные типы соединительной ткани).

Миелома представляет собой рак, который возникает в плазматических клетках костного мозга. Плазматические клетки продуцируют некоторые белки, содержащиеся в крови.

Рак может представлять собой солидный рак или гемобластоз.

Например, лейкозы («гемобластозы» или «виды рака крови») представляют собой рак костного мозга (участок продуцирования клеток крови). Заболевание часто ассоциировано с перепродуцированием незрелых лейкоцитов. Эти незрелые лейкоциты не функционируют так, как должны, поэтому пациент часто склонен к инфекции. Лейкоз также влияет на эритроциты и может вызвать недостаточную свертываемость крови и усталость вследствие анемии. Примеры лейкоза включают:

- Миелогенный или гранулоцитарный лейкоз (злокачественное поражение миелоидной и гранулоцитарной серии лейкоцитов)
- Лимфатический, лимфоцитарный или лимфобластный лейкоз (злокачественное поражение лимфоидной и лимфоцитарной серии клеток крови)
- Истинная полицитемия или эритремия (злокачественное поражение различных продуктов клеток крови, но с преобладанием эритроцитов)

Лимфомы развиваются в железах или узлах лимфатической системы, сети сосудов, узлов и органов (в частности, селезенки, миндалин и тимуса), которые очищают жидкости организма и производят борющиеся с инфекциями лейкоциты или лимфоциты. В отличие от лейкозов, которые иногда называют «гемобластозами», лимфомы являются «солидными видами рака». Лимфомы также могут возникать в определенных органах, таких как желудок, молочная железа или головной мозг. Эти лимфомы называются внеузловыми лимфомами. Лимфомы подразделяются на две категории: лимфома Ходжкина и неходжкинская лимфома. Наличие клеток Рида-Штернберга в лимфоме Ходжкина диагностически отличает лимфому Ходжкина от неходжкинской лимфомы.

Смешанные типы рака могут включать раковые заболевания, в которых типовые компоненты относятся к одной категории или относятся к разным категориям рака. Некоторые примеры: аденосквамозная карцинома; смешанная мезодермальная опухоль; карциносаркома; и тератокарцинома.

Необязательно, рак может представлять собой первичный рак или метастатический рак. Первичный рак относится к раковым клеткам в первичной опухоли, которая представляет собой опухоль, появляющуюся на первом участке у субъекта и которую можно отличить от метастатической опухоли, которая появляется в организме субъекта на участке, удаленном от первичной опухоли. Метастатический рак возникает в результате метастазирования, что означает состояние распространения рака из органа-источника на дополнительные дистальные участки у пациента.

Например, тип рака необязательно может быть выбран из любого одного или нескольких из следующего перечня:

- Острый лимфобластный лейкоз (ALL),
- Острый миелоидный лейкоз (AML),
- Рак у подростков (например, у подростков в возрасте 12–18 лет),
- Адренокортикальная карцинома, также включая, например:
    - Адренокортикальная карцинома у детей
- Виды рака, связанные со СПИДом, включая, например:

    - Саркома Капоши (саркома мягких тканей)
    - Лимфома, связанная со СПИДом (лимфома)
    - Первичная лимфома ЦНС (лимфома)
- Анальный рак
- Рак аппендикса
- Астроцитомы у детей (рак головного мозга)
- Атипичная тератоидная/рабдоидная опухоль, детский возраст, центральная нервная система (рак головного мозга)
- Базальноклеточная карцинома кожи
- Рак желчных протоков
- Рак мочевого пузыря, также включая, например:
    - Рак мочевого пузыря у детей
- Рак костей (например, саркома Юинга, остеосаркома или злокачественная фиброзная гистиоцитома)
- Опухоли головного мозга (включая, например, глиому или глиобластому)
- Рак молочной железы, также включая, например:
    - Рак молочной железы у детей
- Бронхиальные опухоли у детей
- Лимфома Беркитта
- Карциноидная опухоль (желудочно-кишечная), также включая, например:
    - Карциноидные опухоли у детей
- Карцинома неизвестной первичной формы, также включая, например:
    - Карцинома неизвестного происхождения у детей
- Опухоли сердца у детей (сердца)
- Центральная нервная система, также включая, например:
    - Атипичная тератоидная/рабдоидная опухоль у детей (рак головного мозга)
    - Эмбриональные опухоли у детей (рак головного мозга)
    - Герминогенная опухоль у детей (рак головного мозга)
    - Первичная лимфома ЦНС
- Рак шейки матки, также включая, например:
    - Рак шейки матки у детей
- Различные виды рака у детей (например, у ребенка в возрасте до 18 лет, предпочтительно в возрасте до 16, 14 или 12 лет, например, в возрасте от 1 до 12 лет),

- Необычные виды рака у детей,
- Холангиокарцинома
- Хордома у детей,
- Хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL)
- Хронический миелогенный лейкоз (CML)
- Хронические миелопролиферативные новообразования
- Колоректальный рак, также включая, например:
    - Колоректальный рак у детей
- Краниофарингиомы у детей (рак головного мозга)
- Кожная Т-клеточная лимфома
- Протоковая карцинома *in situ* (DCIS)
- Эмбриональные опухоли, центральная нервная система, детский возраст (рак головного мозга)
- Рак эндометрия (рак матки)
- Эпендимома у детей (рак головного мозга)
- Рак пищевода, также включая, например:
    - Рак пищевода у детей
- Эстезионейробластома (рак головы и шеи)
- Саркома Юинга (рак кости)
- Экстракраниальная герминогенная опухоль у детей,
- Внегонадная герминогенная опухоль
- Рак глаз, также включая, например:
    - Внутриглазная меланома у детей
    - Внутриглазная меланома
    - Ретинобластома
- Рак фаллопиевых труб
- Фиброзная костная гистиоцитома, злокачественная и остеосаркома
- Рак желчного пузыря
- Рак желудка (желудочный), также включая, например:
    - Рак желудка у детей (желудочный)
- Карциноидная опухоль желудочно-кишечного тракта
- Желудочно-кишечные стромальные опухоли (GIST) (саркома мягких тканей), также включая, например:
    - Стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта у детей

- Герминогенные опухоли, также включая, например:
    - Герминогенные опухоли центральной нервной системы у детей (рак головного мозга)
    - Экстракраниальные герминогенные опухоли у детей
    - Внегонадные герминогенные опухоли
    - Герминогенные опухоли яичников
    - Рак яичка
- Гестационная трофобластическая болезнь
- Волосатоклеточный лейкоз
- Рак головы и шеи
- Опухоли сердца у детей
- Гепатоцеллюлярный рак (печени)
- Гистиоцитоз, клетки Лангерганса
- Лимфома Ходжкина
- Рак гортаноглотки (рак головы и шеи)
- Внутриглазная меланома, также включая, например:
    - Внутриглазная меланома у детей
- Опухоли островковых клеток, нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы
- Саркома Капоши (саркома мягких тканей)
- Рак почки (почечно-клеточный)
- Гистиоцитоз клеток Лангерганса
- Рак гортани (рак головы и шеи)
- Лейкоз
- Рак губы и полости рта (рак головы и шеи)
- Рак печени
- Рак легких (немелкоклеточный и мелкоклеточный), также включая, например:
    - Рак легких у детей
- Лимфома
- Рак молочной железы у мужчин
- Злокачественная фиброзная костная гистиоцитома и остеосаркома
- Меланома, также включая, например:
    - Меланома у детей
- Внутриглазная (глазная) меланома, также включая, например:

  - Внутриглазная меланома у детей
- Карцинома клеток Меркеля (рак кожи)
- Злокачественная мезотелиома, также включая, например:
  - Детская мезотелиома
- Метастатический рак
- Метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытым первичным раком (рак головы и шеи)
- Карцинома срединного тракта с изменениями гена *NUT*
- Рак полости рта (рак головы и шеи)
- Синдромы множественных эндокринных неоплазий
- Множественная миелома/новообразования плазматических клеток
- Грибовидный микоз (лимфома)
- Миелодиспластические синдромы, миелодиспластические/миелопролиферативные новообразования
- Хронический миелогенный лейкоз (CML)
- Острый миелоидный лейкоз (AML)
- Хронические миелопролиферативные новообразования
- Рак полости носа и околоносовых пазух (рак головы и шеи)
- Рак носоглотки (рак головы и шеи)
- Нейробластома
- Неходжкинская лимфома
- Немелкоклеточный рак легких
- Рак полости рта, рак губы и полости рта и рак ротоглотки (рак головы и шеи)
- Остеосаркома и злокачественная фиброзная гистиоцитома кости
- Рак яичников, также включая, например:
  - Рак яичников у детей
- Рак поджелудочной железы, также включая, например:
  - Рак поджелудочной железы у детей
- Нейроэндокринные опухоли поджелудочной железы (опухоли островковых клеток)
- Папилломатоз (гортань у детей)
- Параганглиома, также включая, например:
  - Параганглиома у детей
- Рак околоносовых пазух и полости носа (рак головы и шеи)

- Рак паращитовидной железы
- Рак полового члена
- Рак глотки (рак головы и шеи)
- Феохромоцитома, также включая, например:
    - Феохромоцитома у детей
- Опухоль гипофиза
- Плазмоклеточное новообразование/множественная миелома
- Плевролегочная бластома
- Беременность и рак молочной железы (т.е. рак молочной железы у беременной женщины)
- Первичная лимфома центральной нервной системы (ЦНС)
- Первичный рак брюшины
- Рак предстательной железы
- Рак прямой кишки
- Рецидивирующий рак
- Почечно-клеточный рак (почки)
- Ретинобластома
- Рабдомиосаркома у детей (саркома мягких тканей)
- Рак слюнной железы (рак головы и шеи)
- Саркома, также включая, например:
    - Рабдомиосаркома у детей (саркома мягких тканей)
    - Сосудистые опухоли у детей (саркома мягких тканей)
    - Саркома Юинга (рак кости)
    - Саркома Капоши (саркома мягких тканей)
    - Остеосаркома (рак кости)
    - Саркома мягких тканей
    - Саркома матки
- Синдром Сезари (лимфома)
- Рак кожи, также включая, например:
    - Рак кожи у детей
- Мелкоклеточный рак легких
- Рак тонкой кишки
- Саркома мягких тканей
- Плоскоклеточный рак кожи

- Метастатический плоскоклеточный рак шеи со скрытым первичным раком (рак головы и шеи)
- Рак желудка (желудочный), включая, например:
    - Рак желудка (желудочный) у детей
- Кожная Т-клеточная лимфома
- Рак яичек, также включая, например:
    - Рак яичек у детей
- Рак горла (рак головы и шеи), также включая, например:
    - Рак носоглотки
    - Рак ротоглотки
    - Рак гортаноглотки
- Тимома и карцинома тимуса
- Рак щитовидной железы
- Переходноклеточный рак почечной лоханки и мочеточника (рак почки (почечноклеточный))
- Карцинома неизвестной первичной формы, также включая, например:
    - Рак неизвестного происхождения у детей
- Необычные виды рака у детей
- Мочеточник и почечная лоханка, переходноклеточный рак (рак почки (почечноклеточный)
- Рак уретры
- Рак эндометрия матки
- Саркома матки
- Рак влагалища, также включая, например:
    - Рак влагалища у детей
- Сосудистые опухоли (саркома мягких тканей)
- Рак вульвы
- Опухоль Вильмса и другие опухоли почек у детей
- Рак у молодых людей (например, у молодых людей в возрасте 16–30 лет, например, 18–30 лет; необязательно менее 28, 26, 24, 22 или 20 лет)

Более конкретно, тип рака необязательно может быть выбран из любого одного или нескольких из следующего перечня:

Рак кожи. Существует три основных типа рака кожи: базальноклеточный, плоскоклеточный и меланома. Эти виды рака происходят из одноименных слоев

эпидермиса. Меланомы происходят из меланоцитов или пигментных клеток на самом глубоком уровне эпидермиса. Базальноклеточный и плоскоклеточный рак обычно возникает на участках тела, подвергающихся воздействию солнца, таких как лицо, уши и конечности.

Рак легких Рак легких очень трудно обнаружить на ранней стадии, поскольку симптомы часто не проявляются до тех пор, пока заболевание не прогрессирует. Симптомы включают постоянный кашель, мокроту с прожилками крови, боль в груди и повторяющиеся приступы пневмонии или бронхита.

Рак молочной железы у женщин или мужчин По оценкам, в США приблизительно у 1 из 8 женщин в конечном итоге в течение жизни развивается рак молочной железы. Большинство случаев рака молочной железы представляют собой протоковые карциномы. Чаще всего заболеванию подвержены женщины старше 50 лет; те, у кого уже был рак одной молочной железы; те, чья мать или сестра болели раком молочной железы; те, у кого никогда не было детей; и те, у кого первый ребенок родился после 30 лет. Другие факторы риска включают ожирение, диету с высоким содержанием жиров, раннее менархе (возрастные менструации начинаются) и позднюю менопаузу (возрастные менструации прекращаются).

Рак предстательной железы Рак предстательной железы встречается в основном у пожилых мужчин. С возрастом у мужчин предстательная железа может увеличиваться и блокировать уретру или мочевой пузырь. Это может вызвать затруднение мочеиспускания или нарушение сексуальных функций. Это состояние называется доброкачественной гипертрофией предстательной железы (BPH). Хотя BPH не является раковой опухолью, для ее коррекции может потребоваться хирургическое вмешательство. Симптомы BPH или других проблем с предстательной железой могут быть похожи на симптомы рака предстательной железы.

Рак толстой и/или прямой кишки Колоректальный рак (CRC) представляет собой заболевание, которое обычно возникает из эпителиальных клеток, выстилающих толстую или прямую кишку желудочно-кишечного тракта. Из раковых заболеваний, поражающих толстую кишку, приблизительно 70 процентов встречается в толстой кишке и приблизительно 30 процентов в прямой кишке. Эти виды рака являются третьими наиболее распространенными видами рака в целом. Симптомы включают кровь в кале, которую можно проверить с помощью простого анализа кала на скрытую кровь, или изменение режима работы кишечника, например, сильный запор или диарея.

Рак матки (тела матки) Матка представляет собой мешок в тазу женщины, который позволяет ребенку развиваться из оплодотворенной яйцеклетки и защищает его до рождения. Рак матки является наиболее распространенным злокачественным гинекологическим заболеванием. Этот рак встречается нечасто у женщин в возрасте до 40 лет. Чаще всего это происходит после 60 лет. Симптомом обычно является аномальное маточное кровотечение. Для подтверждения диагноза часто проводят биопсию эндометрия или D&C.

Помимо типов рака, названных по первичному очагу, обсуждавшемуся выше, существует множество других примеров, таких как рак головного мозга, рак яичек, рак мочевого пузыря и так далее.

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, с которым необходимо бороться в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может, в частности, представлять собой эпителиальный рак; необязательно при этом эпителиальный рак представляет собой рак молочной железы; например, при этом рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы (TNBC) или HER2-положительный рак молочной железы (как описано в данном документе). Указанные формы эпителиального рака необязательно могут представлять собой одноштаммовую или мультиштаммовую форму инфицированного HCMV эпителиального рака, например, латентную инфицированную HCMV форму эпителиального рака (необязательно одноштаммовый или мультиштаммовый латентный инфицированный HCMV рак).

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, с которым необходимо бороться в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может представлять собой метастазирующую и/или агрессивную форму рака. Указанные формы метастазирующего и/или агрессивного рака могут необязательно представлять собой одноштаммовую или мультиштаммовую инфицированную HCMV форму метастазирующего и/или агрессивного рака, например, латентную инфицированную HCMV форму метастазирующего и/или агрессивного рака (необязательно одноштаммового или мультиштаммового латентного инфицированного HCMV рака).

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, с которым необходимо бороться в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может представлять собой глиобластому. В другом варианте осуществления, описанном в данном документе, заболевание или состояние не является глиобластомой и/или у субъекта, подлежащего

лечению, не имеет глиобластомы и/или у него не было диагностировано наличие глиобластомы.

В некоторых вариантах осуществления субъект (или клеточный материал *ex vivo* или *in vitro*), подлежащий лечению в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может иметь и/или был диагностирован как имеющий или обладающий инфицированными HCMV раковыми клетками, такими как латентные инфицированные HCMV раковые клетки.

В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может быть или предположительно может быть реципиентом клеточного материала, например, донирования клеточного продукта. Указанный клеточный продукт может, например, содержать, состоять по сути или состоять из живого клеточного материала *ex vivo*, выбранного из группы, которая включает: один или несколько типов клеток *ex vivo*; один или несколько типов клеточных культур *ex vivo*; один или несколько типов тканей *ex vivo*; один или несколько типов культур тканей *ex vivo*; один или несколько типов органов *ex vivo*; и/или один или несколько типов культур органов *ex vivo*. Необязательно, клеточный продукт может быть получен прямо или опосредованно от живого донора.

В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может быть или предположительно может быть донором клеточного материала, например, донором клеточного продукта. Указанный клеточный продукт может включать, состоять из любой одной или нескольких клеток, ткани или органа от указанного донора.

В некоторых вариантах осуществления клеточный материал *ex vivo* или *in vitro*, подлежащий обработке в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, может представлять собой клеточный продукт *ex vivo*. Указанный клеточный продукт *ex vivo* может, например, содержать, состоять по сути или состоять из живого клеточного материала *ex vivo*, выбранного из группы, которая включает: один или несколько типов клеток *ex vivo*; один или несколько типов клеточных культур *ex vivo*; один или несколько типов тканей *ex vivo*; один или несколько типов культур тканей *ex vivo*; один или несколько типов органов *ex vivo*; и/или один или несколько типов культур органов *ex vivo*. Необязательно, клеточный продукт может быть получен прямо или опосредованно от живого донора.

В одном варианте осуществления один или несколько средств, подлежащих применению в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, могут,

например, быть (или включать одно или несколько средств) выбраны из группы, состоящей из:

i. терапевтического антитела, как определено первым аспектом настоящего изобретения,
ii. функционального фрагмента указанного терапевтического антитела, как определено первым аспектом настоящего изобретения,
iii. терапевтического антитела, которое содержит слитую полипептидную последовательность, как определено первым аспектом настоящего изобретения; и
iv. функционального фрагмента указанного терапевтического антитела, который содержит последовательность слитого полипептида, как определено первым аспектом настоящего изобретения.

Например, одно или несколько средств, применяемых в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, могут представлять собой (или включать одно или несколько средств, выбранных из) биспецифическое антитело, как определено первым аспектом настоящего изобретения. Без ограничения, это может быть антитело на основе привлекающего иммунные клетки биспецифического активатора. Иллюстративным вариантом осуществления является антитело на основе привлекающих Т-клетки биспецифического активатора (BiTE), необязательно при этом в дополнение к области, которая содержит связывающую молекулу по первому аспекту настоящего изобретения, которая имеет специфичность связывания в отношении области ECD3 белка US28, антитело BiTE дополнительно содержит домен, связывающий Т-клетки, такой как CD3-связывающий домен.

В дополнительном варианте осуществления одно или несколько средств, подлежащих применению в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, могут, например, представлять собой (или включать) конъюгат в соответствии с восьмым аспектом настоящего изобретения и/или десятым аспектом настоящего изобретения, такой как конъюгат, который представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство («ADC»), или конъюгат, который содержит радиоактивный фрагмент, такой как конъюгат, который является подходящим для применения в радиоиммунотерапии («RIT»).

В другом варианте осуществления один или несколько средств, которые поделжат применению в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, могут, например, представлять собой (или включать) клетку (или популяцию клеток, например

гомогенную популяцию клеток), в которой указанная или каждая клетка содержит CAR в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения. Указанную клетку или популяцию клеток обычно выделяют и/или составляют для введения субъекту.

H. Комбинированные виды лечения

Необязательно в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, субъекту можно вводить дополнительное вещество, такое как дополнительное терапевтическое, профилактическое, диагностическое, прогностическое или терагностическое вещество, и необязательно при этом дополнительное вещество можно вводить отдельно, последовательно или одновременно с указанным или каждым из одного или нескольких средств.

Соответственно, в одиннадцатом аспекте настоящего изобретения также представлен способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, путем введения субъекту терапевтического, профилактического, диагностического, прогностического или терагностического вещества, при этом субъекта также лечат отдельно, последовательно (для например, до или после), или одновременно указанными или каждым из одного или нескольких средств.

В варианте осуществления, в котором лечение является одновременным, указанное одно или несколько средств, подлежащих применению в соответствии с одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, могут быть составлены и/или введены в комбинации с терапевтическими, профилактическими, диагностическими, прогностическими или терагностическими веществами; или могут быть составлены отдельно, но введены одновременно в виде двух отдельных составов.

Например, в одном варианте осуществления заболевание или состояние, подлежащее лечению, может представлять собой форму рака (такую как одна или несколько форм рака, раскрытых выше), а дополнительное терапевтическое, профилактическое, диагностическое, прогностическое или терагностическое вещество может быть нацелено на рак.

Таким образом, в контексте настоящего изобретения также предполагается, что связывающая молекула по настоящему изобретения и другие терапевтические средства, определенные одиннадцатым аспектом настоящего изобретения, могут быть аналогичным образом использованы при лечении рака в сочетании с химиотерапевтическим вмешательством или лучевой терапией или другими видами лечения.

Указанные различные формы лечения могут предшествовать другим или следовать за ними с интервалами от минут до недель. Например, в пределах приблизительно 12-24 часов друг от друга и, более предпочтительно, в пределах приблизительно 6-12 часов друг от друга, при этом время задержки всего лишь приблизительно 12 часов является одним из предпочтительных вариантов. Однако в некоторых ситуациях может быть желательно значительно продлить период лечения, если происходит перерыв от нескольких дней (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) между соответствующими введениями.

Введение терапевтических средств по настоящему изобретению пациенту будет осуществляться в соответствии с общими протоколами введения этой конкретной вторичной терапии, принимая во внимание токсичность лечения, если таковая имеется. Ожидается, что циклы лечения будут повторяться по мере необходимости. Также предполагается, что различные стандартные виды терапии, а также хирургическое вмешательство могут применяться в комбинации с описанными видами терапии рака.

Квалифицированного специалиста отсылают к “Remington’s Pharmaceutical Sciences” 15th Edition, Chapter 33, в частности, страницам 624-652. Некоторое изменение дозировки обязательно будет происходить в зависимости от состояния субъекта, которого лечат. Лицо, ответственное за введение, в любом случае определит подходящую дозу для отдельного субъекта. Кроме того, для применения у человека препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, как того требует Управление по биологическим стандартам FDA.

1. Химиотерапия

Химиотерапевтические противораковые средства могут быть выбраны, например, из алкилирующих средств, включая азотистые иприты, такие как мехлоретамин (HN_2), циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан (L-сарколизин) и хлорамбуцил; этиленимины и метилмеламины, такие как гексаметилмеламин, тиотепа; алкилсульфонаты, такие как бусульфан; нитрозомочевины, такие как кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), семустин (метил-CCNU) и стрептозоцин (стрептозотоцин); и триазины, такие как декарбазин (DTIC; диметилтриазеноимидазолкарбоксамид); антиметаболиты, включая аналоги фолиевой кислоты, такие как метотрексат (аметоптерин); аналоги пиримидина, такие как фторурацил (5-фторурацил; 5-FU), флоксуридин (фтордезоксиуридин; FUdR) и цитарабин (цитозин арабинозид); и аналоги пурина и родственные ингибиторы, такие как меркаптопурин (6-меркаптопурин; 6-MP), тиогуанин (6-тиогуанин; TG) и

пентостатин (2'-дезоксикоформицин); натуральные продукты, включая алкалоиды барвинка, такие как винбластин (VLB) и винкристин; эпиподофиллотоксины, такие как этопозид и тенипозид; антибиотики, такие как дактиномицин (актиномицин D), даунорубицин (дауномицин; рубидомицин), доксорубицин, блеомицин, пликамицин (митрамицин) и митомицин (митомицин C); ферменты, такие как L-аспарагиназа; и модификаторы биологического ответа, такие как альфеномы интерферона; различные агенты, включая координационные комплексы платины, такие как цисплатин (*цис*-DDP) и карбоплатин; антрацендионы, такие как митоксантрон и антрациклин; замещенная мочевина, такая как гидроксимочевина; производное метилгидразина, такое как прокарбазин (N-метилгидразин, MIH); и супрессор надпочечников, такой как митотан (*o,p'*-DDD) и аминоглутетимид; таксол и аналоги/производные; ингибиторы клеточного цикла; ингибиторы протеосом, такие как бортезомиб (Velcade®); ингибиторы сигнальной трансдуктазы (например, тирозинкиназы), такие как иматиниб (Glivec®), ингибиторы COX-2 и агонисты/антагонисты гормонов, такие как флутамид и тамоксифен.

Клинически используемые противораковые средства обычно группируются по механизму действия: алкилирующие средства, ингибиторы топоизомеразы I, ингибиторы топоизомеразы II, антиметаболиты РНК/ДНК, антиметаболиты ДНК и антимитотические средствам. На веб-сайте НИЗ США/Национального института рака перечислено 122 соединения (http://dtp.nci.nih.gov/docs/cancer/searches/standard_mechanism.html), все из которых могут использоваться в сочетании с подходами с нацеливанием на US28, как описано различными аспектами настоящего изобретения. Они включают алкилирующие средства, включая азалей, AZQ, BCNU, бусульфан, карбоксифталатоплатину, CBDCA, CCNU, CHIP, хлорамбуцил, хлорзотоцин, цис-платину, кломезон, цианоморфолино-доксорубицин, циклодизон, диангидрогалактитол, фтордопан, гепсульфам, гикантон, мелфалан, метил CCNU, митомицин C, митозоламид, азотистый иприт, PCNU, пиперазин, пиперазиндион, пипоброман, порфиромицин, спирогидантоин иприт, тероксирон, тетраплатин, пикоплатин (SP-4-3) (цис-аминдихлор(2-метилпиридин)Pt(II)), тиотепа, триэтиленмеламин, урациловый азотистый иприт, Yoshi-864; анитмитотические средства, включая аллоколхицин, галихондрин B, колхицин, производное колхицина, доластатин 10, майтанзин, ризоксин, таксол, производное таксола, тиоколхицин, тритилцистеин, сульфат винбластина, сульфат винкристина; ингибиторы топоизомеразы I, включая камптотецин, камптотецин, натриевую соль, аминокамптотецин, производные камптотецина, морфолинодоксорубицин; ингибиторы топоизомеразы II, включая доксорубицин,

амонафид, m-AMSA, производное антрапиразола, пиразолоакридин, бисантрен HCL, даунорубицин, дезоксидоксорубицин, митоксантрон, меногарил, N,N-дибензилдауномицин, оксантразол, рубидазон, VM-26, VP-16; РНК/ДНК-антиметаболиты, включая L-аланозин, 5-азацитидин, 5-фторурацил, ацивицин, 3 производные аминоптерина, антифол, растворимый антифол Бейкера, дихлораллил лавсон, брекинар, фторафур (пролекарство), 5,6-дигидро-5-азацитидин, метотрексат, производное метотрексата, N-(фосфоноацетил)-L-аспартат (PALA), пиразофурин, триметрексат; ДНК-антиметаболиты, включая 3-HP, 2'-дезокси-5-фторуридин, 5-HP, альфа-TGDR, глицинат афидиколина, ara-C, 5-аза-2'-дезоксицитидин, бета-TGDR, циклоцитидин, гуаназол, гидроксимочевину, инозин гликодиальдегид, макбецин II, пиразолоимидазол, тиогуанин и тиопурин.

Однако предпочтительно, чтобы по меньшей мере одно дополнительное противораковое средство было выбрано из цисплатина; карбоплатина; пикоплатина; 5-фторурацила; паклитаксела; митомицина C; доксорубицина; гемцитабина; томудекса; пеметрекседа; метотрексата; иринотекана, фторурацила и лейковорина; оксалиплатина, 5-фторурацила, эпирубина, кабецитабина, доксотаксела, паклитаксела и карбоплатина.

Предпочтительные соединения, препятствующие ангиогенезу, включают бевацизумаб (Avastin®); итраконазол; карбоксиамидотриазол; TNP-470 (аналог фумагиллина); CM101; IFN-α; IL-12; тромбоцитарный фактор-4; сурамин; SU5416; тромбоспондин; антагонисты VEGFR; ангиостатические стероиды + гепарин; фактор ингибирования ангиогенеза хрящевого происхождения; ингибиторы матриксных металлопротеиназ; ангиостатин; эндостатин; 2-метоксиэстрадиол; текогалан; тетратиомолибдат; талидомид; пролактин; ингибиторы $\alpha_v\beta_3$; линомид; тасквинимод; ранибизумаб; сорафениб; (Nexavar®); сунитиниб (Sutent®); пазопаниб (Votrient®); и эверолимус (Afinitor®).

Дополнительное терапевтическое средство может представлять собой цитотоксическое средство, активируемое гипоксией (например, тирапазамин).

Виды терапии рака также включают различные комбинированные виды терапии, включающие как химические виды лечения, так и лучевую терапию. Комбинированная химиотерапия включает, например, цисплатин (CDDP), карбоплатин, прокарбазин, мехлоретамин, циклофосфамид, камптотецин, ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, нитромочевину, дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, блеомицин, поликомицин, митомицин, этопозид (VP16), тамоксифен, ралоксифен, средства, связывающие рецепторы эстрогена, таксол, гемцитабиен, навелбин, ингибиторы

фарнезилпротеинтрансферазы, трансплатин, 5-фторурацил, винкристин, винбластин и метотрексат, темазоломид (водная форма DTIC) или любой аналог или производный вариант вышеперечисленного.

Комбинация химиотерапии с биологической терапией известна как биохимиотерапия. Настоящее изобретение рассматривает любое химиотерапевтическое средство, которое может быть использовано или известно в данной области техники для лечения или профилактики различных видов рака.

2. Лучевая терапия

Другие факторы, вызывающие повреждение ДНК и широко используемые, включают так называемые γ-лучи, рентгеновские лучи и/или направленную доставку радиоизотопов к опухолевым клеткам. Также рассматриваются другие формы повреждающих ДНК факторов, такие как микроволны и УФ-облучение. Наиболее вероятно, что все эти факторы влияют на широкий спектр повреждений ДНК, предшественников ДНК, репликации и репарации ДНК, а также сборки и поддержания хромосом. Диапазон доз рентгеновских лучей варьируется от суточных доз от 50 до 200 рентген в течение длительных периодов времени (3–4 недели) до разовых доз от 2000 до 6000 рентген. Диапазоны доз радиоизотопов широко варьируются и зависят от периода полураспада изотопа, силы и типа испускаемого излучения, а также поглощения неопластическими клетками.

Термины «приводимый в контакт» и «воздействующий» применительно к клетке используются в данном документе для описания процесса, посредством которого терапевтическое средство и химиотерапевтическое или радиотерапевтическое средство доставляются к мишени или помещаются непосредственно рядом с мишенью. Для достижения уничтожения или стаза клеток оба средства доставляются в клетку в объединенном количестве, эффективном для уничтожения одной или нескольких целевых клеток или предупреждения деления указанных клеток.

3. Иммунотерапия

Иммунотерапия, как правило, основана на использовании иммунных эффекторных клеток и молекул для нацеливания и уничтожения раковых клеток. Иммунным эффектором может быть, например, антитело, специфическое в отношении некоторого маркера на поверхности опухолевой клетки. Для целей настоящего изобретения и без ограничения маркером может быть US28, экспрессируемый на поверхности инфицированных HCMV опухолевых клеток; в этом случае антитело может представлять собой или содержать любую из связывающих молекул по настоящему

изобретению. Антитело само по себе может служить эффектором терапии или может рекрутировать другие клетки для фактического уничтожения клеток. Антитело также может быть конъюгировано с лекарственным средством или токсином (химиотерапевтическим, радионуклидом, А-цепью рицина, холерным токсином, коклюшным токсином и т.д.) и служить просто в качестве нацеливающего средства. В качестве альтернативы эффектор может представлять собой лимфоцит, несущий поверхностную молекулу, которая прямо или опосредованно взаимодействует с мишенью опухолевой клетки. Различные эффекторные клетки включают цитотоксические Т-клетки и NK-клетки. Комбинация терапевтических средств, т.е. прямой цитотоксической активности и ингибирования или снижения уровня фортилина, обеспечит терапевтический эффект при лечении рака.

Иммунотерапия также может использоваться как часть комбинированной терапии. Общий подход к комбинированной терапии обсуждается ниже. В одном аспекте иммунотерапии опухолевая клетка должна нести некоторый маркер, который поддается нацеливанию, т.е. не присутствует на большинстве других клеток. Существует множество опухолевых маркеров, и любой из них может быть пригоден для нацеливания в контексте настоящего изобретения. Общие опухолевые маркеры включают карциноэмбриональный антиген, специфический антиген простаты, антиген, связанный с опухолью мочи, фетальный антиген, тирозиназу (p97), gp68, TAG-72, HMFG, сиалиловый антиген Льюиса, MucA, MucB, PLAP, рецептор эстрогена, рецептор ламинина, *erb* B и p155. Альтернативным аспектом иммунотерапии является противораковое воздействие с иммуностимулирующими эффектами. Также существуют иммуностимулирующие молекулы, в том числе: цитокины, такие как IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, гамма-IFN, хемокины, такие как MIP-1, MCP-1, IL-8, и факторы роста, такие как лиганд FLT3. Было показано, что сочетание иммуностимулирующих молекул, либо в виде белков, либо с использованием доставки генов в сочетании с супрессором опухоли, таким как mda-7, усиливает противоопухолевые эффекты (Ju *et al.*, 2000).

Примерами иммунотерапии, которые в настоящее время исследуются или используются, являются иммунные адъюванты (например, *Mycobacterium bovis, Plasmodium falciparum*, динитрохлорбензол и ароматические соединения) (патент США 5801005; патент США 5739169; Hui and Hashimoto, 1998, *Infect. Immun.*, **66**(11):5329-36; Christodoulides *et al.*, 1998, *Microbiology*, **144**(Pt ll):3027-37), цитокиновая терапия (например, интерфероны и IL-1, GM-CSF и TNF) (Bukowski *et al.*, 1998, *Clin. Cancer Res.*, **4**(10):2337-47; Davidson *et al.*, 1998, *J. Immunother.*, **21**(5):389-98; Hellstrand *et al.*, 1998,

Oncol, **37**(4):347-353), генная терапия (например, TNF, IL-1, IL-2, p53) (Qin *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**(24): 1441 1-14416; Austin-Ward and Villaseca, 1998, *Rev. Med. Chil,* **126**(7):838-45; патент США 5830880 и патент США 5846945) и моноклональные антитела (например, антитело к ганглиозиду GM2, антитело к HER-2, антитело к p185) (Pietras *et al.*, 1998, *Oncogene*, **17**(17):2235-49; Hanibuchi *et al.*, 1998, *Int J. Cancer*, **78**(4):480-5; патент США 5824311). Герцептин (трастузумаб) представляет собой химерное (мышино-человеческое) моноклональное антитело, которое блокирует рецептор HER2-neu. Он обладает противоопухолевой активностью и был одобрен для использования при лечении злокачественных опухолей (Dillman, 1999, *Cancer Biother. Radiopharm.*, **14**:5-10). Было показано, что комбинированная терапия рака герцептином и химиотерапией более эффективна, чем отдельные виды терапии. Таким образом, предполагается, что один или несколько противораковых видов терапии могут быть использованы вместе с видами терапии по настоящему изобретению, направленными на ECD3 US28, кодируемого HCMV, как описано в данном документе.

При адоптивной иммунотерапии циркулирующие лимфоциты пациента или лимфоциты, инфильтрированные опухолью, выделяют *in vitro*, активируют лимфокинами, такими как IL-2, или трансдуцируют фактора генами некроза опухоли и вводят повторно (Rosenberg *et al.*, 1988, *N. Engl J. Med*, **319**:1676; Rosenberg *et al*, 1989, *Ann. Surg.*, **210**:474). Для достижения этого можно было бы ввести животному или пациенту-человеку иммунологически эффективное количество активированных лимфоцитов в сочетании с включенной в адъювант антигенной пептидной композицией, как описано в данном документе. Активированные лимфоциты наиболее предпочтительно будут собственными клетками пациента, которые ранее были выделены из образца крови или опухоли и активированы (или «размножены») *in vitro*. Эта форма иммунотерапии привела к нескольким случаям регресса меланомы и рака почки, но процент ответивших на лечение был невелик по сравнению с теми, кто не ответил.

Существует ряд различных подходов к пассивной иммунотерапии рака. В общих чертах их можно разделить на следующие категории: инъекции только антител; инъекции антител, связанных с токсинами или химиотерапевтическими средствами; инъекции антител, связанных с радиоактивными изотопами; введение антиидиотипических антител; и, наконец, очищение костного мозга от опухолевых клеток.

Человеческие моноклональные антитела используются в пассивной иммунотерапии, поскольку они вызывают мало или вообще не вызывают побочных эффектов у пациента. Однако их применение несколько ограничено вследствие их редкости, и до сих пор их вводили только внутриочагово. Человеческие моноклональные антитела к ганглиозидным антигенам вводили внутриочагово пациентам, страдающим рецидивирующей меланомой кожи (Irie & Morton, 1986, *Proc. Nat Acad. Sci. USA* **83**:8694-8698). Регресс наблюдался у шести из десяти пациентов после ежедневных или еженедельных внутриочаговых инъекций. В другом исследовании умеренный успех был достигнут при внутриочаговых инъекциях двух человеческих моноклональных антител (Irie *et al.*, "*Melanoma gangliosides and human monoclonal antibody*" In: Human Tumor Antigens and Specific Tumor Therapy, Metzgar & Mitchell (eds.), Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 115-126, 1989). Возможные терапевтические антитела включают антитело TNF, антитело к CD25, антитело к CD3, антитело к CD20, CTLA-4-IG и антитело к CD28.

Может оказаться целесообразным введение более одного моноклонального антитела, направленного против двух разных антигенов, или даже антител с множественной антигенной специфичностью. Протоколы лечения также могут включать введение лимфокинов или других усилителей иммунитета, как описано Bajorin *et al.*, 1988, *Proc. Amu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol*, **7**:A967. Разработка человеческих моноклональных антител описана более подробно в другом разделе настоящего описания.

4. Генная терапия

В еще одном варианте осуществления вторичное лечение представляет собой генную терапию, при которой терапевтический полинуклеотид вводят до, после или одновременно с терапией по одиннадцатому аспекту настоящего изобретения. Различные гены, на которые может быть нацелена генная терапия той или иной формы в сочетании с настоящим изобретением, хорошо известны специалистам в данной области техники и могут включать любой ген, участвующий в развитии рака.

Индукторы клеточной пролиферации. Белки, индуцирующие клеточную пролиферацию, делятся на различные категории в зависимости от функции. Общим для всех этих белков является их способность регулировать клеточную пролиферацию. Например, форма PDGF, онкоген sis, является секретируемым фактором роста. Онкогены редко возникают из генов, кодирующих факторы роста, и в настоящее время sis является единственным известным встречающимся в природе онкогенным фактором роста. В одном варианте осуществления настоящего изобретения предполагается, что

антисмысловая мРНК, направленная на конкретный индуктор клеточной пролиферации, используется для предупреждения экспрессии индуктора клеточной пролиферации.

Белки FMS, ErbA, ErbB и neu являются рецепторами факторов роста. Мутации этих рецепторов приводят к потере регулируемой функции. Например, точечная мутация, затрагивающая трансмембранный домен белка рецептора Neu, приводит к образованию онкогена neu. Онкоген erbA происходит из внутриклеточного рецептора гормона щитовидной железы. Считается, что модифицированный онкогенный рецептор ErbA конкурирует с эндогенным рецептором гормона щитовидной железы, вызывая неконтролируемый рост.

Наибольший класс онкогенов включает белки, передающие сигнал (например, Src, Abl и Ras). Белок Src представляет собой цитоплазматическую протеинтирозинкиназу, и его трансформация из протоонкогена в онкоген в некоторых случаях происходит в результате мутаций по остатку тирозина 527. В отличие от этого, в одном примере трансформация белка ГТФазы ras из протоонкогена в онкоген является результатом мутации валина на глицин в аминокислоте 12 в последовательности, снижающей активность ras ГТФазы. Белки Jun, Fos и Myc представляют собой белки, которые непосредственно влияют на функции ядра в качестве факторов транскрипции.

Ингибиторы клеточной пролиферации. Онкогены-супрессоры опухолей подавляют чрезмерную клеточную пролиферацию. Инактивация этих генов нарушает их ингибирующую активность, что приводит к нерегулируемой пролиферации. Наиболее распространенными супрессорами опухоли являются Rb, p53, p21 и p16. Другие гены, которые можно использовать в соответствии с настоящим изобретением, включают APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, zac1, p73, VHL, C-CAM, MMAC1/PTEN, DBCCR-1, FCC, rsk-3, слитые продукты p27, p27/p16 и слитые продукты p21/p27.

Регуляторы запрограммированной клеточной смерти. Апоптоз, или запрограммированная клеточная смерть, является важным процессом для нормального эмбрионального развития, поддержания гомеостаза во взрослых тканях и подавления канцерогенеза (Kerr *et al.*, 1972). Было показано, что семейство белков Bcl-2 и ICE-подобные протеазы являются важными регуляторами и эффекторами апоптоза в других системах. Белок Bcl-2, обнаруженный в связи с фолликулярной лимфомой, играет важную роль в контроле апоптоза и повышении выживаемости клеток в ответ на разнообразные апоптотические стимулы (Bakhshi *et al.*, 1985, *Cell*, **41**(3):899-906; Cleary and Sklar, 1985, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **82**(21):7439-43; Cleary *et al.*, 1986, *J. Exp. Med*, **164**(1):315-20; Tsujimoto *et al.*, 1985, Science, **228**(4706):1440-3; Tsujimoto and Croce, 1986,

Proc. Natl Acad. Sci. USA, **83**(14):5214-8). Эволюционно консервативный белок Bcl-2 в настоящее время признан членом семейства родственных белков, которые можно отнести к категории агонистов смерти или антагонистов смерти.

После его открытия было показано, что Bcl-2 подавляет клеточную смерть, вызванную различными стимулами. Кроме того, теперь очевидно, что существует семейство белков, регулирующих гибель Bcl-2 клеток, которые имеют общую гомологию структуры и последовательности. Было показано, что эти разные члены семейства либо обладают функциями, сходными с Bcl-2 (например, Bcl_{XL}, Bcl_W, Bcl_S, Mcl-1, A1, Bfl-1), либо противодействуют функции Bcl-2 и способствуют клеточной смерти (например, Bax, Bak, Bik, Bim, Bid, Bad, Harakiri).

5. Хирургическая операция

Примерно 60% больных раком подвергаются хирургическому вмешательству того или иного типа, которое включает профилактические, диагностические или этапные, лечебные и паллиативные операции. Лечебная хирургия представляет собой лечение рака, которое можно использовать в сочетании с другими видами терапии, такими как лечение по настоящему изобретению, химиотерапия, лучевая терапия, гормональная терапия, генная терапия, иммунотерапия и/или альтернативные виды терапии.

Лечебная хирургия включает резекцию, при которой вся или часть раковой ткани физически удаляется, иссекается и/или уничтожается. Резекция опухоли означает физическое удаление по меньшей мере части опухоли. Помимо резекции опухоли хирургическое лечение включает лазерную хирургию, криохирургию, электрохирургию и хирургию под микроскопом (операцию Мооса). Далее предполагается, что настоящее изобретение можно использовать в сочетании с удалением поверхностного рака, предраковых заболеваний или случайных количеств нормальной ткани.

При иссечении части всех раковых клеток, ткани или опухоли в организме может образоваться полость. Лечение может осуществляться путем перфузии, прямой инъекции или местного применения дополнительной противораковой терапии. Такое лечение можно повторять, например, каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней, или каждые 1, 2, 3, 4 и 5 недель, или каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев.

I. Пептидные последовательности, происходящие из ECD3, и варианты их применения

Как обсуждалось выше, при рассмотрении конструкции связывающих молекул против US28 автор настоящего изобретения отметил, что N-концевая часть (ECD1) белка

US28 содержит высокие уровни мутаций среди различных штаммов HCMV и, по-видимому, является неподходящей мишенью для высокоспецифического и агностического в отношении штамма антитела, и хотя автор настоящего изобретения неожиданно обнаружил, что консервативные ECD2 и консервативные части белка ECD4 не являются подходящими иммуногенами для мышей, заявитель смог разработать новый подход к идентификации высокоспецифических агностических в отношении штамма связывающих молекул с областью ECD3 HCMV US28.

Этот подход был основан на использовании пептидных последовательностей, полученных из двух вариантов форм ECD3: 4N-варианта, имеющего последовательность TKKNNQCMTDYDYLEVS, как определено SEQ ID NO: 6; и 4D-варианта, имеющего последовательность TKKDNQCMTDYDYLEVS, как определено SEQ ID NO: 7.

Эти пептидные последовательности, которые в примерах настоящей заявки называются пептидами 1 и 2 соответственно, использовали для иммунизации мышей, а также для скрининга и идентификации антител, которые обладали высокоспецифическими, но агностическими в отношении штамма свойствами связывания для обоих генетических вариантов пептидов US28 ECD3, а также демонстрируют высокоспецифическое связывание с US28-сверхэкспрессирующими клетками US28-CHO-A1, инфицированными HCMV Ad169 клетками MRC-5, первичными PBMC от HCMV серопозитивных индивидуумов, инфицированной HCMV легочной тканью человека и несколькими типами агрессивных опухолей человека, таких как рак пищевода, желудка, прямой кишки, печени, легких, поджелудочной железы, шейки матки, злокачественная феохромоцитома и местно-распространенный рак толстой кишки, рак молочной железы и его метастазы и глиобластома 4 степени.

Далее представлены указанные пептидные последовательности и их функциональные производные и варианты, а также их варианты применения в соответствии с настоящим изобретением.

Соответственно, в тринадцатом аспекта настоящего изобретения представлен пептид или полипептид, содержащий, состоящий по сути из или состоящий из последовательности 4N-варианта ECD3 US28, TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), или содержащий последовательность иммуногенного фрагмента или варианта SEQ ID NO: 6.

Указанный пептид или полипептид не является белком US28. Например, за пределами последовательности, определенной SEQ ID NO: 6, или ее иммуногенного фрагмента или варианта, оставшаяся последовательность пептида или полипептида по

тринадцатому аспекту настоящего изобретения может иметь менее 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или 5% идентичности последовательности с последовательностью US28, если рассматривать ее по всей длине. Предпочтительно единственной последовательностью, полученной из US28, в указанном пептиде или полипептиде является последовательность SEQ ID NO: 6 или последовательность иммуногенного фрагмента или варианта SEQ ID NO: 6.

В четырнадцатом аспекте настоящего изобретения представлен пептид или полипептид, содержащий, состоящий по сути или состоящий из последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7), или содержащий последовательность иммуногенного фрагмента или варианта SEQ ID NO: 7.

Указанный пептид или полипептид не является белком US28. Например, за пределами последовательности, определенной SEQ ID NO: 7, или ее иммуногенного фрагмента или варианта, оставшаяся последовательность пептида или полипептида по четырнадцатому аспекту настоящего изобретения может иметь менее 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или 5% идентичности последовательности с последовательностью US28, если рассматривать ее по всей длине. Предпочтительно единственной последовательностью, полученной из US28, в указанном пептиде или полипептиде является последовательность SEQ ID NO: 7 или последовательность иммуногенного фрагмента или варианта SEQ ID NO: 7.

Иммуногенный фрагмент или вариант эталонной последовательности SEQ ID NO: 6 или 7 в соответствии с тринадцатым или четырнадцатым аспектом настоящего изобретения соответственно содержит менее чем полную последовательность эталонной последовательности и предпочтительно содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 последовательных аминокислот эталонной последовательности.

Указанный иммуногенный фрагмент SEQ ID NO: 6 может быть выбран, например, из любого одного или нескольких из:

– 16-мера, выбранного из: KKNNQCMTDYDYLEVS или TKKNNQCMTDYDYLEV;

– 15-мера, выбранного из: KNNQCMTDYDYLEVS; KKNNQCMTDYDYLEV; или TKKNNQCMTDYDYLE;

– 14-мера, выбранного из: NNQCMTDYDYLEVS; KNNQCMTDYDYLEV; KKNNQCMTDYDYLE; или TKKNNQCMTDYDYL;

– 13-мера, выбранного из: NQCMTDYDYLEVS; NNQCMTDYDYLEV; KNNQCMTDYDYLE; KKNNQCMTDYDYL; или TKKNNQCMTDYDY;

– 12-мера, выбранного из: QCMTDYDYLEVS; NQCMTDYDYLEV; NNQCMTDYDYLE; KNNQCMTDYDYL; KKNNQCMTDYDY; TKKNNQCMTDYD;

– 11-мера, выбранного из: CMTDYDYLEVS; QCMTDYDYLEV; NQCMTDYDYLE; NNQCMTDYDYL; KNNQCMTDYDY; KKNNQCMTDYD; или TKKNNQCMTDY;

– 10-мера, выбранного из: MTDYDYLEVS; CMTDYDYLEV; QCMTDYDYLE; NQCMTDYDYL; NNQCMTDYDY; KNNQCMTDYD; KKNNQCMTDY; или TKKNNQCMTD;

– 9-мера, выбранного из: TDYDYLEVS; MTDYDYLEV; CMTDYDYLE; QCMTDYDYL; NQCMTDYDY; NNQCMTDYD; KNNQCMTDY; KKNNQCMTD; или TKKNNQCMT;

– 8-мера, выбранного из: DYDYLEVS; TDYDYLEV; MTDYDYLE; CMTDYDYL; QCMTDYDY; NQCMTDYD; NNQCMTDY; KNNQCMTD; KKNNQCMT; или TKKNNQCM;

– 7-мера, выбранного из: YDYLEVS; DYDYLEV; TDYDYLE; MTDYDYL; CMTDYDY; QCMTDYD; NQCMTDY; NNQCMTD; KNNQCMT; KKNNQCM; или TKKNNQC;

– 6-мера, выбранного из: DYLEVS; YDYLEV; DYDYLE; TDYDYL; MTDYDY; CMTDYD; QCMTDY; NQCMTD; NNQCMT; KNNQCM; KKNNQC; или TKKNNQ;

– 5-мера, выбранного из: YLEVS; DYLEV; YDYLE; DYDYL; TDYDY; MTDYD; CMTDY; QCMTD; NQCMT; NNQCM; KNNQC; KKNNQ; или TKKNN;

– 4-мера, выбранного из: LEVS; YLEV; DYLE; YDYL; DYDY; TDYD; MTDY; CMTD; QCMT; NQCM; NNQC; KNNQ; KKNN; или TKKN; или

– 3-мера, выбранного из: EVS; LEV; YLE; DYL; YDY; DYD; TDY; MTD; CMT; QCM; NQC; NNQ; KNN; KKN; или TKK.

Указанный иммуногенный фрагмент SEQ ID NO: 7 может быть выбран, например, из любого одного или нескольких из:

– 16-мера, выбранного из: KKDNQCMTDYDYLEVS или TKKDNQCMTDYDYLEV;

– 15-мера, выбранного из: KDNQCMTDYDYLEVS; KKDNQCMTDYDYLEV; или TKKDNQCMTDYDYLE;

– 14-мера, выбранного из: DNQCMTDYDYLEVS; KDNQCMTDYDYLEV; KKDNQCMTDYDYLE; или TKKDNQCMTDYDYL;

– 13-мера, выбранного из: NQCMTDYDYLEVS; DNQCMTDYDYLEV; KDNQCMTDYDYLE; KKDNQCMTDYDYL; или TKKDNQCMTDYDY;

– 12-мера, выбранного из: QCMTDYDYLEVS; NQCMTDYDYLEV; DNQCMTDYDYLE; KDNQCMTDYDYL; KKDNQCMTDYDY; TKKDNQCMTDYD;

– 11-мера, выбранного из: CMTDYDYLEVS; QCMTDYDYLEV; NQCMTDYDYLE; DNQCMTDYDYL; KDNQCMTDYDY; KKDNQCMTDYD; или TKKDNQCMTDY;

– 10-мера, выбранного из: MTDYDYLEVS; CMTDYDYLEV; QCMTDYDYLE; NQCMTDYDYL; DNQCMTDYDY; KDNQCMTDYD; KKDNQCMTDY; или TKKDNQCMTD;

– 9-мера, выбранного из: TDYDYLEVS; MTDYDYLEV; CMTDYDYLE; QCMTDYDYL; NQCMTDYDY; DNQCMTDYD; KDNQCMTDY; KKDNQCMTD; или TKKDNQCMT;

– 8-мера, выбранного из: DYDYLEVS; TDYDYLEV; MTDYDYLE; CMTDYDYL; QCMTDYDY; NQCMTDYD; DNQCMTDY; KDNQCMTD; KKDNQCMT; или TKKDNQCM;

– 7-мера, выбранного из: YDYLEVS; DYDYLEV; TDYDYLE; MTDYDYL; CMTDYDY; QCMTDYD; NQCMTDY; DNQCMTD; KDNQCMT; KKDNQCM; или TKKDNQC;

– 6-мера, выбранного из: DYLEVS; YDYLEV; DYDYLE; TDYDYL; MTDYDY; CMTDYD; QCMTDY; NQCMTD; DNQCMT; KDNQCM; KKDNQC; или TKKDNQ;

– 5-мера, выбранного из: YLEVS; DYLEV; YDYLE; DYDYL; TDYDY; MTDYD; CMTDY; QCMTD; NQCMT; DNQCM; KDNQC; KKDNQ; или TKKDN;

– 4-мера, выбранного из: LEVS; YLEV; DYLE; YDYL; DYDY; TDYD; MTDY; CMTD; QCMT; NQCM; DNQC; KDNQ; KKDN; или TKKD; или

– 3-мера, выбранного из: EVS; LEV; YLE; DYL; YDY; DYD; TDY; MTD; CMT; QCM; NQC; DNQ; KDN; KKD; или TKK.

Предпочтительно, чтобы выбранные иммуногенные фрагменты или каждый из них исключали те последовательности, которые присутствуют в любых других белках, в частности, во внеклеточной области любых белков, таких как другие GPCR; это может помочь в получении необходимой специфичности для ECD3 US28 и минимизации или, предпочтительно, предупреждении любых нецелевых эффектов. Соответственно, могут быть предпочтительными более длинные иммуногенные фрагменты, например, по меньшей мере, 5-меры, по меньшей мере, 6-меры, по меньшей мере, 7-меры, по меньшей мере, 8-меры, по меньшей мере 9-меры, по меньшей мере 10-меры, по меньшей мере 11-меры, по меньшей мере 12-меры, по меньшей мере 13-меры, по меньшей мере 14-меры, по меньшей мере 15-меры или по меньшей мере 16-меры.

Иммуногенный фрагмент или вариант эталонной последовательности SEQ ID NO: 6 или 7 в соответствии с тринадцатым или четырнадцатым аспектом настоящего изобретения соответственно обычно способен провоцировать иммунный ответ (например, иммунный ответ в организме человека или другого животного), например, путем провоцирования гуморального и/или клеточно-опосредованного иммунного ответа. Указанный иммунный ответ является ответом, который имеет специфичность в отношении эталонной последовательности (т.е. SEQ ID NO: 6 и/или 7), присутствующей в пептиде или полипептиде в соответствии с тринадцатым или четырнадцатым аспектом настоящего изобретения соответственно.

В одном варианте осуществления иммуногенный фрагмент или вариант пептида или полипептида по тринадцатому и/или четырнадцатому аспекту настоящего изобретения содержит, состоит по сути или состоит из последовательности, которая является общей и присутствует в обеих SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO:7. Указанная общая последовательность может содержать, состоять по сути из или состоять из непрерывной аминокислотной последовательности или прерывистой аминокислотной последовательности.

В одном варианте осуществления иммунный ответ, который может быть спровоцирован иммуногенным фрагментом или вариантом пептида или полипептида по тринадцатому и/или четырнадцатому аспекту настоящего изобретения, может представлять собой иммунный ответ, который имеет специфичность в отношении последовательности, которая является общей для и присутствует как в SEQ ID NO: 6, так и в SEQ ID NO:7. Например, общая последовательность может содержать, состоять по сути из или состоять из непрерывной аминокислотной последовательности или

прерывистой аминокислотной последовательности, которая является общей и присутствует как в SEQ ID NO: 6, так и в SEQ ID NO:7.

В тринадцатом и четырнадцатом аспектах настоящего изобретения также представлены пептиды или полипептиды, содержащие, состоящие или состоящие по сути из иммуногенного фрагмента или варианта эталонной последовательности, выбранной из TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6) или TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7) соответственно, где иммуногенный фрагмент или вариант содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности эпитопа в ECD3 US28, которая связывается антителом 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8 (включая также scFv, содержащий полипептидную последовательность V_H, имеющую последовательность V_H 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8, как определено SEQ ID NO: 12, 104, 122, 68 и 88, соответственно, и полипептидную последовательность V_L, имеющую последовательность V_L 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8, как определено SEQ ID NO: 18, 108, 126, 72 и 92 соответственно). Предпочтительно указанные пептиды или полипептиды специфически связываются 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8.

В одном варианте осуществления пептид(ы) или полипептид(ы) по тринадцатому и/или четырнадцатому аспекту настоящего изобретения (и/или их иммуногенный фрагмент или вариант) существуют или представлены в очищенной и/или выделенной форме.

Пептиды или полипептиды (или их иммуногенные фрагменты или варианты), определенные тринадцатым и/или четырнадцатым аспектами настоящего изобретения, применимы в широком спектре ролей и вариантом применения. Без ограничения их можно использовать по отдельности или в комбинации для провоцирования иммунной реакции со специфичностью против ECD3 белка US28 HCMV (например, в качестве вакцины для субъекта и/или для создания дополнительных антител со специфичностью связывания против ECD3 US28); а также для захвата, идентификации и/или характеристики связывающих молекул, имеющих специфичность в отношении ECD3 US28 (включая, например, получение средств для захвата, идентификации и/или характеристики таких связывающих молекул, которые имеют агностическое в отношении штамма связывание, специфическое для ECD3 US28, так, что можно подтвердить, что указанные агностические в отношении штамма связывающие молекулы по сути одинаково связываются с каждым из пептидов или полипептидов (или их иммуногенных фрагментов или вариантов), как определено тринадцатым и/или четырнадцатым аспектами настоящего изобретения, независимо от присутствия 4N-

вариантной последовательности или 4D-вариантной последовательности). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления может быть полезно использовать указанные пептиды или полипептиды (или их иммуногенные фрагменты или варианты), как определено тринадцатым и/или четырнадцатым аспектами настоящего изобретения, в комбинации, либо по отдельности (например, по одному каждого типа в отдельном анализе, при этом указанные отдельные анализы следует использовать в комбинации) или в смеси друг с другом.

Соответственно, в пятнадцатом аспекте настоящего изобретения представлена комбинация по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов, содержащая первый пептид или полипептид и второй пептид или полипептид, где:

первый пептид или полипептид содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), или ее иммуногенного фрагмента или варианта, такого как пептид или полипептид (или иммуногенный фрагмент или его варианта), как определено тринадцатым аспектом настоящего изобретения, при условии, что указанный иммуногенный фрагмент содержит по меньшей мере 4N аминокислоту SEQ ID NO:6; и

второй пептид или полипептид содержит, состоит по сути или состоит из последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7), или ее иммуногенного фрагмента, такого как иммуногенный фрагмент, как определено четырнадцатым аспектом настоящего изобретения, при условии, что указанный иммуногенный фрагмент содержит по меньшей мере 4D аминокислоту SEQ ID NO:7.

Пептиды или полипептиды (или их иммуногенные фрагменты или варианты), как определено тринадцатым и/или четырнадцатым аспектами настоящего изобретения, и комбинация по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов, как определено пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, могут быть представлены в наиболее подходящем для их применимости виде. Например, может оказаться подходящим создание слитых белков или конъюгатов (которые без ограничения могут быть пригодны в качестве носителей для презентации указанных пептидов или полипептидов (или их иммуногенных фрагментов или вариантов) иммунной системе) и/или создания иммобилизованных версий указанных пептидов или полипептидов (или их иммуногенных фрагментов или вариантов), или слитых белков или их конъюгатов, например, для использования указанных иммобилизованных молекул в анализах захвата, идентификации и/или характеристики связывающих молекул, имеющих специфичность в отношении ECD3 US28.

Соответственно, в шестнадцатом аспекте настоящего изобретения представлен слитый белок, содержащий, состоящий по сути из или состоящий из первой аминокислотной последовательности, слитой либо непосредственно, либо через одну или несколько линкерных аминокислотных последовательностей со второй аминокислотной последовательностью, при этом первая аминокислотная последовательность представляет собой последовательность пептида или полипептида (или х иммуногенного фрагмента или варианта), как определено тринадцатым или четырнадцатым аспектом настоящего изобретения; и вторая аминокислотная последовательность представляет собой партнера по слиянию.

Может быть выбран любой партнер по слиянию, представляющий интерес. Специалисту в данной области техники хорошо известны последовательности партнера по слиянию, и любая из них может быть выбрана. Партнером по слиянию может быть, например, белок-носитель. В качестве дополнения или в качестве альтернативы партнер по слиянию может обеспечивать дополнительное или альтернативное свойство связывания и/или антигенное свойство первой аминокислотной последовательности, с которой он слит; он может обеспечивать эффекторную часть, которая создает эффект в месте связывания первой аминокислотной последовательности; он может обеспечивать модуляцию (например, увеличение или уменьшение) периода полужизни связывающей молекулы из крови; он может обеспечивать последовательность, которая облегчает обнаружение связывающей молекулы.

В одном предпочтительном варианте партнером по слиянию является белок-носитель, такой как белок-носитель, который выбран для получения слитого белка, подходящего для иммунизации и получения антител против первой аминокислотной последовательности. Например, белок-носитель может быть выбран из группы, состоящей из гемоцианина лимфы улитки (KLH), HSA (человеческого сывороточного альбумина), BSA (бычьего сывороточного альбумина), OVA (овальбумина), столбнячного анатоксина (TT), дифтерийного анатоксина (DT), генетически модифицированный перекрестно реагирующего материала (CRM) дифтерийного токсина, белкового комплекса внешней мембраны менингококка (OMPC) и белка D *H. influenzae* (HiD).

Насколько известно заявителю, на сегодняшний день в лицензированных конъюгированных вакцинах используются пять белков-носителей: TT, DT, генетически модифицированный CRM дифтерийного токсина, менингококковый OMPC и HiD. Клинические испытания продемонстрировали эффективность этих конъюгированных

вакцин в профилактике инфекционных заболеваний. Все пять белков-носителей эффективны для повышения иммуногенности вакцины, но вызывают различное количество антител с разными аффинностями. Дополнительные белки-носители, которые были оценены, хотя и менее тщательно в клинических испытаниях, включают rEPA (экзотоксин A *Pseudomonas aeruginosa*), KLH (гемоцианин лимфы улитки) и флагеллин.

В семнадцатом аспекте настоящего изобретения представлена комбинация по меньшей мере двух различных слитых белков, содержащая первый слитый белок и второй слитый белок, где:

первый слитый белок в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения содержит в качестве первой аминокислотной последовательности первого слитого белка последовательность, которая содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6) или ее иммуногенного фрагмента или варианта, при условии, что указанный иммуногенный фрагмент или вариант содержит 4N аминокислоту SEQ ID NO:6; и

второй слитый белок в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения содержит в качестве первой аминокислотной последовательности второго слитого белка последовательность, которая содержит последовательность , состоит по сути из или состоит из TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7), или ее иммуногенного фрагмента или варианта, при условии, что указанный иммуногенный фрагмент или вариант содержит 4D-аминокислоту SEQ ID NO:7.

Указанная комбинация может, например, быть особенно применимой в качестве иммуногенного компонента вакцинной композиции, которую можно использовать для провоцирования иммунного ответа у субъекта, который имеет реактивностью как против 4N-варианта, так и 4D-варианта штаммов вируса HCMV. Указанный ответ может, например, включать создание ответа поликлональных антител, который включает популяцию антител, включая антитела со специфичностью связывания в отношении 4N-варианта ECD3 US28, антител со специфичностью связывания в отношении 4D-варианта ECD3 US28 и предпочтительно антител с агностической в отношении штамма специфичностью связывания как с 4N-, так и с 4D-вариантами ECD3 US28. Настоящее изобретение также относится к выделенному продукту поликлонального антитела, который может быть получен в результате указанного ответа поликлональных антител, при этом указанный продукт поликлонального антитела может быть выбран так, чтобы он содержал, состоял по сути или состоял из антител, имеющих специфичность

связывания в отношении одного из или предпочтительно обоих из 4N- и 4D- вариантов ECD3 US28.

Как обсуждалось выше, в качестве альтернативы (или дополнительной модификации) создания слитых белков в настоящем изобретении также представлено получение конъюгатов. Соответственно, в восемнадцатом аспекте настоящего изобретения представлен конъюгат, содержащий фрагмент, конъюгированный с пептидом или полипептидом, как определено одним или обоими из тринадцатого и четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, или со слитым белком, как определено шестнадцатым аспектом настоящего изобретения.

Фрагмент указанного конъюгата может быть конъюгирован непосредственно с пептидом или полипептидом (или их иммуногенным фрагментом или вариантом), как определено одним или обоими из тринадцатого и четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, или со слитым белком, как определено шестнадцатым аспектом настоящего изобретения. В качестве альтернативы фрагмент указанного конъюгата может быть конъюгирован опосредованно, например, через линкер, с пептидом или полипептидом, как определено одним или обоими из тринадцатого и четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, или со слитым белком, как определено шестнадцатым аспектом настоящего изобретения.

Необязательно фрагмент может представлять собой носитель, например, белок-носитель, такой как носитель, выбранный из KLH (гемоцианин лимфы улитки), HSA (сывороточный альбумин человека), BSA (бычий сывороточный альбумин), OVA (овальбумин), столбнячный анатоксин (TT), дифтерийный анатоксин (DT), генетически модифицированный перекрестно реагирующий материал (CRM) дифтерийного токсина, белковый комплекс наружной мембраны менингококка (OMPC) и белок D *H. influenzae* (HiD).

В девятнадцатом аспекте настоящего изобретения представлена комбинация по меньшей мере двух различных конъюгатов, при этом комбинация содержит:

первый конъюгат в соответствии с восемнадцатым аспектом настоящего изобретения, где первый конъюгат содержит, состоит по сути из или состоит из фрагмента, конъюгированного с пептидом или полипептидом, где пептид или полипептид содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6) или ее иммуногенного фрагмента или варианта, при условии, что указанный иммуногенный фрагмент или вариант содержит 4N аминокислоту SEQ ID NO:6; и

второй конъюгат в соответствии с восемнадцатым аспектом настоящего изобретения, где второй конъюгат содержит, состоит по сути из или состоит из фрагмента, конъюгированного с пептидом или полипептидом, при этом пептид или полипептид содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7) или ее иммуногенного фрагмента или варианта, при условии, что указанный иммуногенный фрагмент или вариант содержит 4D-аминокислоту SEQ ID NO:7.

Указанная комбинация может, например, быть особенно применимой в качестве иммуногенного компонента вакцинной композиции, которую можно использовать для провоцирования иммунного ответа у субъекта, который имеет реактивностью как против 4N-варианта, так и 4D-варианта штаммов вируса HCMV. Указанный ответ может, например, включать создание ответа поликлональных антител, который включает популяцию антител, включая антитела со специфичностью связывания в отношении 4N-варианта ECD3 US28, антител со специфичностью связывания в отношении 4D-варианта ECD3 US28 и предпочтительно антител с агностической в отношении штамма специфичностью связывания как с 4N-, так и с 4D-вариантами ECD3 US28. Настоящее изобретение также относится к выделенному продукту поликлонального антитела, который может быть получен в результате указанного ответа поликлональных антител, при этом указанный продукт поликлонального антитела может быть выбран так, чтобы он содержал, состоял по сути или состоял из антител, имеющих специфичность связывания в отношении одного из или предпочтительно обоих из 4N- и 4D- вариантов ECD3 US28.

В двадцатом аспекте настоящего изобретения представлен способ получения конъюгата в соответствии с девятнадцатым аспектом настоящего изобретения, при этом способ включает стадии: (a) получение пептида или полипептида (или их иммуногенного фрагмента или варианта), как определено одним или обоими из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, их комбинации, как определено пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, или слитого белка, как определено шестнадцатым аспектом настоящего изобретения; и (b) конъюгирование с ними фрагмента.

Могут быть использованы любые способы конъюгации фрагмента с пептидом или полипептидом (или их иммуногенным фрагментом или вариантом); специалист в данной области техники хорошо осведомлен об обычных способах создания конъюгатов

между выбранными пептидами/полипептидами и другими выбранными фрагментами и может свободно выбирать наиболее подходящий способ.

Например, и без ограничения некоторые традиционные способы сшивания полипептидов включают те, которые в целом описаны в O'Sullivan *et al*, *Anal. Biochem.*, 1979, **100**, 100-108. Например, пептид или полипептид можно сконструировать так, чтобы он был обогащен одной или несколькими тиоловыми группами, и выбран фрагмент, подходящий для реакции с бифункциональным средством, способным реагировать с этими тиоловыми группами, например, N-гидроксисукцинимидный эфир йодуксусной кислоты (NHIA) или N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), гетеробифункциональное сшивающее средство, которое содержит дисульфидный мостик между конъюгированными соединениями. Амидные и тиоэфирные связи, например, получаемые с помощью сложного м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидного эфира, обычно более стабильны *in vivo*, чем дисульфидные связи.

Дополнительные применимые сшивающие средства включают без ограничения сложный N-гидроксисукцинимидный эфир S-ацетилтиогликолевой кислоты (SATA), который представляет собой тиолирующий реагент для первичных аминов, который позволяет снять защиту с сульфгидрильной группы в мягких условиях (Julian *et al*, *Anal. Biochem.*, 1983, **132**: 68), диметилсуберимидат дигидрохлорид и N,N'-о-фенилендималеимид.

В двадцать первом аспекте настоящего изобретения представлен способ получения комбинации по меньшей мере двух различных конъюгатов, как определено девятнадцатым аспектом настоящего изобретения. Либо два различных конъюгата могут быть получены отдельно, а затем объединены, либо в качестве альтернативы два различных пептида или полипептида (или иммуногенный фрагмент или вариант того и другого) могут быть объединены, а затем конъюгаты каждого из них образуются в одной и той же реакции для получения комбинации по меньшей мере двух различных конъюгатов.

Способы по двадцатому или двадцать первому аспекту настоящего изобретения необязательно включают стадию выделения полученного таким образом конъюгата или комбинации конъюгатов; и в двадцать втором аспекте настоящего изобретения представлен выделенный конъюгат или комбинация конъюгатов, которые получены или могут быть получены с помощью способа по любому из двадцатого или двадцать первого аспекта настоящего изобретения, необязательно при этом выделенный конъюгат

дополнительно составлен для введения субъекту. Например, его можно составить для последующего применения, например, для введения реципиенту в виде фармацевтической или ветеринарной композиции.

В двадцать третьем аспекте настоящего изобретения представлена молекула нуклеиновой кислоты или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты, при этом молекула нуклеиновой кислоты содержит или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты вместе содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, которые, отдельно или в комбинации кодируют один или несколько пептидов и/или полипептидов в соответствии с одним или обоими из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинацию по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, слитый белок в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения и/или комбинацию по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения.

Указанная или каждая молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с двадцать третьим аспектом настоящего изобретения может быть, например, независимо выбрана из молекулы ДНК или РНК. Указанная или каждая молекула нуклеиновой кислоты в соответствии с двадцать третьим аспектом настоящего изобретения может быть, например, независимо выбрана из одноцепочечной или двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты. Каждый из вариантов, обсужденных выше в разделе В настоящей заявки, в контексте нуклеиновых кислот, которые кодируют связывающие молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, раскрыт в данном документе и может быть применен с соответствующими изменениями к указанной или каждой нуклеиновой кислоте в соответствии с двадцать третьим аспектом настоящего изобретения.

В двадцать четвертом аспекте настоящего изобретения представлен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с двадцать третьим аспектом настоящего изобретения. Можно применять любой вектор, хотя без ограничений указанный вектор необязательно может быть выбран из группы, состоящей из ретровирусного вектора, плазмиды, лентивирусного вектора и аденовирусного вектора. Каждый из вариантов, обсужденных выше в разделе С настоящей заявки, в контексте векторов, которые содержат одну или несколько нуклеиновых кислот, которые кодируют связывающие

молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, раскрыт в данном документе и может быть применен с соответствующими изменениями к указанному или каждому вектору в соответствии с двадцать четвертым аспектом настоящего изобретения.

В двадцать пятом аспекте настоящего изобретения представлена клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с двадцать третьим аспектом настоящего изобретения, или вектор в соответствии с двадцать четвертым аспектом настоящего изобретения. Необязательно клетка экспрессирует один или несколько пептидов или полипептидов, выбранных из одного или обоих из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинацию по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, слитый белок в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения и/или комбинацию по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения. Каждый из вариантов, обсужденных выше в разделе D настоящей заявки, в контексте клеток, которые содержат одну или несколько нуклеиновых кислот, которые кодируют связывающие молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения (или векторы, содержащие указанные или более нуклеиновых кислот), раскрыт в данном документе и может быть применен с соответствующими изменениями к указанному или каждой клетке в соответствии с двадцать пятым аспектом настоящего изобретения.

В настоящем изобретении дополнительно представлена выделенная популяция молекул для использования в выделении и/или размножении клеток со специфичностью в отношении ECD3 белка US28 HCMV (предпочтительно с агностической в отношении штамма специфичностью), и необязательно при этом клетки представляют собой Т-клетки и/или В-клетки, где выделенная популяция молекул содержит, состоит по сути из или состоит из одного или нескольких пептидов или полипептидов, выбранных из одного или обоих тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинации по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, одного или нескольких слитых белков в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения и/или комбинации по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения, одного или нескольких конъюгатов в соответствии с восемнадцатым аспектом настоящего изобретения и/или

комбинации по меньшей мере двух различных конъюгатов в соответствии с девятнадцатым аспектом настоящего изобретения.

В настоящем изобретении дополнительно представлен способ выделения и/или размножения клеток, способных специфически нацеливаться на ECD3 белка US28 HCMV (предпочтительно с агностической в отношении штамма специфичностью), при этом способ включает получение источника клеток и использование выделенной популяции молекулы, как определено в предыдущем абзаце, в способе отбора клеток со специфичностью в отношении ECD3 белка US28 HCMV (и предпочтительно отбора с агностической в отношении штамма специфичностью), и размножение выбранных клеток, и необязательно при этом выбран источник клеток из группы, состоящей из:

i. клеток субъекта, которого необходимо лечить и/или у которого необходимо бороться с инфекцией или заболеванием или состоянием HCMV, ассоциированным с ним, в соответствии с любым из различных аспектов настоящего изобретения;

ii. клеток, которые HLA-совместимы с субъектом, который подлежит лечению и/или у которого необходимо бороться с инфекцией или заболеванием или состоянием HCMV, ассоциированным с ним, в соответствии с любым из различных аспектов настоящего изобретения;

iii. лейкоцитов периферической крови или PBMC; и

iv. Т-клеток или В-клеток.

Указанные выбранные клетки необязательно могут представлять собой:

(a) Т-клетки с Т-клеточным рецептором (TcR), специфическим в отношении ECD3 белка US28 HCMV (предпочтительно с агностической в отношении штамма специфичностью);

(b) В-клетки с поверхностно связанными антителами, специфическими в отношении ECD3 белка US28 HCMV (предпочтительно с агностической в отношении штамма специфичностью); и/или

(c) В-клетки, которые секретируют антитела, специфические в отношении ECD3 белка US28 HCMV (предпочтительно с агностической в отношении штамма специфичностью).

В двадцать шестом аспекте настоящего изобретения представлена клетка, которая подвергается воздействию и/или содержит один или несколько пептидов или полипептидов, выбранных из одного или обоих из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинацию по меньшей мере двух различных

пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, слитый белок в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения и/или комбинацию по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения, конъюгат в соответствии с восемнадцатым аспектом настоящего изобретения, комбинацию по меньшей мере двух различных конъюгатов в соответствии с девятнадцатым аспектом настоящего изобретения, молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с двадцать третьим аспектом настоящего изобретения и/или вектор в соответствии с двадцать четвертым аспектом настоящего изобретения.

Например, клетка (или популяция клеток) может представлять собой антигенпрезентирующие клетки (APC). Необязательно, APC выбирают из группы, состоящей из дендритных клеток (DC), макрофагов, клеток Лангерганса и B-клеток.

Необязательно клетка (или популяция клеток) может быть или была подвергнута импульсному воздействию одного или нескольких пептидов или полипептидов, выбранных из одного или обоих из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинации по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, слитого белка в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения, и/или комбинации по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения, конъюгата в соответствии с восемнадцатым аспектом настоящего изобретения и/или комбинации по меньшей мере двух различных конъюгатов в соответствии с девятнадцатым аспектом настоящего изобретения. В качестве дополнения или в качестве альтернативы клетка (или популяция клеток) может экспрессировать или экспрессировала молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с двадцать третьим аспектом настоящего изобретения, и/или вектор в соответствии с двадцать четвертым аспектом настоящего изобретения и, таким образом, содержат пептиды или полипептидные последовательности, кодируемые указанной одной или несколькими нуклеиновыми кислотами.

Необязательно клетки, такие как APC (например, DC) могут быть получены из клеток субъекта, которого необходимо лечить и/или у которого необходимо бороться с инфекцией или заболеванием или состоянием HCMV, ассоциированным с ним, в соответствии с любым из различных аспектов настоящего.

Необязательно, DC могут представлять собой DC, полученные из моноцитов (MoDC), и, например, моноциты, из которых получены DC, могут представлять собой моноциты субъекта, которого нужно лечить и/или у которого наблюдается инфекция HCMV или заболевание или состояние, ассоциированное с ним, с которым необходимо бороться, в соответствии с любым из различных аспектов настоящего изобретения.

Необязательно DC получены от донора, который HLA-совместим с субъектом, который подлежит лечению и/или у которого необходимо бороться с инфекцией или заболеванием или состоянием HCMV, ассоциированным с ним, в соответствии с любым из различных аспектов настоящего.

Необязательно DC представляют собой MoDC, а моноциты, из которых получены DC, представляют собой моноциты от донора, который HLA-совместим с субъектом, который подлежит лечению и/или у которого имеется инфекция HCMV или заболевание или состояние, ассоциированное с ним, с которым необходимо бороться в соответствии с любым из различных аспектов настоящего изобретения.

В двадцать седьмом аспекте настоящего изобретения представлен способ выделения и/или обогащения клеток, содержащих Т-клеточный рецептор (TCR) со специфичностью в отношении эпитопа в ECD3 US28 (например, встречающиеся в природе Т-клетки или рекомбинантные клетки, экспрессирующие CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, например CAR Т-клетки, CAR NK-клетки и/или CAR-макрофаги), при этом способ включает стадию применения одного или нескольких средств для выделения и/или обогащения клеток со специфичностью связывания в отношении одной или обеих из последовательностей SEQ ID NO: 6 и/или 7,

где один или несколько средств выбраны из группы, состоящей из пептида или полипептида в соответствии с одним или обоими из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинации по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, слитый белок в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения и/или комбинации по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения, конъюгат в соответствии с восемнадцатым аспектом настоящего изобретения и/или комбинации по меньшей мере двух различных конъюгатов в соответствии с девятнадцатым аспектом настоящего изобретения.

В одном варианте способа по двадцать седьмому аспекту настоящего изобретения последовательности могут быть составлены в виде тетрамера MHC.

Тетрамеры MHC стали важным инструментом для характеристики специфичности и фенотипа Т-клеточного иммунного ответа, а, следовательно, и для клеток, рекомбинантно экспрессирующих Т-клеточный рецептор (TCR), что применимо в широком спектре исследований заболеваний и вакцин. Мультимеры пептид-MHC обычно отображают антигенный пептид в связывающей бороздке MHC, действуя как суррогат событий узнавания, которые происходят как часть взаимодействия Т-клеточного рецептора с антигенпрезентирующей клеткой. Наиболее распространенная форма мультимера, используемая в настоящее время, состоит из меченного биотином pMHC, отображаемого на молекулах стрептавидина, образующего тетравалентные комплексы; поэтому для этого способа обнаружения часто используется термин «тетрамеры». С момента первого описания тетрамеры MHC стали широко использоваться для количественной оценки антигенспецифического Т-клеточного ответа. В сочетании со способами прогнозирования связывания пептидов с молекулами MHC анализ тетрамеров может быть чрезвычайно полезен для идентификации эпитопов Т-клеточных рецепторов. В частности, применение тетрамеров класса I для изучения аутоантигенов также получило широкое развитие в исследованиях опухолевых антигенов.

В определенных вариантах осуществления, в соответствии с двадцать седьмым аспектом настоящего изобретения, указанный тетрамер MHC может, например, представлять собой тетрамер MHC класса I для обнаружения антигенспецифических $CD8^+$ Т-клеток, тетрамер MHC класса II для обнаружения антигенспецифических $CD4^+$ Т-клеток или меченный флуорофором тетрамер для проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии.

Необязательно Т-клетка может быть выбрана из группы, состоящей из $CD8^+$ Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток, эффекторных Т-клеток, Т-клеток-хелперов, Т-клеток памяти, цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), EBV-специфического Т-клеточного рецептора (TCR). или подтипов γδ-Т-клеток.

В двадцать восьмом аспекте настоящего изобретения представлен тетрамер MHC, содержащий пептид или полипептид в соответствии с пептидом или полипептидом в соответствии с одним или обоими из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинация по меньшей мере двух различных пептидов и /или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения,

необязательно при этом указанный или каждый пептид содержит или соответствует SEQ ID NO:6 или SEQ ID NO:7, или иммуногенному фрагменту любого из них или обоих, например, при этом тетрамер MHC представляет собой тетрамер MHC класса I для обнаружения антигенспецифических $CD8^+$ Т-клеток, тетрамер MHC класса II для обнаружения антигенспецифических $CD4^+$ Т-клеток, меченый флуорофором тетрамер для проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии. Тетрамер MHC можно дополнительно применять для выделения и/или обогащения клеток, содержащих Т-клеточный рецептор (TCR) со специфичностью в отношении эпитопа в ECD3 US28, например, Т-клетку, выбранную из группы, состоящей из $CD8^+$ Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток, эффекторных Т-клеток, Т-клеток-хелперов, Т-клеток памяти, цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), EBV-специфического Т-клеточного рецептора (TCR) или подтипов γδ-Т-клеток и/или рекомбинантной клетки, экспрессирующей CAR в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, например, CAR Т-клетки, CAR NK-клетки и/или CAR-макрофага.

J. Составы

Продукты в соответствии с различными аспектами настоящего изобретения могут быть составлены для дальнейших вариантов применения. Например, они могут быть составлены в виде фармацевтически или ветеринарно приемлемых составов.

Фармацевтически или ветеринарно приемлемые составы могут быть приготовлены известными в данной области техники способами, которые достаточно стабильны при хранении и подходят для введения людям и животным. В одном варианте они могут быть представлены в виде раствора, например стерильного раствора. В другом варианте, в частности, в отношении составов неклеточных продуктов, фармацевтически или ветеринарно приемлемые составы могут быть лиофилизированы, например, посредством сублимационной сушки, распылительной сушки, распылительного охлаждения или использования образования частиц из образования сверхкритических частиц.

Такие неклеточные продукты могут включать без ограничения одно или несколько из: связывающей молекулы по первому или седьмому аспектам настоящего изобретения; молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения; вектор или комбинацию множества различных векторов в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения; конъюгат в соответствии с восьмым аспектом настоящего изобретения; выделенный конъюгат в соответствии с десятым

аспектом настоящего изобретения; неклеточное средство в соответствии с различным неклеточными вариантами средства, представленными двенадцатым аспектом настоящего изобретения; один или несколько пептидов или полипептидов, выбранных из одного или обоих тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинацию по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, слитый белок в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения, и/или комбинацию по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения, конъюгат в соответствии с восемнадцатым аспектом настоящего изобретения, комбинацию по меньшей мере двух различных конъюгатов в соответствии с девятнадцатым аспектом настоящего изобретения, молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с двадцать третьим аспектом настоящего изобретения и/или вектор в соответствии с двадцать четвертым аспектом настоящего изобретения; тетрамер MHC в соответствии с двадцать восьмым аспектом настоящего изобретения; неклеточную вакцинную композицию в соответствии с различными неклеточными вариантами, представленными двадцать девятым аспектом настоящего изобретения.

Под «фармацевтически приемлемым» подразумевают нетоксичный материал, который не снижает эффективность одного или нескольких продуктов, составленных в соответствии с различными аспектами настоящего изобретения, включая один или несколько фармацевтически приемлемых буферов, носителей и/или вспомогательных веществ. Такие фармацевтически приемлемые буферы, носители или вспомогательные вещества хорошо известны в данной области техники (см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A.R Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) и handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)).

Термин «буфер» предназначен для обозначения водного раствора, содержащего кислотно-основную смесь с целью стабилизации pH. Примерами буферов являются Trizma, Bicine, Tricine, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, фосфат, карбонат, ацетат, цитрат, гликолат, лактат, борат, ACES, ADA, тартрат, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, какодилат, CHES, DIPSO, EPPS, этаноламин, глицин, HEPPSO, имидазол, имидазолмолочная кислота, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO и TES.

Термин «разбавитель» предназначен для обозначения водного или неводного раствора с целью разведения полипептида в фармацевтическом препарате. Разбавителем может, например, представлять собой одно или несколько из солевого раствора, воды, полиэтиленгликоля, пропиленгликоля, этанола или масел (таких как сафлоровое масло, кукурузное масло, арахисовое масло, хлопковое масло или кунжутное масло).

Необязательно фармацевтически или ветеринарно приемлемый состав может содержать адъювант. Термин «адъювант» предназначен для обозначения любого соединения, добавленного в состав для увеличения биологического эффекта одного или нескольких продуктов по настоящему изобретению в составе. Адъювант может представлять собой одну или несколько солей цинка, меди или серебра с различными анионами, например, без ограничения фторид, хлорид, бромид, йодид, тиоцианат, сульфит, гидроксид, фосфат, карбонат, лактат, гликолат, цитрат, борат, тартрат и ацетаты различного ацильного состава. Адъювант также может представлять собой катионные полимеры, такие как катионные эфиры целлюлозы, катионные сложные эфиры целлюлозы, деацетилированная гиалуроновая кислота, хитозан, катионные дендримеры, катионные синтетические полимеры, такие как поли(винилимидазол), и катионные полипептиды, такие как полигистидин, полилизин, полиаргинин и пептиды, содержащие эти аминокислоты.

Вспомогательное вещество может представлять собой один или несколько углеводов, полимеров, липидов и минералов. Примеры углеводов включают лактозу, глюкозу, сахарозу, маннит и циклодекстрины, которые добавляются в композицию, например, для облегчения лиофилизации. Примерами полимеров являются крахмал, эфиры целлюлозы, карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксиэтилцеллюлоза, этилгидроксиэтилцеллюлоза, альгинаты, каррагинаны, гиалуроновая кислота и ее производные, полиакриловая кислота, полисульфонат, полиэтиленгликоль/полиэтиленоксид, сополимеры полиэтиленоксида/полипропиленоксида, поливиниловый спирт/поливинилацетат разной степени гидролиза, и поливинилпирролидон, все с разной молекулярной массой, которые добавляются в состав, например, для контроля вязкости, для достижения биоадгезии или для защиты липида от химической и протеолитического расщепления. Примерами липидов являются жирные кислоты, фосфолипиды, моно-, ди- и триглицериды, церамиды, сфинголипиды и гликолипиды с разной длиной и насыщенностью ацильной цепи, яичный лецитин, соевый лецитин, гидрогенизированное яйцо и соевый лецитин, которые добавляются к состав по причинам, аналогичным

причинам полимеров. Примерами минералов являются тальк, оксид магния, оксид цинка и оксид титана, которые добавляются в композицию для получения таких преимуществ, как уменьшение накопления жидкости или преимущественных пигментных свойств.

В одном варианте осуществления медицинского применения по настоящему изобретению состав может также содержать по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство (например, противораковое средство и/или соединение, препятствующее ангиогенезу, примеры которого обсуждаются выше в разделе H настоящей заявки).

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут находиться в форме липосомы, в которой один или несколько продуктов в соответствии с различными аспектам настоящего изобретения (далее обозначаемые «активное(ые) средство(ва)») могут быть составлены в комбинации, помимо других фармацевтически приемлемых носителей, амфипатических средств, таких как липиды, которые существуют в агрегированных формах, таких как мицеллы, нерастворимые монослои и жидкие кристаллы. Подходящие липиды для липосомальной композиции включают без ограничения моноглицериды, диглицериды, сульфатиды, лизолецитин, фосфолипиды, сапонин, желчные кислоты и т.п. Подходящие липиды также включают указанные выше липиды, модифицированные поли(этиленгликолем) в полярной головной группе для продления времени циркуляции в кровотоке. Приготовление таких липосомальных составов можно найти, например, в патенте США 4235871.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут находиться в форме биоразлагаемых микросфер. Алифатические полиэфиры, такие как полимолочная кислота (PLA), полигликолевая кислота (PGA), сополимеры PLA и PGA (PLGA) или поли(капролактон) (PCL), а также полиангидриды широко используются в качестве биоразлагаемых полимеров в производстве микросфер. Препараты таких микросфер можно найти в патентах США 5851451 и EP 0213303.

В дополнительном варианте осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению представлены в форме полимерных гелей, где полимеры, такие как крахмал, эфиры целлюлозы, целлюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксиэтилцеллюлоза, этилгидроксиэтилцеллюлоза, альгинаты, каррагинаны, гиалуроновая кислота и их производные, полиакриловую кислоту, поливинилимидазол, полисульфонат, полиэтиленгликоль/полиэтиленоксид, сополимеры

полиэтиленоксид/полипропиленоксид, поливиниловый спирт/поливинилацетат различной степени гидролиза и поливинилпирролидон используют для загущения раствора, содержащего средство. Полимеры могут также содержать желатин или коллаген.

В качестве альтернативы активное(ые) средство(ва) можно просто растворить в солевом растворе, воде, полиэтиленгликоле, пропиленгликоле, этаноле или маслах (таких как сафлоровое масло, кукурузное масло, арахисовое масло, хлопковое масло или кунжутное масло), трагакантовой камеди и/или различные буферы.

Следует понимать, что фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать ионы и определенное значение pH для усиления действия активного полипептида. Кроме того, композиции могут подвергаться обычным фармацевтическим операциям, таким как стерилизация, и/или могут содержать обычные адъюванты, такие как консерванты, стабилизаторы, смачивающие средства, эмульгаторы, буферы, наполнители и т.д.

Составы, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические вещества и растворенные вещества, которые делают состав изотоничным по отношению к крови предполагаемого реципиента; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие средства и загустители.

В альтернативном предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция применима для местного введения пациенту.

Предпочтительно состав представляет собой разовую дозу, содержащую суточную дозу или единичную, ежедневную субдозу или соответствующую часть активного ингредиента.

Следует понимать, что при описанных ниже путях введения специалисту будет известно, какие активные средства применимы для любого данного пути введения.

Активное(ые) средство(ва) можно вводить перорально или любым парентеральным путем в форме фармацевтического состава, содержащего активный ингредиент, необязательно в форме нетоксичной органической или неорганической соли присоединения кислоты или основания в фармацевтически приемлемой лекарственной форме. В зависимости от заболевания и пациента, подлежащего лечению, а также способа введения композиции можно вводить в различных дозах.

При лечении человека активное(ые) средство(ва) обычно вводят в смеси с подходящим фармацевтическим наполнителем, разбавителем или носителем, выбранным с учетом предполагаемого пути введения и стандартной фармацевтической практики.

Например, активное(ые) средство(ва) можно вводить перорально, буккально или сублингвально в форме таблеток, капсул, суппозиториев, эликсиров, растворов или суспензий, которые могут содержать ароматизаторы или красители, для немедленного, отсроченного или контролируемого введения. Активное(ые) средство(ва) также можно вводить посредством интракавернозной инъекции.

Подходящие таблетки могут содержать наполнители, такие как микрокристаллическая целлюлоза, лактоза, цитрат натрия, карбонат кальция, двухосновный фосфат кальция и глицин, разрыхлители, такие как крахмал (предпочтительно кукурузный, картофельный или тапиоковый крахмал), крахмалгликолят натрия, кроскармеллоза натрия и некоторые комплексные силикаты, и связующие для грануляции, такие как поливинилпирролидон, гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC), гидроксипропилцеллюлоза (HPC), сахароза, желатин и гуммиарабик. Кроме того, могут быть включены смазывающие средства, такие как стеарат магния, стеариновая кислота, бегенат глицерина и тальк.

Твердые композиции подобного типа также можно использовать в качестве наполнителей желатиновых капсул. Предпочтительные вспомогательные вещества в этом отношении включают лактозу, крахмал, целлюлозу, молочный сахар или высокомолекулярные полиэтиленгликоли. Для водных суспензий и/или эликсиров соединения по настоящему изобретению можно комбинировать с различными подсластителями или ароматизаторами, красящим веществом или красителями, с эмульгирующими и/или суспендирующими средстами и с разбавителями, такими как вода, этанол, пропиленгликоль и глицерин, и их комбинации.

Активное(ые) средство(ва) также можно вводить парентерально, например, внутривенно, внутриартериально, внутрибрюшинно, интратекально, внутрижелудочково, интрастернально, внутричерепно, внутримышечно или подкожно, или их можно вводить с помощью инфузионных методик. Их лучше всего использовать в форме стерильного водного раствора, который может содержать другие вещества, например, достаточное количество солей или глюкозы, чтобы сделать раствор изотоничным крови. При необходимости водные растворы следует соответствующим образом забуферить (предпочтительно до pH от 3 до 9). Приготовление подходящих

парентеральных составов в стерильных условиях легко осуществляется стандартными фармацевтическими методиками, хорошо известными специалистам в данной области техники.

Составы могут быть представленые в однодозовые или многодозовые контейнеры, например, запаянные ампулы и флаконы, и могут храниться в сублимированном (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекции непосредственно перед применением. Растворы для инъекций и суспензии для экстемпорального применения могут быть получены из стерильных порошков, гранул и таблеток, описанных выше.

Для перорального и парентерального введения пациентам уровень суточной дозы активного средства обычно составляет от 1 до 1000 мг на взрослого (т.е. примерно от 0,015 до 15 мг/кг), вводимого в виде однократной или разделенной дозы.

Так, например, таблетки или капсулы активного(ых) средства(ств) могут содержать от 1 мг до 1000 мг активного средства для введения по одному, по два или более одновременно, в зависимости от ситуации. В любом случае врач определит фактическую дозировку, которая будет наиболее подходящей для каждого отдельного пациента, и она будет варьироваться в зависимости от возраста, веса и реакции конкретного пациента. Вышеуказанные дозировки являются иллюстративными для среднего случая. Конечно, могут быть отдельные случаи, когда необходимы более высокие или более низкие диапазоны доз, и они входят в объем настоящего изобретения.

Активное(ые) средство(ва) также можно вводить интраназально или посредством ингаляции, и их удобно доставлять в форме ингалятора сухого порошка или аэрозольного спрея из контейнера под давлением, насоса, спрея или небулайзера с использованием подходящего пропеллента, например, дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, гидрофторалкана, такого как 1,1,1,2-тетрафторэтан (HFA 134A3 или 1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан (HFA 227EA3), диоксид углерода или другой подходящий газ. В случае аэрозоля под давлением единица дозировки может быть определена путем установки клапана для подачи отмеренного количества. Контейнер под давлением, насос, спрей или распылитель могут содержать раствор или суспензию активного соединения, например, с использованием смесь этанола и пропеллента в качестве растворителя, которая может дополнительно содержать смазку, например триолеат сорбитана. Капсулы и картриджи (изготовленные, например, из желатина) для использования в ингаляторе или инсуффляторе могут быть составлены так, чтобы содержать порошковую смесь активное средство и подходящую

порошковую основу, такую как лактоза или крахмал. Такие составы могут быть особенно применимы для лечения солидных опухолей легких, таких как, например, мелкоклеточная карцинома легких, немелкоклеточная карцинома легких, плевролегочная бластома или карциноидная опухоль.

Аэрозольные или сухие порошкообразные составы предпочтительно составляют так, чтобы каждая дозированная доза или «затяжка» содержала эффективное количество (например, по меньшей мере 1 мг) активного(ных) средства(ств) для доставки субъекту. Следует понимать, что общая суточная доза аэрозоля будет варьироваться от пациента к пациенту и может вводиться однократно или, что чаще, разделенными дозами в течение дня.

В качестве альтернативы активное(ые) средство(ва) можно вводить в форме суппозитория или пессария, особенно для лечения или воздействия на опухоли толстой кишки, прямой кишки или предстательной железы.

Активное(ые) средство(ва) также можно вводить внутриглазно. Для офтальмологического применения активное(ые) средство(ва) можно составить, например, как микронизированные суспензии в изотоническом стерильном солевом растворе с уставновленным pH или, предпочтительно, в виде растворов в изотоническом стерильном солевом растворе с установленным pH, необязательно в сочетании с консервантом, таким как хлорид бензилалкония. В качестве альтернативы активное(ые) средство(ва) можно составить в виде мази, такой как вазелин. Такие составы могут быть особенно применимы для лечения солидных опухолей глаза, таких как ретинобластома, медуллоэпителиома, увеальная меланома, рабдомиосаркома, внутриглазная лимфома или орбитальная лимфома.

Активное(ые) средство(ва) можно применять местно в форме лосьона, раствора, крема, мази или присыпки или можно вводить чрескожно, например, с помощью кожного пластыря. Для местного нанесения на кожу активное(ые) средство(ва) можно составлять в виде подходящей мази, содержащей активное соединение, суспендированное или растворенное, например, в смеси с одним или несколькими из следующих веществ: минеральное масло, жидкий вазелин, белый вазелин, пропиленгликоль, полиоксиэтиленполиоксипропиленовое соединение, эмульгирующий воск и вода. В качестве альтернативы они могут быть составлены в виде подходящего лосьона или крема, суспендированного или растворенного, например, в смеси одного или нескольких из следующих веществ: минеральное масло, моностеарат сорбитана, полиэтиленгликоль, жидкий парафин, полисорбат 60, воск на основе цетиловых эфиров,

цетеариловый спирт, 2-октилдодеканол, бензиловый спирт и вода. Такие составы могут быть особенно применимы для лечения солидных опухолей кожи, таких как, например, базальноклеточный рак, плоскоклеточный рак или меланома.

При раке кожи активное(ые) средство(а) также можно доставлять путем электроинкорпорации (EI). EI возникает, когда мелкие частицы диаметром до 30 микрон на поверхности кожи подвергаются воздействию электрических импульсов, идентичных или подобных тем, которые используются при электропорации. При EI эти частицы проникают через роговой слой в более глубокие слои кожи. Частицы могут быть загружены или покрыты ингибитором или могут просто действовать как «пули», образующие поры в коже, через которые может проникнуть средство, антитело или соединение.

Составы, применимые для местного введения в ротовую полость, включают леденцы, содержащие активный ингредиент в ароматизированной основе, обычно в сахарозе и аравийской камеди или трагакантовой камеди; пастилки, содержащие активный ингредиент в инертной основе, такой как желатин и глицерин или сахароза и аравийская камедь; и жидкости для полоскания рта, содержащие активный ингредиент в подходящем жидком носителе. Такие составы могут быть особенно применимы для лечения солидных опухолей полости рта и горла.

В одном варианте осуществления, когда активное(ые) средство(ва) содержит(ат) полипептид(ы), состоят по сути или состоят из полипептида(ов), то активное(ые) средство(ва) можно доставить с использованием инъекционной системы доставки лекарственного средства с замедленным высвобождением. Они разработаны специально для уменьшения частоты инъекций. Примером такой системы является Nutropin Depot, который инкапсулирует рекомбинантный гормон роста человека (rhGH) в биоразлагаемые микросферы, которые после инъекции медленно высвобождают rhGH в течение длительного периода времени.

Активное(ые) средство(ва) можно вводить с помощью хирургически имплантированного устройства, которое высвобождает активное(ые) средство(ва) непосредственно в необходимое место, например, в глаз для лечения опухолей глаза. Такое прямое применение к участку заболевания обеспечивает эффективную терапию без значительных системных побочных эффектов.

Альтернативным способов доставки активного(ых) средства(ств), которое(ые) содержит(ат), состоит(ят) по сути из или состоит(ят) из полипептида(ов), таких как антитела и CAR, является термочувствительная инъекционная система ReGel. При

температуре ниже температуры тела ReGel представляет собой жидкость для инъекций, а при температуре тела она немедленно образует резервуар для геля, который медленно разрушается и растворяется в известные, безопасные, биоразлагаемые полимеры. Активное лекарственное средство доставляется с течением времени по мере растворения биополимеров.

Полипептидное(ые) активное(ые) средство(ва) также можно доставлять перорально. В этом процессе используется естественный процесс перорального поступления витамина B_{12} в организм для совместной доставки белков и пептидов. Используя систему поглощения витамина B_{12}, активное(ые) средство(ва) белка или пептида может(гут) перемещаться через стенку кишечника. Между аналогами витамина B_{12} и лекарственным средством синтезируются комплексы, которые сохраняют как значительную аффинность в отношении к внутреннему фактору (IF) в витаминной части комплекса, так и значительную биологическую активность лекарственной части комплекса.

Активное(ые) средство(ва) нуклеиновой кислоты можно вводить в виде подходящей генетической конструкции, как описано в данном документе, и доставлять субъекту для экспрессии. Обычно нуклеиновая кислота в генетической конструкции функционально связана с промотором, который может экспрессировать соединение в клетке. Генетические конструкции по настоящему изобретению можно получить с использованием способов, хорошо известных в данной области техники, например, в Sambrook *et al.* (2012) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY.

Предпочтительно генетическая конструкция адаптирована для доставки в клетку человека. Средства и способы введения генетической конструкции в клетку известны в данной области техники и включают использование иммунолипосом, липосом, вирусных векторов (в том числе вакцины коровьей оспы, модифицированной коровьей оспы, лентивируса, парвовируса, ретровирусов, аденовирусов и аденоассоциированных вирусных (AAB) векторов), а также путем прямой доставки ДНК, например, с помощью генной пушки и электропорации. Кроме того, в данной области техники также хорошо известны способы доставки полинуклеотидов в целевую ткань пациента для лечения. В альтернативном способе используется высокоэффективная система доставки нуклеиновых кислот, которая использует рецептор-опосредованный эндоцитоз для переноса макромолекул ДНК в клетки. Это достигается путем конъюгации белка-транспортера железа трансферрина с поликатионами, которые связывают нуклеиновые

кислоты. Высокоэффективная рецептор-опосредованная доставка конструкций ДНК или других генетических конструкций по настоящему изобретению с использованием разрушающей эндосомы активности дефектных или химически инактивированных частиц аденовируса, полученных способами Cotten *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6094-6098, также может использоваться. Следует понимать, что «голая ДНК» и ДНК в комплексе с катионными и нейтральными липидами также могут быть применимы при введении ДНК по настоящему изобретению в клетки индивидуума, подлежащего лечению. Невирусные подходы к генной терапии описаны в Ledley (1995, *Human Gene Therapy* 6, 1129-1144).

Хотя при раке/опухолях конкретных тканей может быть применимо использовать тканеспецифические промоторы в векторах, кодирующих молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, это не является существенным, поскольку риск экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты в организме при можно ожидать, что локализации, отличные от рака/опухоли, будут приемлемыми по сравнению с терапевтической пользой для пациента, страдающего раком/опухолью.

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции или составы по настоящему изобретению предназначены для парентерального введения, более конкретно для внутривенного введения. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция применима для внутривенного введения пациенту, например, путем инъекции. В других вариантах осуществлвения можно использовать интратекальное введение, например, для воздействия на головной мозг и/или нервную систему.

K. Вакцины

В двадцать девятом аспекте настоящего изобретения представлена вакцинная композиция, подходящая для применения в вакцинации, снижении риска, предупреждении или борьбе инфекцией HCMV и/или заболеванием или состоянием, ассоциированным с цитомегаловирусом человека (HCMV). Указанная инфекция HCMV и/или заболевание или состояние, ассоциированное с цитомегаловирусом человека (HCMV), могут быть такими, как определено в разделе G настоящей заявки.

Вакцина может содержать компоненты активной вакцины и/или пассивной вакцины. Активный компонент вакцины предназначен для стимуляции активного иммунитета; тогда как пассивный компонент вакцины предназначен для обеспечения пассивного иммунитета.

Активная вакцина в соответствии с двадцать девятым аспектом настоящего изобретения может при введении субъекту индуцировать иммунную систему субъекта для выработки иммунного ответа, направленного на эпитоп, присутствующий в ECD3 белка US28 HCMV, предпочтительно агностической в отношении штамма иммунного ответа.

Пассивная вакцина в соответствии с двадцать девятым аспектом настоящего изобретения может представлять собой композицию, которая при введении субъекту обеспечивает иммунную систему способностью направляться на эпитоп, присутствующий в ECD3 белка US28 HCMV, предпочтительно агностической в отношении штамма способностью иммунной системы.

В некоторых вариантах осуществления вакцинная композиция по двадцать девятому аспекту настоящего изобретения запускает и/или обеспечивает иммунный ответ:

(a) в отношении одного или нескольких эпитопов, полностью присутствующих во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 HCMV (например, в отношении эпитопа, присутствующего в одном или нескольких иммуногенных фрагментах SEQ ID NO: 6 или 7, как описано в соответствии с тринадцатым и/или четырнадцатым аспектами настоящего изобретения);

(b) в отношении одного или нескольких линейных эпитопов в ECD3 белка US28;

(c) в отношении одного или нескольких эпитопов в ECD3 белка US28 HCMV, который представляет собой эпитоп или эпитопы, присутствующие в идентичной форме как в 4D-вариантных штаммах, так и в 4N-вариантных штаммах HCMV, при этом 4D-вариантный штамм HCMV кодирует белок US28, содержащий ECD3, имеющий последовательность TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7), и при этом 4N-вариантный штамм HCMV кодирует белок US28, содержащий ECD3, имеющий последовательность TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6); и/или

(d) при этом иммунный ответ, который запускается или обеспечивается вакциной, является агностическим в отношении штамма HCMV по отношению к 4D-вариантным штаммам и 4N-вариантным штаммам HCMV, и запускает и/или обеспечивает иммунный ответ, направленный на один или несколько из 4D-вариантных штаммов HCMV, выбранных из Towne, VR1814, TB40/E, Merlin, JP, Ad169, VHL/E, AF1, BL и DAVIS, а также направленный на один или несколько 4N-вариантных штаммов HCMV, выбранных из Toledo, TR и DB.

Указанная вакцинная композиция может представлять собой пассивную вакцину и/или необязательно содержать: (a) одну или несколько связывающих молекул в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, (b) один или несколько функциональных фрагментов указанной одной или нескольких связывающих молекул, как определено в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, (c) одну или несколько выделенных связывающих молекул в соответствии с седьмым аспектом настоящего изобретения, (d) одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения, (e) один или несколько векторов в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, (f) одну или несколько клеток в соответствии с четвертым аспектом настоящего изобретения, (g) один или несколько конъюгатов в соответствии с восьмым аспектом настоящего изобретения и/или (h) один или несколько выделенных конъюгатов в соответствии с десятым аспектом настоящего изобретения.

В качестве альтернативы указанная вакцинная композиция может представлять собой активную вакцину и/или необязательно содержать:

(a) один или несколько пептидов или полипептидов в соответствии с одним или обоими из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинации по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, слитый белок в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения, комбинации по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения, конъюгат в соответствии с восемнадцатым аспектом настоящего изобретения и/или комбинации по меньшей мере двух различных конъюгатов в соответствии с девятнадцатым аспектом настоящего изобретения.

(b) одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с двадцать третьим аспектом настоящего изобретения и/или вектор в соответствии с двадцать четвертым аспектом настоящего изобретения; и/или

(c) клетку, такую как антигенпрезентирующая клетка (например, дендритная клетка), или гомогенную или гетерогенную популяцию указанных клеток, где указанная или каждая из указанных клеток нагружена одним или несколькими из следующих веществ: пептидом или полипептидом в соответствии с одним или обоими из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинацией по

меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, слитым белком в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения, комбинацией по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения, конъюгатом в соответствии с восемнадцатым аспектом настоящего изобретения, комбинацией по меньшей мере двух различных конъюгатов в соответствии с девятнадцатым аспектом настоящего изобретения, одной или несколькими молекулами нуклеиновой кислоты или комбинацией множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с двадцать третьим аспектом настоящего изобретения и/или вектором в соответствии с двадцать четвертым аспектом настоящего изобретения.

В тридцатом аспекте настоящего изобретения представлен способ вакцинации, снижения риска, предупреждения и/или борьбы с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, при этом способ включает введение субъекту вакцины в соответствии с двадцать девятым аспектом настоящего изобретения.

В тридцатом аспекте настоящего изобретения представлена вакцина в соответствии с двадцать девятым аспектом настоящего изобретения для применения в вакцинации, снижении риска, предупреждении и/или борьбе с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, у субъекта.

В тридцатом аспекте настоящего изобретения представлено применение вакцины в соответствии с двадцать девятым аспектом настоящего изобретения при производстве лекарственного препарата для вакцинации против, снижения риска, предупреждения и/или борьбы с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV.

Указанное заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, может, например, представлять собой заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, как раскрыто выше в контексте одиннадцатого аспекта настоящего изобретения. Необязательно заболевание или состояние представляет собой латентную инфекцию HCMV или представляет собой заболевание или состояние, ассоциированное с латентной инфекцией HCMV.

В некоторых вариантах осуществления способ вакцинации против, снижения риска, предупреждения и/или борьбы с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, может включать введение вакцины субъекту только один раз.

В других вариантах осуществления способ вакцинации против, снижения риска, предупреждения и/или борьбы с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, может включать введение вакцины субъекту дважды или несколько раз.

Например, в варианте осуществления, в котором вакцина представляет собой активную вакцину, может быть целесообразным отдельно ввести субъекту первичную дозу и последующую бустерную дозу.

L. Диагностика и другие способы обнаружения и оценки

Как обсуждалось в разделе «Краткое описание сути изобретения» настоящей заявки, в тридцать первом аспекте настоящего изобретения представлен способ оценки одного или нескольких биологических состояний и/или биологических характеристик субъекта и/или биологического материала *ex vivo*.

В указанном способе используют характеристики связывания связывающих молекул или их конъюгатов в соответствии с настоящим изобретением для связывания с высокой специфичностью ECD3 белка US28 и предпочтительно для связывания с высокой специфичностью, но без различия между различными штаммами HCMV.

Способ включает: (a) приведение субъекта и/или биологический материал *ex vivo* в контакт со связывающей молекулой, как определено первым аспектом настоящего изобретения, или конъюгатом, как определено восьмым или десятым аспектом настоящего изобретения; и (b) проведение оценки субъекта и/или биологического материала *ex vivo* на основе прямого и/или опосредованного измерения связывания связывающей молекулы или конъюгата с субъектом и/или биологическим материалом *ex vivo*.

Для оценки может быть использован любой подходящий способ. Например, и без ограничения способ может включать метод ELISA, и необязательно способ осуществлют в отношении биологического материала *ex vivo*, таком как одна или несколько жидкостей организма (например, кровь, слюна, моча).

В альтернативном примере способ включает метод проточной цитометрии и необязательно способ представляет собой способ оценки образца крови *ex vivo* и/или образца костного мозга *ex vivo* от.

В дополнительном альтернативном варианте осуществления способ включает использование конъюгата, как определено восьмым или десятым аспектом настоящего изобретения, где конъюгат содержит обнаружимый фрагмент, такой как радиоактивный фаргмент, и способ включает обнаружение обнаружимого фрагмента у субъекта и/или биологическом материале *ex vivo*, где способ представляет собой метод иммунопозитронно-эмиссионной (PET) визуализации.

В дополнительном альтернативном варианте осуществления способ представляет собой метод иммуногистохимии (IHC), например IHC, которую проводят в отношении

образца биологического материала *ex vivo*. Указанный образец может, например, представлять собой гистологический образец биологического материала, полученного от субъекта или другого биологического источника, представляющего интерес. Специалисту в данной области техники хорошо известны многочисленные методики, хорошо известные в данной области техники, для приготовления гистологических образцов из биологического материала. В контексте настоящего изобретения можно использовать любые подходящие средства для приготовления гистологического образца.

В одном варианте осуществления способ по тридцать первому аспекту настоящего изобретения осуществляют в отношении субъекта или биологического материала *ex vivo*, полученного от субъекта, с целью получения данных (таких как изображение или другие измеримые данные), которые являются подходящими для проведения диагностической или прогностической оценки инфекции HCMV и/или заболевания или состояния, ассоциированного с HCMV, у субъекта.

Указанная инфекция HCMV и/или заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, для которого может быть проведена диагностическая или прогностическая оценка (или могут быть получены данные, относящиеся к ней) с помощью способа по тридцать первому аспекту настоящего изобретения, может, например, быть такой, как определено в разделе G настоящей заявки.

Субъектом, для которого можно провести диагностическую или прогностическую оценку (или получить относящиеся к ней данные) с помощью способа по тридцать первому аспекту настоящего изобретения, может, например, быть любой субъект, описанный в разделе G настоящей заявки.

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, для которого можно провести диагностическую или прогностическую оценку (или получить относящиеся к нему данные) с помощью способа по тридцать первому аспекту настоящего изобретения, может представлять собой инфекцию HCMV или быть ассоциировано с инфекцией HCMV.

В одном варианте осуществления инфекция HCMV может представлять собой инфекцию одного штамма.

Необязательно в альтернативном варианте осуществления инфекция HCMV включает мультиштаммовую инфекцию HCMV, где мультиштаммовая инфекция HCMV включает инфекцию более чем одним различным штаммом HCMV, например, двумя или более штаммами HCMV, которые кодируют разные белковые последовательности US28. Указанные два или более штамма могут кодировать белки US28, которые различаются в

одной или нескольких внеклеточных областях, таких как N-концевая область (ECD1), первая область внеклеточной петли (ECD2), вторая область внеклеточной петли (ECD3), и/или третья область внеклеточной петли (ECD4). В одном варианте осуществления, представляющем интерес, каждый из двух или более штаммов HCMV при мультиштаммовой инфекции HCMV кодирует белок US28, который отличается от другого по меньшей мере в одном или нескольких положениях N-концевой (ECD1) области; например, они могут различаться в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 или более аминокислотных положениях в N-концевой (ECD1) области. В качестве дополнения или в качестве альтернативы в другом варианте осуществления, представляющем интерес, каждый из двух или более штаммов HCMV при мультиштаммовой инфекции HCMV кодирует белок US28, который отличается от другого в одном или нескольких положениях области второй внеклеточной петли (ECD3), например, один или несколько штаммов HCMV при инфекции, состоящей из нескольких штаммов HCMV, могут кодировать белок US28, который кодирует 4N-вариант ECD3, а один или несколько других штаммов HCMV при инфекции, состоящей из нескольких штаммов HCMV, могут кодировать белок US28, который кодирует 4D-вариант ECD3.

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, для которого можно провести диагностическую или прогностическую оценку (или получить относящиеся к нему данные) с помощью способа по тридцать первому аспекту настоящего изобретения, может представлять собой латентную инфекцию HCMV (например, одноштаммовую или мультиштаммовую латентную инфекцию HCMV) или быть ассоциированными с латентной инфекцией HCMV (необязательно мультиштаммовой латентной инфекцией HCMV).

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, для которого может быть проведена диагностическая или прогностическая оценка (или могут быть получены данные, относящиеся к нему) с помощью способа по тридцать первому аспекту настоящего изобретения, может представлять собой литическую инфекцию HCMV (необязательно мультиштаммовую литическую инфекцию HCMV) или ассоциировано с литической инфекцией HCMV (необязательно мультиштаммовой литической инфекцией HCMV).

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, для которого можно провести диагностическую или прогностическую оценку (или получить относящиеся к нему данные) с помощью способа по тридцать первому аспекту настоящего изобретения, может представлять собой врожденную инфекцию HCMV (например, одноштаммовую

или мультиштаммовую инфекцию), например, латентную врожденную одноштаммовую или мультиштаммовую инфекцию HCMV или литическую врожденную одноштаммовую или мультиштаммовую инфекцию HCMV. Соответственно, субъектом такой оценки может быть субъект, в отношении которого необходимо оценить заболевание или состояние, например, младенец (например, новорожденный), плод или эмбрион или мать (или предполагаемая мать субъекта), например, кормящая мать субъекта, женщина, беременная субъектом, или женщина, которую необходимо обследовать до зачатия индивидуума.

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, для которого может быть проведена диагностическая или прогностическая оценка (или могут быть получены данные, относящиеся к нему) с помощью способа по тридцать первому аспекту настоящего изобретения, может представлять собой рак, например, инфицированный HCMV рак (необязательно одноштаммовый или мультиштаммовый инфицированный HCMV рак), такой как латентный рак, инфицированный HCMV (необязательно одноштаммовый или мультиштаммовый латентный инфицированный HCMV рак).

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, для которого можно провести диагностическую или прогностическую оценку (или получить относящиеся к нему данные) с помощью способа по тридцать первому аспекту настоящего изобретения, может представлять собой эпителиальный рак; необязательно при этом эпителиальный рак представляет собой рак молочной железы; например, при этом рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы (TNBC) или HER2-положительный рак молочной железы (как описано в данном документе). Указанные формы эпителиального рака необязательно могут представлять собой одноштаммовую или мультиштаммовую форму инфицированного HCMV эпителиального рака, например, латентную инфицированную HCMV форму эпителиального рака (необязательно одноштаммовый или мультиштаммовый латентный инфицированный HCMV рак).

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, для которого можно провести диагностическую или прогностическую оценку (или получить относящиеся к нему данные) с помощью способа по тридцать первому аспекту настоящего изобретения, может представлять собой метастазирование и/или агрессивную форму рака. Указанные формы метастазирующего и/или агрессивного рака могут необязательно представлять собой одноштаммовую или мультиштаммовую инфицированную HCMV форму метастазирующего и/или агрессивного рака, например, латентную инфицированную

HCMV форму метастазирующего и/или агрессивного рака (необязательно одноштаммового или мультиштаммового латентного инфицированного HCMV рака).

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, для которого можно провести диагностическую или прогностическую оценку (или получить относящиеся к нему данные) с помощью способа по тридцать первому аспекту настоящего изобретения, может представлять собой глиобластому.

Заболеванием или состоянием, ассоциированное с HCMV, для которого можно провести диагностическую или прогностическую оценку (или получить относящиеся к нему данные) с помощью способа по тридцать первому аспекту настоящего изобретения, может быть проведено у субъекта или биологического материала *ex vivo*, полученного от субъекта, у которого диагностировано наличие или было диагностировано наличие или обладание или имеется подозрение на наличие инфицированных HCMV раковых клеток, таких как латентные инфицированные HCMV раковые клетки.

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, для которого может быть проведена диагностическая или прогностическая оценка (или могут быть получены данные, относящиеся к нему) с помощью способа по тридцать первому аспекту настоящего изобретения, может быть или предполагается реципиент клеточного материала, такой как донорство клеточного продукта. Указанный клеточный продукт может, например, содержать, состоять по сути или состоять из живого клеточного материала *ex vivo*, выбранного из группы, которая включает: один или несколько типов клеток *ex vivo*; один или несколько типов клеточных культур *ex vivo*; один или несколько типов тканей *ex vivo*; один или несколько типов культур тканей *ex vivo*; один или несколько типов органов *ex vivo*; и/или один или несколько типов культур органов *ex vivo*. Необязательно, клеточный продукт может быть получен прямо или опосредованно от живого донора.

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, для которого может быть проведена диагностическая или прогностическая оценка (или могут быть получены данные, относящиеся к нему) с помощью способа по тридцать первому аспекту настоящего изобретения, может быть оценено у субъекта, который является или предназначен быть донором клеточного материала, например, донором клеточного продукта; или биологического материала *ex vivo* от указанного донора. Указанный клеточный продукт может включать, состоять из любой одной или нескольких клеток, ткани или органа от указанного донора.

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, для которого может быть проведена диагностическая или прогностическая оценка (или могут быть получены данные, относящиеся к нему) с помощью способа по тридцать первому аспекту настоящего изобретения, может быть проведена в отношении биологического материала, такого как клеточный материал *ex vivo* или *in vitro*, такого как биологический материал, который является подходящим и/или будет использоваться для введения субъекту-реципиенту. Указанный клеточный продукт *ex vivo* может, например, содержать, состоять по сути или состоять из живого клеточного материала *ex vivo*, выбранного из группы, которая включает: один или несколько типов клеток *ex vivo*; один или несколько типов клеточных культур *ex vivo*; один или несколько типов тканей *ex vivo*; один или несколько типов культур тканей *ex vivo*; один или несколько типов органов *ex vivo*; и/или один или несколько типов культур органов *ex vivo*. Необязательно, клеточный продукт может быть получен прямо или опосредованно от живого донора.

В данном документе также представлен набор, такой как диагностический набор, содержащий один или несколько компонентов, обсуждавшихся выше в этом разделе, например, когда он представлен в указанном наборе в форме, подходящей для использования (или способной быть преобразованной в форму, применимую для использования, например, путем восстановления или другой простой манипуляции с хранимой формой) при выполнении способа оценки одного или нескольких биологических состояний и/или биологических характеристик субъекта и/или биологического материала *ex vivo* в соответствии с тридцать первым аспектом настоящего изобретения.

M. Обработка материала *Ex Vivo*

Как отмечалось выше, некоторые пути передачи HCMV субъекту могут осуществляться через контакт с биологическим материалом *ex vivo* от инфицированного человека или из любого другого инфицированного источника. Примеры включают имплантацию или трансплантацию указанному субъекту биологического материала *ex vivo* (такого как трансплантация органов, тканей, костного мозга или стволовых клеток) или переливание крови.

Соответственно, в тридцать втором аспекте настоящего изобретения представлен способ борьбы с инфекцией HCMV (такой как латентная инфекция HCMV, и/или литическая инфекция HCMV, и/или мультиштаммовая инфекция HCMV) в живом биологическом материале *ex vivo*, при этом способ включает приведение живого

биологического материала *ex vivo* в контакт с любым одним или несколькими средствами, выбранными из группы, состоящей из:

i. связывающей молекулы в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения,

ii. функционального фрагмента указанной связывающей молекулы, как определено первым аспектом настоящего изобретения,

iii. выделенной связывающей молекулы в соответствии с седьмым аспектом настоящего изобретения,

iv. молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты в соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения,

v. вектора в соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения,

vi. клетки в соответствии с пятым аспектом настоящего изобретения,

vii. конъюгата в соответствии с восьмым аспектом настоящего изобретения, и

viii. выделенного конъюгата в соответствии с десятым аспектом настоящего изобретения.

В тридцать втором аспекте настоящего изобретения также представлен живой биологический материал *ex vivo*, который получен или может быть получен с помощью способа по данному аспекту.

В одном варианте осуществления способа по тридцать второму аспекту настоящего изобретения и/или живого биологического материал*а ex vivo*, полученного или получаемого с помощью него, живой биологический материал *ex vivo* содержит, состоит по сути из или состоит из живого биологического материала *ex vivo*, выбранного из группы, которая включает: один или несколько типов клеток *ex vivo*; один или несколько типов клеточных культур *ex vivo*; один или несколько типов тканей *ex vivo*; один или несколько типов культур тканей *ex vivo*; один или несколько типов органоидов *ex vivo*; один или несколько типов культур органоидов *ex vivo*; один или несколько типов органов *ex vivo*; и/или один или несколько типов культур органов *ex vivo*. Иллюстративные варианты осуществления включают трансплантацию органов, трансплантацию ткани, трансплантацию костного мозга, трансплантацию стволовых клеток и/или переливание крови.

В тридцать третьем аспекте настоящего изобретения представлен способ лечения субъекта, нуждающегося в этом (то есть, например, субъекта, нуждающегося в трансплантации или имплантации указанного живого биологического материала *ex vivo*),

включающий введение субъекту живого биологического материала *ex vivo*, как определено тридцать вторым аспектом настоящего изобретения.

Например, способ может представлять собой способ трансплантации живого биологического материала *ex vivo*, такой как трансплантат органа или ткани. Указанный способ можно применять для предупреждения или снижения риска передачи инфекции HCMV или заболевания или состояния, ассоциированного с инфекцией HCMV, у реципиента трансплантата.

Субъектом, подлежащим лечению в соответствии с тридцать третьим аспектом настоящего изобретения, может быть, например, любой субъект, как описано в разделе G настоящей заявки.

Заболевание или состояние, ассоциированное с HCMV, в соответствии с тридцать третьим аспектом настоящего изобретения может, например, представлять собой любую форму инфекции HCMV или заболевание или состояние, ассоциированное с инфекцией HCMV, как описано в разделе G настоящей заявки.

N. Способы скрининга связывающих молекул

Как описано в разделе «Примеры» настоящей заявки, заявитель разработал новый подход к идентификации высокоспецифических агностических в отношении штамма связывающих молекул против белка US28 HCMV, сосредоточив внимание на повышении связывания молекул с эпитопами в области ECD3 HCMV US28. Как сообщается в примерах настоящей заявки, было показано, что моноклональные антитела, полученные с помощью этого подхода, хорошо и специфически связываются с обоими генетическими вариантами пептидов US28 ECD3, тем самым демонстрируя связывающие свойства как в отношении специфичности, так и в отношении агностичности в отношении штамма, а также продемонстрировали специфическое связывание с US28-сверхэкспрессирующими клетками US28-CHO-A1, клетками MRC-5, инфицированными Ad169 HCMV, первичными PBMC от инфицированных HCMV серопозитивных лиц, инфицированной HCMV легочной тканью человека и несколькими типами агрессивных опухолей человека, таких как рак пищевода, желудка, прямой кишки, печени, легких, поджелудочной железы, шейки матки, злокачественная феохромоцитома и местно-распространенный рак толстой кишки, рак молочной железы и его метастазы и глиобластома 4 степени.

В подходе заявителя использовали идентифицированный единственный сайт аминокислотной вариации в ECD3 US28, чтобы использовать комбинацию пептидов, выбранных для усиления иммунного ответа, а также для создания и выделения антител,

имеющих агностическую в отношении штамма специфичность связывания с ECD3 US28. Этот подход можно использовать для создания и дальнейшей идентификации таких связывающих молекул, имеющих благоприятные связывающие свойства по настоящему изобретению.

Соответственно, в тридцать четвертом аспекте настоящего изобретения представлен способ скрининга связывающей молекулы, имеющей специфичность связывания и/или аффинность связывания в отношении эпитопа во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV), при этом способ включает:

(a) получение одного или нескольких пептидов, соответствующих аминокислотной последовательности, присутствующей в ECD3 белка US28,

(b) получение одной или нескольких связывающих молекул-кандидатов;

(c) определение специфичности связывания и/или аффинности связывания одной или нескольких связывающих молекул-кандидатов с одним или несколькими пептидами.

Необязательно указанный или каждый из одного или нескольких пептидов, представленных на стадии (a), представлены в форме одного или нескольких пептидов или полипептидов в соответствии с одним или обоими из тринадцатого и/или четырнадцатого аспектов настоящего изобретения, комбинации по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов в соответствии с пятнадцатым аспектом настоящего изобретения, слитый белок в соответствии с шестнадцатым аспектом настоящего изобретения, комбинации по меньшей мере двух различных слитых белков в соответствии с семнадцатым аспектом настоящего изобретения, конъюгат в соответствии с восемнадцатым аспектом настоящего изобретения, комбинации по меньшей мере двух различных конъюгатов в соответствии с девятнадцатым аспектом настоящего изобретения.

Необязательно указанный или каждый из одного или нескольких пептидов содержат, состоят по сути или состоят из полипептидной последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7) и/или TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), и/или иммуногенного фрагмента любого из них или обоих.

Необязательно одна или несколько связывающих молекул-кандидатов могут представлять собой антитела и/или CAR, такие как любое одно или несколько из:

(a) бивалентных антител, таких как антитела IgG-scFv (например, где первый связывающий домен представляет собой интактный IgG, а второй связывающий домен представляет собой scFv, прикрепленный к первому связывающему домену на N-конце

легкой цепи и/или на C-конце легкой цепи, и/или на N-конце тяжелой цепи и/или на C-конце тяжелой цепи IgG, или наоборот);

(b) моновалентных антител, таких как *DuoBody*® или биспецифическое антитело типа «выступ во впадине» (например, scFv-KIH, scFv-KIH^r, BiTE-KIH или BiTE-KIH^r;

(c) антител $scFv_2$-Fc;

(d) биспецифических антител, таких как антитела на основе привлекающих T-клетки биспецифических активаторов (BiTE);

(e) антител с двойным вариабельным доменом (DVD)-Ig;

(f) переориентирующихся антител с двойной аффинностью (DART) (например, $DART_2$-Fc или DART);

(g) триспецифических антител, таких как антитела DNL-Fab_3;

(h) антител scFv-HSA-scFv; и

(i) химерного антигенного рецептора (CAR).

Способ по тридцать четвертому аспекту настоящего изобретения может включать стадию отбора связывающей молекулы-кандидата на основе специфичности связывания и/или аффинности связывания в отношении одного или нескольких пептидов. Например, выбранная связывающая молекула-кандидат:

(a) может иметь специфичность связывания в отношении эпитопа, полностью присутствующего во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 HCMV;

(b) может иметь специфичность связывания в отношении линейного эпитопа в ECD3 белка US28;

(c) может иметь специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, который является агностическим в отношении штамма HCMV, например, специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, который является агностическим в отношении двух или более (например, всех) штаммов HCMV, выбранных из группы, состоящей из DB, Towne, AD169, BL, DAVIS, JP, Merlin, PH, TB40/E, Toledo, VHL/E, TR и VR1814 (FIX); и/или

(d) может иметь специфичность в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, независимо от того, содержит ли ECD3 белка US28 CAR последовательность TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7) или TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6).

Выбранная связывающая молекула-кандидат может иметь специфичность связывания и/или аффинность связывания в отношении одного или нескольких пептидов, которая эквивалентна специфичности связывания и/или аффинности

связывания в отношении того же одного или нескольких пептидов, как продемонстрировано. антителом, которое содержит полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H), который состоит из последовательности SEQ ID NO: 12, 104, 122, 68 или 88 и полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L), который состоит из последовательности SEQ ID NO: 18, 108, 126, 72 или 92. Указанное антитело может, например, представлять собой антитело 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 или 1E8, как дополнительно описано в данном документе.

Функциональные варианты одной или нескольких указанных выбранных связывающих молекул-кандидатов могут быть созданы с помощью любого из различных способов, хорошо известных в данной области техники. Например, связывающие свойства выбранной связывающей молекулы-кандидата (например, выбранной связывающей молекулы-кандидата, которая содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR) могут развиться в процессе созревания. Например, аффинность связывания может быть модифицирована (увеличена или уменьшена) на стадиях созревания; и/или специфичность связывания может быть модифицирована (как правило, увеличена) на стадиях созревания. Следует понимать, что высокие или повышенные уровни аффинности связывания с US28 не всегда могут быть желательны, в частности, если это происходит за счет неприемлемо высоких уровней аффинности связывания с нецелевыми мишенями, такими как здоровые клетки человека. Связывающие молекулы, включая без ограничения CAR и клетки, экспрессирующие CAR, могут получать преимущество от более низких уровней аффинности связывания, но, как правило, всегда будут получать преимущество от оптимальных уровней специфичности связывания. Примеры процесса созревания обсуждаются выше, в разделе A настоящей заявки.

В тридцать пятом аспекте настоящего изобретения представлен способ получения композиции, которая содержит множество копий связывающей молекулы, при этом указанный способ включает воспроизведение выбранной связывающей молекулы-кандидата, которая была выбрана в соответствии со способом по тридцать четвертому аспекту настоящего изобретения.

В указанном способе, например, можно получать молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты, где молекула нуклеиновой кислоты содержит или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты вместе содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, которые отдельно или в комбинации кодируют выбранную связывающую молекулу-кандидата. Указанный способ может, например, включать

экспрессию указанной молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты, например, в рекомбинантной клетке или популяции клеток, трансформированных указанной молекулой нуклеиновой кислоты, или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты. Такую экспрессию можно использовать для получения дополнительных копий выбранной молекулы-кандидата.

Необязательно указанную выбранную молекулу-кандидат впоследствии выделяют и/или очищают и/или составляют, например, в форме фармацевтически приемлемой композиции.

Необязательно указанную выбранную молекулу-кандидата конъюгируют, например, в соответствии с описанием конъюгатов, как обсуждалось в разделе А настоящей заявки.

В тридцать шестом аспекте настоящего изобретения представлен способ оценки выбранной связывающей молекулы-кандидата, которая была выбрана в соответствии со способом по тридцать четвертому аспекту настоящего изобретения и/или получена в соответствии со способом по тридцать пятому аспекту настоящего изобретения, при этом указанный способ включает и идентифицирует структуру(ы) внутри выбранной связывающей молекулы-кандидата, которая обеспечивает ее характеристики связывания (в частности, специфичность связывания и/или аффинность связывания в отношении эпитопа во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV)).

Например, стадию идентификации структуры(тур) внутри выбранной связывающей молекулы-кандидата, которая обеспечивает ее связывающие характеристики, может включать идентификацию и/или секвенирование указанной или каждой вариабельной легкой и/или вариабельной тяжелой области в выбранной связывающей молекуле-кандидате, которая представляет собой антитело или CAR.

В качестве дополнения или в качестве альтернативы стадия идентификации структуры(тур) внутри выбранной связывающей молекулы-кандидата, которая обеспечивает ее связывающие характеристики, может включать идентификацию и/или секвенирование указанной или каждой области CDR в выбранной связывающей молекуле-кандидате, которая представляет собой антитело или CAR.

Способы идентификации вариабельных областей легкой и/или тяжелой цепей, а также идентификации постоянно CDR, хорошо известны в данной области техники и могут применяться специалистами с использованием обычных методик.

Например, последовательность вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей (V_H и V_L) антитела может быть определена на основе кДНК тяжелой и легкой цепи, синтезированной из соответствующей мРНК с помощью методик, общеизвестных в данной области техники. Затем области CDR могут быть определены известным в данной области техники методикой. Например, области CDR можно определить с использованием метода Kabat (Wu and Kabat, J. (1970) *J. Exp. Med.* **132**, 211). CDR можно определить с помощью структурного анализа с использованием методик рентгеновской кристаллографии или молекулярного моделирования. Составной CDR можно определить как содержащий все остатки в одном CDR и все остатки в соответствующей гипервариабельной области. Эти составные CDR вместе с некоторыми выбранными остатками из каркасной области предпочтительно идентифицируют как переносимые «антигенсвязывающие сайты». Другие хорошо известные способы идентификации последовательностей CDR включают схему нумерации Chothia (например, как описано в Al-Lazikani *et al.*, *JMB*, 1997, **273**: 927-948) или схему нумерации Martin (усиленная схема Chothia).

CDR связывающих молекул и полипептидов по настоящему изобретению определяли с использованием метода Kabat. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5 или 6 CDR полипептида или связывающей молекулы по настоящему изобретению определяли с использованием метода Kabat. Кроме того, если последовательности CDR не были охарактеризованы, для специалиста является обычным делом определить один или несколько CDR, когда они снабжены полноразмерными легкими и/или тяжелыми вариабельными цепями, с использованием обычных способов (таких как вычислительный алгоритмы или анализы мутаций/связывания).

В тридцать седьмом аспекте настоящего изобретения представлен способ получения композиции, которая содержит множество копий связывающей молекулы, имеющей специфичность связывания и/или аффинность связывания с эпитопом во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV), где указанная связывающая молекула содержит указанную или каждую из структуры(тур) (например, последовательностей CDR или указанных последовательностей), которые были идентифицированы в выбранной связывающей молекуле-кандидате как обеспечивающие ее характеристики связывания, в соответствии со способом по тридцать шестому аспекту настоящего изобретения, где указанный способ включает воспроизведение связывающей молекулы.

В тридцать седьмом аспекте настоящего изобретения дополнительно представлена композиция связывающей молекулы, полученная с помощью того же аспекта, например, фармацевтически приемлемая композиция. Указанные связывающие молекулы или их композиции затем можно использовать любым способом, обсуждаемым в данном документе в контексте связывающих молекул для первого аспекта настоящего изобретения.

****

Все способы, раскрытые и заявленные в данном документе, могут быть реализованы без чрезмерного экспериментирования в свете настоящего изобретения. Хотя композиции и способы по настоящему изобретению были описаны с точки зрения предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области техники будет очевидно, что к способам и стадиям или последовательности стадий описанного способа можно применять изменения без отклонения от концепции, сущности и объема настоящего изобретения. Более конкретно, будет очевидно, что определенные средства, которые являются как химически, так и физиологически родственными, могут быть заменены средствами, описанными в данном документе, при этом будут достигнуты такие же или подобные результаты. Считается, что все подобные замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, находятся в пределах сущности, объема и концепции изобретения, определенных прилагаемой формулой изобретения.

Далее настоящее изобретение будет описано с помощью следующих неограничивающих примеров.

Примеры

Пример 1

Способы

Человеческие материалы и этические стандарты

Все тканевые материалы собирают в соответствии с наиболее высокими этическими стандартами, включая утверждение протоколов местных этических комитетов, а также информирование донора и подписание согласия информатора. Биоптаты собирали во время стандартной медицинской помощи, и результаты не могут быть отслежены до отдельных доноров. Все ткани человека собирают в соответствии с протоколами, утвержденными HIPPA. Все человеческие образцы давали отрицательный результат на HIV и гепатит B и были одобрены для разработки коммерческого продукта.

Животные

Мышей BABL/c содержали в виварии в соответствии с рекомендациями Creative Biolabs Inc. Ширли, Нью-Йорк 11967, США. Все эксперименты на животных проводили в соответствии с рекомендациями по уходу и научному использованию животных Министерства сельского хозяйства США (USDA).

Иммунизация

Для ECD3 US28 HCMV химическим синтезом получали два пептида: пептид-1: TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6); пептид-2: TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7). Для повышения иммуногенности гемоцианин лимфы улитки (KHL) связывали с N-концом исходных пептидов. Пептиды, конъюгированные с KLH, обозначали KLH-пептид-1 и KLH-пептид-2 соответственно, и их использовали для иммунизации. Анализ масс-спектрометрии (MS) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) продемонстрировал, что два KLH-связанных пептида были высоко пригодны для иммунизации. Кроме того, получали биотинилированные пептиды, которые в дальнейшем использовали для скрининга антител. Вкратце, биотин добавляли к N-концу исходных пептидов, которые переименовывали в биопептид-1 и биопептид-2 соответственно.

Пять мышей (№10-15) иммунизировали пептидами 1 и 2. Иммунизацию повторяли каждые 14 дней. Каждую мышь одновременно иммунизировали 30 мкг KLH-пептида-1 и 30 мкг KLH-пептида-2 в сочетании с полным адъювантом Фрейнда в качестве начальной иммунизации. Начиная с 2-й иммунизации, каждая мышь получала совместную иммунизацию 30 мкг KLH-пептида-1 и 30 мкг KLH-пептида-2 в сочетании

с неполным адъювантом Фрейнда. После 3-й бустерной дозы собирали антисыворотку и исследовали иммунный ответ с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), показавшего положительный сигнал против пептида-1 и пептида-2 соответственно. После 4-й бустерной дозы антисыворотку собирали, и антисыворотка демонстрировала повышенный положительный сигнал против пептида-1 и пептида-2 соответственно. Титр достигал более 40000 у мышей №11, №13, №14 и №15 и более 10000 у мышей №12.

В отличие от этого, иммунизация четырех мышей (№16, №17, №18 и №19) KHL-связанными пептидами HCMV US28 ECD2 и ECD4: QYLLDHNSLAS и DTLKLLKWISSSCE, приводила к образованию низких титров антител, если таковые вообще были, с протоколом повторной ревакцинации, аналогичным описанному выше. Анализ MS и HPLC дополнительно подтвердил низкую иммуногенность этих пептидов для иммунизации. Эти данные показывают, что может быть сложно идентифицировать достаточно иммуногенную часть белка US28 HCMV, даже внутри последовательностей внеклеточных доменов. Эффективность пептидов, происходящих из ECD3, по сравнению с неэффективностью пептидов, происходящих из ECD2 и ECD4, априори нельзя было предсказать.

Гибридомные культуры

Учитывая результаты ELISA антисыворотки, мышей №13 и №14 выбирали для слияния клеток. Селезенки мышей №13 и №14 собирали через 5 дней после 5-й бустерной вакцинации с помощью i.v. инъекции 100 мкг KLH-пептида-1 и 100 мкг KLH-пептида-2 соответственно. Клетки селезенки сливали с клетками миеломы с использованием полиэтиленгликоля (PEG) 1500 (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, 64293 Дармштадт, Германия). Затем слитые клетки высевали в 96-луночные планшеты и культивировали в полутвердой среде в присутствии реагента переноса атома водорода (HAT) (кат. номер 21060017, Thermofisher, Уолтхем, Массачусетс 02451, США). Валидацию QC-ELISA проводили в отношении биопептида-1 и 2. При 1-м скрининге против пептида-1 (покрывающего биопептид-1) тестировали 960 одиночных клонов и идентифицировали 26 положительных клонов. 32 клона (включая 26 положительных клонов, указанных выше) дополнительно изучали во время 2-го скрининга для идентификации клонов, которые специфически распознают как пептид-1, так и пептид-2. При 2-м скрининге идентифицировали 18 положительных клонов.

Субклонирование проводили для 10 клонов методом лимитирующего разведения. По 5 клонов от мышей №13 и №14 отбирали на основе титра ELISA на этапе скрининга

слияния клеток: мышь №13: 1C10, 3H9, 4C10, 4F1 и 5G6; мышь №14: 1F12, 2C2, 3D11, 4F11 и 5H11. Валидацию QC-ELISA проводили в отношении биопептида-1. Идентифицировали 8 положительных клонов, связывающихся с пептидом 1, среди которых 6 клонов были моноклональными. Чтобы идентифицировать более специфические клоны, субклонирование проводили для оставшихся 8 клонов мыши №14: 1D2, 1B9, 1H3, 2E3, 2G8, 2G12, 3A1 и 4E4. Валидацию QC-ELISA проводили в отношении биопептида-1. Идентифицировали 7 положительных клонов, связывающихся с пептидом 1, среди которых 4 клонов были моноклональными. Среди этих 10 моноклональных клонов дополнительные валидации показали превосходные связывающие свойства для клона US28-13-5G6-1D3, который был выбран для дальнейших исследований. Однако дополнительно изучали и клоны 13-1C10-1C10, 13-1C10-1G9, 14-IH3-IA10, 14-2C2-1G4 и 14-4E4-1E8.

Секвенирование клона US28-13-5G6-1D3

Сервис секвенирования гибридом Creative Biolabs (Ширли, Нью-Йорк 11967, США) использовали для получения информации о последовательностях антител US28-13-5G6-1D3, 13-1C10-1C10, 13-1C10-1G9, 14-IH3-IA10 и 14-4E4-1E8. Секвенирование гибридомы относится к процессу получения информации о последовательности, касающейся кДНК, кодирующей вариабельные домены тяжелой (VH) и вариабельной области легкой (VL) специфических антител. Перед секвенированием общую мРНК выбранных клеток гибридомы экстрагировали с помощью изолятора РНК (кат. R401-01, Vazyme Biotech, Cellagen Technology LLC, Сан-Диего, Калифорния 92121, США). Способ 5'RACE, описанный Georgious et al., [1] применяли для амплификации, клонирования и секвенирования полных специфических вариабельных областей антитела (VH и VL), а также последовательностей неизменяемых фланкирующих константных областей, которые впоследствии клонировали в два клонирующих вектора для последующих манипуляций с последовательностями и конструирования векторов экспрессии. Затем векторные конструкции секвенировали с использованием метода секвенирования по Сэнгеру и использовали для экспрессии рекомбинантных антител (rAb) в клетках HEK293-F. Антитела очищали хроматографией на белке G и результаты проверяли с помощью SDS-PAGE на агарозном геле.

Другие антитела

Конъюгированное с HRP антитело к HIS заказывали у GenScrip, Пискатауэй, Нью-Джерси 08854 (кат. номер A00612). Конъюгированное с FITC антитело к HIS заказывали у Thermofisher, Уолтхем, Массачусетс 02451, США (кат. MA1-81891). Коммерческий

препарат поликлональных антител к US28, полученный на кроликах, заказывали у Mybiosource, Сан-Диего, Калифорния 92195 (кат. номер MBS9606669). Конъюгированное с Alexa488 Ab к немедленно-раннему антигену CMV заказывали у компаний Merck Life Sciences, Осло, Норвегия (кат. номер MAB810X) и MilliporeSigma, Берлингтон, Массачусетс 01803, США (кат. номер MAB810R). Используемые вторичные антитела и антитела для контроля изотипа IgG заказывали у Thermofisher, Осло, Норвегия; конъюгированное с Alexa 488 козье антитело к lgG мыши (кат. номер A11001); конъюгированное с Alexa 488 козье антитело к lgG кролика (кат. номер A11008); изотипический контроль для козьего антитела к lgG мыши (кат. номер 14-4714-82); и козье антитело к lgG кролика (кат. номер MA516384). Моновалентные и бивалентные ScFv VUN100 производили Creative Biolabs из клеток HEK293-F с использованием рекомбинантной технологии.

Лабораторные клетки

Помимо синтеза рекомбинантных антител, клетки яичника китайского хомячка (CHO-K1) (Creative Biolabs, Ширли, Нью-Йорк 11967, США) использовали для сверхэкспрессии белка US28 для изучения поверхностного связывания антител к US28. Линию клеток эмбриональной почки человека 293-F (HEK293-F) использовали для экспрессии рекомбинантного антитела US28-13-5G6-1D3 (rAb) (Creative Biolabs, Ширли, Нью-Йорк 11967, США). Клеточную линию-5 Medical Research Council (MRC-5), полученная из фибробластов легких эмбриона человека (кат. №CCL-171, RRID: CVCL_0440, Американская коллекция типовых культур (ATCC), Манассас, Вирджиния, 20110 США), использовали для изучить связывания антител с поверхностью клеток, инфицированных HCMV. Коммерчески доступные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) получали от трех здоровых серопозитивных доноров (доноры № 509, № 526, № 230, Cellero, Bothell, WA 98021 США).

Первичные клетки

Первичные клетки из разных тканей культивировали в колбах T25, покрытых 3 мл раствора для покрытия на основе желатина (Cellbiologics, 6950), и помещали при 37°C на 1 час. Избыток раствора аспирировали перед посевом клеток. Готовили центрифужную пробирку объемом 15 мл с 6 мл предварительно нагретой полной среды. Первичные клетки, хранившиеся в жидком азоте, быстро размораживали на водяной бане при 37°C в течение <1 минуты и переносили в центрифужную пробирку объемом 15 мл. Клетки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут, затем отбирали супернатант и ресуспендировали осадок клеток в 6 мл полной среды.

Ресуспендированные клетки добавляли в предварительно покрытые колбы T25 и инкубировали во влажном инкубаторе при 37°C с 5% CO_2. Культуральную среду меняли на следующий день для удаления неприкрепившихся клеток и пополнения питательных веществ, повторяя это ежедневно. Когда клетки достигали >85% конфлюэнтности, среду для культивирования клеток удаляли и выбрасывали из колбы. Прикрепленный слой промывали 2 раза стерильным PBS (1X). Клетки инкубировали с 2 мл теплого (37°C) 0,25% раствора трипсин-EDTA в течение 3 минут. Как только клетки отделялись, добавляли 8 мл полной среды для нейтрализации трипсина, а затем помещали в свежие колбы, предварительно покрытые раствором для покрытия на основе желатина, в увлажненном инкубаторе с 5% CO_2 при 37°C. На следующий день культурную среду меняли для удаления неприкрепившихся клеток, и клетки ежедневно проверяли под микроскопом для проверки соответствующей морфологии клеток. Анализ FACS проводили, как описано в данном документе.

Конструкции экспрессии US28

Плазмидную конструкцию осуществляли для создания линии US28-сверхэкспрессирующих клеток. Последовательность US28, идентичную штамму DB HCMV (номер доступа: KT959235; SEQ ID NO. 5 настоящей заявки), слитую с меткой 6His на ее C-концевой части, вставляли в вектор pCDH-EF1a-MCS (Creative Biolabs, Ширли, Нью-Йорк 11967, США). Плазмидную конструкцию трансфицировали в клеточную линию CHO-K1. Клетки собирали через 48 часов после трансфекции. Клеточная линия назвали CHO-US28-A1-6His, и ее белковая последовательность (SEQ ID NO: 47) является следующей:

MTPTTTTAELTTEFDYDEAATPCVFTDVLNQSKPVTLFLYGVVFLFGSIGNFLV
IFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLASVPCTLLT
ACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIFWWIFAVIIAIPHF
MVVTKKNNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIPLSVISYCYYRISRIVAV
SQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDTLKLLKWISSSCEFERSLKRA
LILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMS
FSRRSSPSRRETSSDTLSDEVCRVSQIIPAAALEGSHHHHHH.

Плазмиды, несущие ДНК штамма TB40/E и мутантного US28 (SEQ ID NO: 254 и 255 соответственно), также изготавливали аналогичным образом.

SEQ ID NO: 177:

MTPTTTTTELTTEFEYDLGATPCTFTDVLNQSKPVTLFLYGVVFLFGSVGNFLV
IFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLASVPCTLLT

ACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIFWWIFAVIIAIPHF
MVVTKKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIPLSVISYCYYRISRIVAV
SQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDTLKLLKWISSSCEFERSLKRA
LILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMS
FSRRSSPSRRETSSDTLSDEVCRVSQIIPAAALEGSHHHHHH.

SEQ ID NO: 178:

MTQTTTTELTTEFDYDLGAALCTLTDVLNQSKPITLFLYGVVFLFGSIGNFLVIF
TITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLASVPCTLLTA
CFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIFWWIFAVIIAIPHFM
VVTKKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIPLSVISYCYYRISRIVAVS
QSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFLDTLKLLKWISSSCESEKSLKRAL
ILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMSF
SRRSSPSRRETSSDTLSDEVCRVSQIIPAAALEGSHHHHHH.

Инфицирование клеток MRC-5 HCMV

Фибробласты легких эмбриона человека MRC-5, пассажи 21-30, трипсинизировали и 1×10^6 клеток на колбу T75 высевали в модифицированную Дульбекко среду Игла (DMEM), дополненную 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS), 2 мМ L-глутамина, 0,1 мМ заменимых аминокислот, 10 мМ HEPES и 100 ед/мл пенициллина и стрептомицина. Клетки либо оставляли неинфицированными (имитационный контроль), либо инфицировали штаммом Ad169 HCMV (ATCC® VR538™, ATCC, Вирджиния 20110, США) при множественности заражения (m.o.i.), составляющей 5. После добавления вируса к соответствующим клеткам клетки инкубировали при 37°C с 5% CO_2 до сбора клеток в день 4 после инфицирования (p.i.) (96 часов pi). Инфекцию подтверждали микроскопией.

Иммуноферментный анализ (ELISA)

Лунки микротитровального планшета покрывали 100 мкл раствора, содержащего биопептид-1 и биопептид-2 в концентрации 1-10 мкг/мл в покровном буфере, состоящем из Na_2CO_3, 1,5 г и $NaHCO_3$, 2,93 г в 1 л дистиллированной воды с pH 9,6, затем инкубировали в течение 1-2 часов при комнатной температуре. Планшет промывали 3 раза буфером для промывания, состоящим из PBS, содержащего 0,05% обеъм/объем Tween-20, и после этого промокали бумажными полотенцами. В каждую лунку добавляли 150 мкл блокирующего раствора, содержащего фосфатно-солевой буфер (PBS), содержащий 1% масса/объем BSA, и планшет инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Лунки промывали 4 раза буфером для промывания и после последней промывки

промокали на бумажных полотенцах. В каждую лунку добавляли по 100 мкл разведения антител и планшет инкубировали в течение 1 часа при 37°C, а затем промывали 3 раза буфером для промывания. В каждую лунку добавляли 100 мкл конъюгированных с ферментом вторичных антител (соответствующим образом разведенных в буфере для промывания) и планшет инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Затем лунки снова промывали 3 раза буфером для промывания и промокали бумажными полотенцами после последней промывки. В каждую лунку добавляли по 100 мкл соответствующего раствора субстрата и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут или до достижения желаемого изменения цвета. Значения поглощения немедленно считывали при соответствующей длине волны и данные анализировали с помощью CMax Plus, Molecular Devices, Сан-Хосе, Калифорния 95134, США.

Вестер-блоттинг

Вестерн-блоттинг использовали для проверки экспрессии белка US28 в клетках CHO-US28-A1-6His. Собранные клетки и клетки CHO отрицательного контроля US28 дважды промывали PBS и добавляли ледяной лизирующий буфер RIPA с 1% PMSF. Прикрепившиеся клетки аккуратно соскабливали с чашки с помощью пластикового скребка для клеток и клеточную суспензию переносили в предварительно охлажденную микроцентрифужную пробирку, которую перемешивали в течение 30 мин при 4°C. Затем пробирки центрифугировали и супернатант аспирировали в свежую пробирку. Концентрацию белка в пробирках определяли методом BCA. В равном объеме добавляли 2X буфер Лэммли, состоящий из 4% SDS, 10% 2-меркаптоэтанола, 20% глицерина, 0,004% бромфенолового синего и 0,125 M Tris-HCl. Образцы восстанавливали и денатурировали путем кипячения лизатов в буфере для образцов. Готовили полиакриламидный гель (12%) и *30-120 мкг белка каждого образца загружали* в лунки для электрофореза в SDS-PAGE. Белковый маркер загружали на первую дорожку. Электрофорез проводили с 1x рабочим буфером, состоящим из 25 мМ Tris-основания, 250 мМ глицина, 0,1% SDS, доведенного до pH 8,3, в течение 30 минут при напряжении 80 В и 1,5 часов при напряжении 100 В. Мембрану из поливинилидендифторида (PVDF) готовили путем смачивания ее в метаноле в течение 30 секунд, а затем кратковременного вымачивания в дистиллированной воде с последующим добавлением 1X буфера для переноса, который содержит 25 мМ Tris-основания, 192 мМ глицина, 20% метанола, доведенного до pH 8,3. Затем белки переносили на мембрану из PVDF мокрым сэндвич-методом в транспортной кассете. Мембрану промывали 1X Tris-буферным солевым раствором и раствором Tween 20 (TBST) и инкубировали в блокирующем растворе,

содержащем 1X TBST и 10% обезжиренное сухое молоко. Затем первичное антитело разводили до рабочей концентрации в 1X TBST с 5% обезжиренным сухим молоком и инкубировали в течение 1,5 часов при комнатной температуре. Мембрану трижды промывали 1X TBST и добавляли вторичное антитело с помощью той же процедуры инкубации и промывки, как описано выше Предварительно смешанный раствор хемилюминесцентного субстрата (Thermofisher, Уолтхем, Массачусетс 02451, США, кат. 34075) добавляли на мембрану, которую затем визуализировали с помощью системы хемилюминесцентной визуализации (BIO-RAD ChemiDocXRS+, Bio-Rad, Hercules, CA 94547, США). в течение 1–90 секунд.

Анализ на основе проточной цитометрии (FACS)

Проточную цитометрию использовали для анализа связывания антител к US28 с клеточной поверхностью. После сбора клеток прикрепившиеся неинфицированные и US28-сверхэкспрессирующие клетки или инфицированные HCMV клетки трижды промывали буфером для окрашивания клеток (фосфатно-солевой буфер (PBS (Amresco, Кливленд, Огайо 44139, США), добавлял 0,5% BSA и 0,05% азида натрия (NaN_3)). Клетки трипизинизировали, а затем ресуспендировали в DMEM с 10% FBS для ингибирования действия трипсина. Затем клетки осаждали при 400 x g в течение 10 минут и трижды промывали в буфере для окрашивания клеток. Жизнеспособность клеток и концентрацию клеток определяли с помощью анализа жизнеспособности с трифановым синим и счетчика клеток (Countess, Invitrogen, Карлсбад, Кафлифорния 92008, США). Клеточную суспензию доводили до 1 x 10^6 клеток/мл с помощью ледяного буфера для окрашивания клеток. Клетки блокировали в 1 мл *10% FBS или 1% BSA* в PBS на 1×10^6 клеток, кратковременно перемешивали и инкубировали в течение 10-30 минут для устранения неспецифического окрашивания. Затем клетки окрашивали соответствующими антителами и соответствующими отрицательными контролями.

В качестве первичных использованных антител были I) 13-5G6-1D3 от 1:50 до 50 мкг/мл; и II) коммерческое поликлональное антитело US28 (50 мкг/мл), III) моновалентные и бивалентные ScFv VUN100 (50 мкг/мл), и для некоторых экспериментов включали соответствующие контрольные изотипы.

Антитела добавляли к клеткам, перемешивали и инкубировали на льду от 15 до 30 минут до ночи и дважды промывали буфером для окрашивания клеток для удаления любых несвязавшихся антител. Кроме того, в одном из экспериментов для проверки клеток, инфицированных HCMV, включали конъюгированное с Alexa488 Ab, MAB810X,

1:50. Поскольку оно связывается с внутриклеточным белком, кодируемым HCMV, его добавляли после проницаемости клеток в 70% этаноле в течение 30 минут на льду.

1:500-1:5000 в буфере для окрашивания клеток соответствующих флуоресцентно-конъюгированных вторичных антител: (I) конъюгированное с Alexa 488 козье антитело к lgG мыши; и (II) конъюгированное с Alexa 488 козье антитело к lgG кролика добавляли и инкубировали на льду в течение 15-20 минут в темноте. Клетки промывали три раза для удаления несвязавшихся антител. Затем клетки фиксировали 0,5% параформальдегидом (PFA) в течение 30 минут на льду и ресуспендировали в 200-500 мкл буфера для окрашивания клеток для окончательного анализа на основе проточной цитометрии с использованием системы проточной цитометрии Accuri C6 (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния 95131, США). Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения FlowJo v8.8 (Treestar Inc. Эшленд, Орегон 97520, США).

Массивы залитых парафином человеческих тканей

Контрольные предметные стекла с цитомегаловирусом (CMV), содержащие CMV-положительную легочную ткань и CMV-отрицательный миометрий (продукта № 3240A), получали от Newcomer Supply Inc., Миддлтон, Висконсин, 53562-2579, США. Тканевые микроматрицы (TMA) получали от US Biomax Inc., Дервуд, MD 20855, США, и включали опухолевые ткани № BR1008b, №BS17016c, №BCN721b и нормальные ткани №FDA662a и ткани сердца №HEN241a.

Иммуногистохимический анализ (IHC)

Парафиновые срезы последовательно погружали в a. 100% ксилол трижды (по 5 мин); b. 100% этанол дважды (по 2 мин); c. 95% этанол дважды (по 2 мин). Предметные стекла дважды промывали водой в течение 5 минут для удаления этанола. Для извлечения антигена предметные стекла погружали в 3% H_2O_2 на 5 минут, а затем дважды (2 раза) промывали дистиллированной водой. Затем предметные стекла погружали в рабочий цитратный буфер (pH 6,0) и закрывали крышкой. Буфер нагревали в микроволновой печи до закипания, а затем выдерживали в пароварке 15 мин.

Срезы охлаждали при комнатной температуре в течение 30 мин и промывали PBS. Затем к образцам, обработанным HIER, добавляли 5% раствор, блокирующий BSA, и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Первичное антитело разводили в соответствии с лучшими результатами тестов на градиент разбавления и добавляли к образцам для инкубации в течение ночи при 4°C или 37°C в течение 1 часа. Затем предметные стекла трижды промывали PBS на шейкере. Вторичные антитела использовали в разведении

1:200, добавляли к образцам и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Слайды промывали три раза (по 5 минут) в PBS на шейкере. Добавляли реагенты, конъюгированные с HRP- или AP-стрептавидин-биотиновым комплексом (SABC), и образцы инкубировали в темноте при комнатной температуре. После этого образцы промывали дистиллированной водой, окрашивали гематоксилином, затем обезвоживали градиентом этанола от 70% до 100% и просветляли 3 раза в ксилоле по 5 мин каждый. Предметные стекла устанавливали ACRYMOUNT (StatLab, MicKinney, TX 75069, США) и закрыты покровными стеклами. Оцифрованные изображения делали сканером Olympus VS120 и анализировали с помощью программного обеспечения OlyVia 3.2 (Olympus Corporation, 20101 Токио, Япония) старшим патологоанатомом.

Гибридизация in situ (ISH)

Зонд CMV ISH (кат. №: ISHP-031, Creative Bioarray) предназначен для обнаружения ДНК цитомегаловируса (CMV) в фиксированных формалином и залитых в парафин тканях или клетках методом хромогенной гибридизации in situ (CISH). Зонд CMV метили дигоксином с использованием методов NICK с вектором гена CMV IE1.

Предметные стекла сначала предварительно обрабатывали путем прокаливания при 85°C в течение 15 минут, после чего стекла дважды погружали в свежий ксилол при к.т. на 5 минут. Затем предметные стекла обезвоживали в 100%, 85%, 75% этаноле при комнатной температуре в течение 3 минут каждый и погружали в PBS на 2 минуты.

После этого предметные стекла предварительно обрабатывали протеазой путем погружения их в 0,2 M HCl на 12 минут. Добавляли 0,5% Triton X-100 в PBS и предметные стекла инкубировали в течение 12 минут. Предметные стекла дважды промывали 1X PBS в течение 2 минут, затем погружали в 20 мкг/мл протеиназы K на 15 минут, затем снова дважды промывали 1X PBS в течение 2 минут. После этого предметные стекла погружали в 3% H_2O_2 на 15 минут, дважды промывали 1X PBS в течение 2 минут и сушили на воздухе.

Для приготовления зонда, содержащего гибридизационный буфер, 1 мкл исходного раствора зонда добавляли к 50 мкл гибридизационного буфера, а затем перемешивали на встряхивании и центрифугировали. Зонд ISH денатурировали в течение 10 минут при 85°C и выдерживали при 37°C в течение 30 минут. После высыхания предметных стекол в течение более 90 минут на срезы ткани предметных стекол наносили 200 мкл буфера для гибридизации, содержащего зонд. Чистое прямоугольное покровное стекло размером 24 x 60 мм осторожно помещали на раствор для гибридизации, чтобы полностью покрыть срезы ткани и обеспечить равномерное

распределение раствора для гибридизации. Предметные стекла помещали в увлажненную камеру, накрывали крышкой для культуры ткани, а камеру закрывали парафином. Предметные стекла инкубировали в темноте при 37°C в течение 20-36 часов.

Промывание *in situ* осуществляли после удаления покровных стекол со срезов путем погружения предметных стекол на 5 минут в 2 x SSC. Предметные стекла инкубировали с 3% раствором BSA при 37°C в течение 30 минут, а затем с раствором антитела к DIG-HRP (разбавленным 1:100 в 1% BSA) при 37°C в течение 30 минут. Затем предметные стекла сначала дважды промывали 2 X SSC в течение 2 минут, а затем дважды 1 X PBS в течение 5 минут. После этого предметные стекла инкубировали с раствором DAB в течение 2-10 минут и промывали проточной водопроводной водой. Предметные стекла погружали в гематоксилин для контрастного окрашивания на 3-5 минут и снова промывали проточной водопроводной водой. В заключение предметные стекла обезвоживали в 100% этаноле при комнатной температуре в течение 1 минуты, сушили на воздухе, а затем погружали в ксилол при к.т. на 10 минут. Для закрепления срезов использовали водный раствор для закрепления.

Светлопольные изображения получали с использованием микроскопа Nikon 80I, оснащенного объективом 40x.

Результаты

Конструирование антител

Белок US28, кодируемый HCMV, имеет 4 внеклеточных домена (ECD), среди которых 2-й и 3-й ECD, а также части 4-го ECD высококонсервативны между различными штаммами HCMV. В отличие от этого, N-концевая часть (ECD1) HCMV US28 содержит частые мутации (например, различные идентифицированные мутации N-концевой области показаны в таблице 3 настоящей заявки), и поэтому определили, что ECD1, как правило, не является подходящим иммуногеном для разработки антител против белка US28, кодируемого HCMV, которые высокоспецифичны к US28, но при этом являются агностическими в отношении штамма.

Повторная иммунизация мышей 5 бустерными вакцинациями KHL-связанных пептидов HCMV US28 ECD2 и ECD4 неожиданно приводила к низким титрам антител, если таковые вообще имелись. Низкое качество иммунизации этими пептидами подтверждали анализами MS и HPLC.

Для разработки пептидов, полученных из ECD3, для иммунизации рассматривали генетические вариации между различными штаммами HCMV. Использовали поиск BLAST, и выявили существование одной вариации D-N в 4-й аминокислоте US28 ECD3.

90% из 100 случайно выбранных клинических штаммов HCMV содержали 4D-вариант US28 ECD3, тогда как 10% имели 4N-вариант US28 ECD3. Среди штаммов, демонстрирующих 4N-вариант US28 ECD3, были клинические штаммы DB HCMV (номер доступа: KT959235), TR (номер доступа: KF021605.1) и лабораторный штамм Toledo (номер доступа: GU93774) (таблица 1), все из которых, судя по их последовательности US28, несут генотип штамма HCMV A1 [2].

Пептид-1 и пептид-2 ECD3 HCMV US28 (SEQ ID NO: 6 и 7 соответственно), содержащие оба генетических варианта, выбирали в качестве иммуногенов для дальнейшей разработки штамм-независимых антител, которые могли бы распознавать генотипы 4N и 4D у иммунизированных мышей. Из общего числа >1000 клонов гибридомы, идентифицированных у пяти иммунизированных мышей, получали 32 положительных клона, из которых идентифицировали 18 положительных клонов, специфически распознающих как пептиды-1, так и пептиды-2. Их субклонирование привело к получению 15 положительных клонов, которые, как было идентифицировано, связываются с биопептидом 1, среди которых 10 клонов были моноклональными.

Связывающие свойства клонов антитела к US28

Для тестирования полученных десяти клонов моноклональных антител к US28 HCMV создавали клеточную линию со сверхэкспрессией белка US28 путем вставки последовательности ДНК, кодирующей US28 из штамма DB HCMV, с С-концевой меткой 6His (аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 47) в вектор pCDH-EF1a-MCS и затем трансфекции векторной конструкции в клетки CHO-K1. US28-сверхэкспрессирующие клетки впоследствии обозначали клетками CHO-US28-A1.

Эффективную экспрессию белка US28 в трансформированных клетках CHO-US28-A1 проверяли с помощью вестерн-блот-анализа с использованием связывания антитела к HIS с меткой 6HIS, которую добавляли к С-концевой части белковой конструкции US28-A1. Антитело к HIS маркировало специфическую полосу при ~41 кДа, которая эквивалентна ранее сообщенному размеру белка HCMV US28 и которая не присутствовала на контрольных клетках CHO, что указывает на экспрессию белка US28 в трансфицированных клетках CHO-US28-A1, но не в контрольных клетках CHO (фиг. 1).

Анализ FACS полученных десяти клонов моноклональных антител (в разведении Ab 1:50 масса/объем) проводили для измерения поверхностного связывания этих клонов с трансмембранным белком US28 HCMV на поверхности клеток CHO-US28-A1. Клон US28-13-5G6-1D3 показал лучшие результаты связывания, которые превосходили

(связывание в ~8-10 раз больше с клетками CHO-US28-A1) любой из других 9 клонов (данные не показаны). Отрицательные контроли без каких-либо антител и только с вторичными антителами мышей считались отрицательными (фиг. 2)

Положительное поверхностное связывание клона US28-13-5G6-1D3 с клетками CHO-US28-A1 дополнительно подтверждали градиентным разбавлением (1:20, 1:50, 1:200, выражено как масса/объем), демонстрируя прямую корреляцию для связывания антитела (фиг. 3). В нескольких экспериментах подтверждали, что поверхностное связывание с контрольными клетками CHO является низким (в >15 раз меньшее связывание), что указывает на то, что связывание клона Ab US28-13-5G6-1D3 с поверхностью US28-экспрессирующих клеток CHO было высокоспецифичным (фиг. 4).

Исходный анализ ELISA показал равную качественную аффинность связывания клонов антител US28-13-5G6 как с пептидом-1 (генотип 4N US28 ECD3), так и с пептидом-2 (генотип 4D US28 ECD3) (фиг. 5). Эти результаты показывают, что созданный клон антитела US28-13-5G6-1D3 может хорошо и специфично связываться с поверхностью сверхэкспрессирующих белок US28 HCMV клеток CHO, и что связывание антитела US28-13-5G6-1D3 с его мишенью является агностическим в отношении штамма HCMV.

Создание и валидация rAb US28-13-5G6-1D3

Чтобы обеспечить рекомбинантное производство антитела US28-13-5G6-1D3, секвенировали клон гибридомы, кодирующий US28-13-5G6-1D3. Идентифицировали следующие последовательности антитела US28-13-5G6-1D3 со ссылкой на идентификационные номера последовательностей (SEQ ID NO), описанные ниже:

		Последовательность ДНК	Белковая последовательность
Полная тяжелая цепь (включая лидерную последовательность)		SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 20
Полная легкая цепь (включая лидерную последовательность)		SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 21
Цепь V_H	Незрелая	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 11
	Зрелая	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 12
Цепь V_L	Незрелая	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO:17
	Зрелая	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 18

V_H-CDR1	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 8
V_H-CDR2	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 9
V_H-CDR3	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 10
V_L-CDR1	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 14
V_L-CDR2	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 15
V_L-CDR3	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 16

Последовательности, соответствующие указанным выше SEQ ID NO, приведены в разделе настоящей заявки под заголовком «Последовательности», который следует за разделом «Примеры».

Анализ секвенирования показал, что подтип US28-13-5G6-1D3, скорее всего, представляет собой IgG1 каппа. Последовательности ДНК US28-13-5G6-1D3 встраивали в два вектора клонирования и трансфицировали в клеточную линию HEK293-F для рекомбинантного производства. Связывание полученного продукта рекомбинантного антитела rAb US28-13-5G6-1D3 тестировали для биопептидов 1 и 2 с помощью качественного ELISA, снова показав равную, сильную и высокую аффинность связывания с обоими генетическими вариантами US28 ECD3, что подтверждает, что рекомбинантное антитело также демонстрирует агностические в отношении HCMV свойства (фиг. 6).

После этого подтверждали поверхностное связывание rAb 13-5G6-1D3 с клетками CHO-US28-A1 и сравнивали с антителами из других клонов-кандидатов гибридомы (культура 13-5C6-1B5, 13-5G6-1D3, 13-4C10-1D8, 14-1H3-1A6, 14-2C2-1A7, 14-2E3-1A12, 14-4E4-1B3) (данные не показаны). Подобно результатам более ранних испытаний с антителом из клона 13-5G6-1D3, результаты показывают наибольшее связывание rAb 13-5G6-1D3 с клетками CHO-US28-A1.

Дальнейшая проверка FACS поверхностного связывания rAb 13-5G6-1D3 с клетками CHO-US28-A1 и с соответствующими контрольными клетками CHO в разведениях 1:10, 1:50 и 1:100 (масса/объем) показала, что rAb 13-5G6-1D связывается на поверхности 16,55% US28-экспрессирующих клеток, и что оптимальное разведение для окрашивания, которое тестировали для rAb 13-5G6-1D3, составляет 1:50 (масса/объем). Поверхностное связывание rAb 13-5G6-1D с контрольными клетками CHO измеряли при разведении 1:10 (масса/объем), при этом это высокая концентрация, которая должна улучшить обнаружение любого неспецифического связывания, но как

было показано, оно связывается только с 0,77% контрольных клеток CHO после удаления связывания с контрольными холостыми и вторичными конъюгированными с Alexa 488 антителами к lgG мыши (фиг. 7). Эти результаты, показывающие более чем в 21 раз более высокое поверхностное связывание, полностью соответствуют другим результатам по специфичности, которые получали с клоном Ab 13-5G6-1D3 на клетках US28-экспрессирующих CHO, по сравнению с контрольными клетками CHO (фиг. 4). Несколько других клонов антител, которые создавали против ECD3 US28, также показали высокую специфичность к US28-экспрессирующим клеткам (в диапазоне от коэффициента специфичности примерно от 11 раз до 26 раз большего связывания с клетками US28-экспрессирующими CHO по сравнению с уровнем связывания, наблюдаемым против US28-отрицательных контрольных клеток CHO), что подтверждает, что пептиды ECD3 являются специфической мишенью для антител, связывающих US28 (таблица 2).

Связывание rAb US28-13-5G6-1D3 с инфицированными HCMV клетками MRC-5

Затем изучали, способно ли rAb US28-13-5G6-1D3 специфически связываться с поверхностью инфицированных HCMV клеток. Известно, что HCMV проникает, реплицируется и вызывает литические инфекции в фибробластах человека [3]. Поэтому инфицировали человеческие клетки MRC-5 лабораторным штаммом HCMV Ad169 через 5 m.o.i. и собирали клетки в день 4 p.i. (96 hpi). Инфицированные клетки демонстрировали типичные признаки литической инфекции HCMV (цитомегало, характеризующееся плоскими, набухшими клетками) в большинстве клеток, что наблюдалось при микроскопии.

Поверхностное связывание rAb US28-13-5G6-1D с инфицированными Ad169 HCMV клетками сравнивали с инфицированными клетками, окрашенными соответствующим контролем изотипа IgG, а также с неинфицированными культивируемыми клетками MRC-5 (имитационный контроль) с использованием анализа проточной цитометрии. Результаты показали специфическое связывание rAb US28-13-5G6-1D на поверхности инфицированных HCMV Ad169 клеток MRC-5, но не на клетках имитационного контроля (фиг. 8-9).

Для того, чтобы контролировать то, что rAb 13-5G6-1D связывается с поверхностью популяции инфицированных HCMV клеток, другой набор инфицированных HCMV Ad169 и имитационным контролем клеток пермеабилизировали и окрашивали коммерческим антителом MAB810X против

основного немедленно-раннего (IE) антигена HCMV, который представляет собой внутриклеточный белок, который, как известно, экспрессируется на ранних стадиях литической инфекции HCMV. Антитело MAB810X окрашивало ту же популяцию инфицированных HCMV клеток MRC-5, что и rAb US28-13-5G6-1D3 в анализе FACS, чего не наблюдалось для неинфицированных клеток ни для одного из антител, подтверждая, что поверхностное связывание продемонстрировали для rAb US28-13-5G6-1D3 было специфическим для инфицированных HCMV клеток (фиг. 8A и B).

Неспецифическое связывание rAb US28-13-5G6-1D3 тестировали с использованием неимуннной сыворотки, полученной у мыши (контрольный изотип IgG), вместо первичного антитела перед инкубацией с конъюгированным с Alexa 488 антителом козы к lgG мыши. Результаты показали сдвиг в окрашивании инфицированных HCMV клеток MRC-5 с помощью rAb US28-13-5G6-1D3 по сравнению с изотипическим контролем, тогда как окрашивание неинфицированных клеток (имитационный контроль) было сходным с изотипическим контролем IgG. В совокупности эти результаты показывают, что rAb US28-13-5G6-1D3 специфически связывается (~ в 16 раз более высокая специфичность) с поверхностью инфицированных HCMV клеток по сравнению с неинфицированными клетками (фиг. 9).

Отмечено, что лабораторный штамм HCMV Ad169 кодирует 4D-вариант US28 (SEQ ID NO: 42), в котором он представляет D в 4-й аминокислоте последовательности ECD3; в отличие от 4N-варианта, кодируемого штаммом DB, который представлял собой последовательность, использованную при создании клеток CHO-US28-A1, обсуждавшихся в более ранних экспериментах. Связывание US28-13-5G6-1D3 как с 4D-, так и с 4N-вариантами US28, как показано в примерах настоящего изобретения, является четким показателем обеспечиваемых агностичским в отношении связывания со штаммом свойств.

Связывание US28-13-5G6-1D3 с PBMC человека

Пожизненное латентное носительство HCMV в предшественниках CD34+ и их производных, включая гранулоцитарно-макрофагальные предшественники и CD14+ моноциты, обеспечивает резервуар HCMV, который может быть реактивирован у серопозитивных индивидуумов [4]. Затем исследовали, может ли rAb US28-13-5G6-1D3 связываться с первичными PBMC трех HCMV серопозитивных индивидуумов (доноры 1-3), используя тот же протокол проточной цитометрии, что и в более ранних исследованиях. Результаты показали поверхностное связывание rAb US28-13-5G6-1D3 с 18,37%, 3,57% и 5,25% клеток PBMC от трех доноров соответственно (фиг. 10). Из

изученных PBMC только CD11+, CD14+ и CD16+ положительные клетки могут быть носителями HCMV, при этом эти клеточные маркеры могут частично перекрываться в разных мононуклеарных клетках. В зависимости от человека и ситуации, популяция латентно инфицированных клеток составляет приблизительно 15%, но может варьироваться. Следовательно, наблюдаемое поверхностное связывание rAb US28-13-5G6-1D3 с 18,37%, 3,57% и 5,25% от общего количества PBMC у доноров 1, 2 и 3 соответственно демонстрирует связывание со значительной долей PBMC, которые могут быть носителями HCMV. Эти результаты не связаны с подтипами PBMC, но указывают на то, что rAb US28-13-5G6-1D3 может связываться на поверхности латентно инфицированных HCMV клеток.

Коммерческое антитело к US28

Следовательно, наблюдаемое поверхностное связывание rAb US28-13-5G6-1D3 на 18,37%, 3,57% и 5,25% от общего количества PBMC у доноров 1, 2 и 3 соответственно демонстрирует связывание со значительной долей PBMC, которые могут быть носителями HCMV.

Связывание коммерческого поликлонального антитела US28 с клетками CHO-US28-A1 тестировали и сравнивали со связыванием rAb US28-13-5G6-1D3 с теми же клетками. Антитело US28-13-5G6-1D3 связывалось более чем с 50% клеток CHO-US28-A1, тогда как коммерческое антитело к US28 окрашивало только 10% клеток в том же эксперименте (фиг. 11A). Затем тестировали коммерческое Ab US28 в отношении инфицированных HCMV Ad169 клеток MRC-5, где оно показало специфическое связывание с инфицированной HCMV популяцией. Однако это антитело также окрашивало неинфицированные клетки имитационного контроля приблизительно в два раза эффективнее по сравнению с контрольным изотипом IgG, что указывает на неспецифическое связывание на поверхности неинфицированных клеток MRC-5 (фиг. 11B). Кроме того, связывание коммерческого антитела к US28 с первичными PBMC человека составляло >80% во всех трех тестируемых образцах, что указывает на неспецифическое связывание с этой популяцией клеток, поскольку сумма латентно инфицированных клеток составляет до приблизительно 15% (данные не показаны). Таким образом, часть эффекта специфического связывания коммерческого антитела к US28, наблюдаемого на клетках MRC-5, инфицированных Ad169 HCMV, может быть обусловлена этим неспецифическим поверхностно-связывающим компонентом.

Сравнение с моновалентным и бивалентным VUN100

WO 2019/151865, как также сообщается в эквивалентной журнальной статье De Groof *et al*, 2019 [5], описывает антитела с одной вариабельной областью тяжелой цепи (VHH) против US28, примером которых является конкретное VHH, называемое VUN100. Было показано, что VUN100 (последовательность которого представлена как SEQ ID NO: 60 настоящей заявки) связывается с прерывистым эпитопом, который содержит несколько положений связывания в N-концевой внеклеточной области US28 (положения 1-37, также обозначаемые в данном документе ECD1), и на это дополнительно влияет наличие третьей внеклеточной петли (ECL3, положения 250-273, также обозначаемые в данном документе ECD4) US28, как обсуждалось в примере 3 WO 2019/151865 (стр. 36, строки 11-32) и подписи к фиг. 2 De Groof *et al*, 2019 [5]. Поверхностное связывание антитела VUN100 с клетками имитационного контроля HEK293-F (~20%) с показателем специфичности 4 было сообщено De Groof et al., 2019 [5] в их вспомогательной информации, фиг. S1. A (и обобщено в таблице 2 настоящей заявки). Очевидная способность различать US28-экспрессирующие и US28-отрицательные клетки с показателем специфичности всего около 4 является субоптимальной по сравнению с постоянно более высокими уровнями показателей специфичности, полученными с использованием антител, генерируемых против ECD3 US28, включая антитела 13-5G6-1D3, 13-5C6-1B5 и 14-1H3-1A6, которые последовательно демонстрировали показатели специфичности в диапазоне 11-26 (таблица 2), даже когда были выбраны высокие концентрации антител для максимизации любого неспецифического связывания, и с еще более высокими показателями специфичности, продемонстрированными при использовании более коммерчески значимых (более низких) концентраций антител (фиг. 7).

Низкие показатели специфичности, зарегистрированные для VUN100, вызывают обеспокоенность по поводу его способности оказывать целенаправленное воздействие на инфицированные HCMV клетки, избегая при этом нецелевых побочных эффектов на здоровые клетки. Получение высокоспецифичных связывающих молекул против ECD3 US28, которые по сути позволяют избежать неприемлемых уровней нецелевого связывания в здоровых клетках, является особым направлением настоящего изобретения в контексте направления цитотоксической активности с высокой специфичностью в отношении инфицированных HCMV клеток, например, с использованием клеток BiTE и/или CAR-T, обладающих US28-связывающей активностью связывающих молекул, представленных в данном документе. Свойства, сообщенные для VUN100, указывают на его непригодность для управления цитотоксической активностью с высокой

специфичностью в отношении инфицированных HCMV клеток. Это также вызывает обеспокоенность по поводу способности VUN100 быть применимым в контексте надежной идентификации US28-экспрессирующих клеток (в частности, инфицированных HCMV клеток) в анализах, включая диагностические анализы, например, для использования в иммуногистохимии (IHC), в отличие от высокоспецифических связывающих молекул по настоящему изобретению.

В WO 2019/151865 и эквивалентной журнальной статье De Groof *et al*, 2019, *Mol. Pharmaceutics*, **16**: 3145-3156, авторы сослались на VUN100 и указали на способность специфически обнаруживать US28 в тканях GBM и ингибировать лиганд-зависимую и конститутивную активность US28 и, следовательно, нарушать US28-зависимый рост GBM *in vitro* и i*n vivo* в ортотопической модели ксенотрансплантата.

Однако, чтобы использовать US28 в качестве терапевтической мишени, особенно с целью направления цитотоксической активности на клетки, демонстрирующие поверхностную экспрессию US28, важно преодолеть наиболее важные препятствия, как описано ранее, включая относительно высокий уровень уровни неспецифической связывающей активности, о которых сообщалось для известной в данной области молекулы VUN100, но также и для обеспечения US28-связывающих молекул, которые преодолевают препятствия, связанные с разнообразием штаммов, вирусными мутациями, мутагенным дрейфом и способностью вируса скрываться от иммунной системы во время латентного периода вируса.

Поэтому проводили сравнение между связывающими молекулами по настоящему изобретению (такими как 13-5G6-1D3), которые связываются с ECD3 US28, и антителом VUN100 WO 2019/151865 и De Groof *et al*, 2019 (выше), и/или бивалентную молекулу VUN100b De Groof *et al*, 2020 (выше), которая, как сообщается, связывается с прерывистым эпитопом, присутствующим на N-конце и ECD4 US28.

Сравнение проводили на клетках CHO, рекомбинантно экспрессирующих последовательности US28 из штамма DB HCMV (как репрезентативный 4N-вариант) или штамма TB40/E HCMV (как репрезентативный 4D-вариант), и используя нерекомбинантные клетки CHO в качестве контроля. Как отмечалось выше, заявитель установил, что штаммы HCMV могут быть классифицированы по их последовательности ECD3 и, как правило, попадают в категорию 4N- или 4D-вариантов (это примерно 10%/90% разделение соответственно), и поэтому приведенные в качестве примера штаммы DB и TB40/E являются репрезентативными для ряда других штаммов, входящих в эти две группы. Таким образом, проявление перекрестной реактивности как

для 4N-, так и для 4D-вариантов указывает на агностическое в отношении штамма связывание для широкого спектра штаммов HCMV.

Анализ FACS проводили (как описано выше) для каждой из инфицированных клеточных линий со следующими первичными антителами: (i) 13-5G6-1D3; (ii) моновалентное (сокращенно «Mv») VUN100; и (iii) бивалентное VUN100 (сокращенно «BvVUN100» и также обозначаемое VUN100b). Связывание клеток представлено как процент клеток в популяции, которые связываются антителом.

Низкий процент связывания наблюдался для отрицательного контроля CHO: моновалентное VUN100 демонстрировало исходное связывание 2,25%, бивалентное VUN100 демонстрировало исходное связывание 1,06%, а 13-5G6-1D3 (сокращенно «1D3» на фигуре) демонстрировало наиболее низкий исходный уровень связывания 0,88% (фиг. 21A). Эти данные демонстрируют, что иллюстративное ECD3-связывающее антитело, 13-5G6-1D3, имеет более низкое исходное связывание с неинфицированными клетками CHO, чем антитела VUN100.

В клетках CHO, экспрессирующих US28, кодируемый штаммом DB HCMV (типичный 4N-вариант), наблюдалось увеличение связывания для всех тестируемых антител, при этом моновалентное связывание VUN100 с 6,91% популяции, двухвалентное связывание VUN100 с 9,24% популяции. популяции и связывание 13-5G6-1D3 с 16,65% популяции (фиг. 21A). Это показывает, что, помимо более низкого исходного связывания, чем у моновалентного или бивалентного VUN100, 13-5G6-1D3 также имеет существенно более высокое связывание с клетками CHO, экспрессирующими форму DB US28. Выраженный в виде % увеличения связывания между контрольными клетками CHO и клетками CHO, экспрессирующими форму DB US28, этот результат является показателем заметно улучшенной специфичности связывания, обеспечиваемой 13-5G6-1D3 (фиг. 21B), по сравнению с более низким уровнем специфичности, наблюдаемым при использовании моновалентного или бивалентного VUN100. Эти данные демонстрируют, что иллюстративное ECD3-связывающее антитело, 13-5G6-1D3, обладает улучшенным специфическим связыванием с клетками CHO, инфицированными 4N-вариантным штаммом HCMV.

Аналогично, при сравнении связывания в клетках CHO, экспрессирующих форму TB40/E US28 (типовой 4D-вариант), со связыванием с контрольными клетками CHO, данные ясно показывают более высокое связывание иллюстративного ECD3-связывающего антитела, 13-5G6-1D3, с клетками CHO, экспрессирующим форму TB40/E

US28 (фиг. 21A) и значительно улучшенную специфичность (фиг. 21B) как моновалентного, так и бивалентного VUN100.

Эти данные также дают представление об относительных уровнях агностической в отношении штамма связывающей активности.

Можно сравнить уровень связывания различных антител на панели в клетках CHO, экспрессирующих DB-форму US28 (иллюстративный 4N-вариант в ECD3) и TB40/E-форму US28 (иллюстративный 4D-вариант в ECD3). Как показано на фиг. 21A, наблюдалось снижение связывания с 4D-вариантом по сравнению с 4N-вариантом для моновалентного VUN100 с 6,91% до 4,33% популяции. Аналогично, бихвалентное VUN100 продемонстрировало снижение связывания с 9,24% до 5,2% популяции. Эти результаты согласуются с выводами WO 2019/151865. Однако интересно, что иллюстративное ECD3-связывающее антитело, 13-5G6-1D3, дополнительно улучшило специфическое связывание по сравнению со штаммом 4N-варианта, немного увеличивалось с 16,65% до 18,25% в популяции.

На фиг. 21C показано процентное изменение абсолютных уровней связывания с клеточной популяцией для различных антител в тестируемой панели между связыванием с клетками CHO, экспрессирующими формы DB и TB40/E US28. Из этих данных ясно, что существуют существенные различия в связывающей способности как моновалентного, так и бивалентного VUN100 (более 35% и более 40% соответственно) в зависимости от штамма HCMV, из которого получена последовательность US28. В отличие от этого, идентичность штамма HCMV, из которого получен белок US28, влияет на связывание иллюстративного ECD3-связывающего антитела, 13-5G6-1D3, в гораздо меньшей степени, разница составляет менее 10%.

Эти данные также можно анализировать для определения процентного сохранения активности связывания с US28 при сравнении US28, полученного из этих разных штаммов HCMV. На фиг. 21D показано, что иллюстративное ECD3-связывающее антитело, 13-5G6-1D3, сохраняет по сути 100% связывающую активность между этими штаммами, тогда как моновалентная и бивалентная формы VUN100 сохраняют только приблизительно или менее 60% (то есть потеря приблизительно или более 40%) в зависимости от идентичности штамма HCMV, из которого получен белок US28.

Эти различия в способности связывания в зависимости от штамма HCMV, из которого получен US28, также четко проиллюстрированы на фиг. 21E, на которой рассчитана способность каждого из моновалентных и бивалентных VUN100 связываться с US28 из каждого тестируемого штамма HCMV на основе значения, нормализовано по

отношению к связыванию 13-5G6-1D3 соответственно с той же формой US28. При такой нормализации четко видна зависящая от напряжения вариабельность связывания как моновалентного, так и бивалентного VUN100 по сравнению с наблюдаемой для 13-5G6-1D3.

Эти данные демонстрируют, что, хотя моновалентные и бивалентные антитела VUN100 к US28 обладают связывающей активностью в отношении US28, на которую значительно влияет штамм HCMV, который кодирует US28, в отличие от иллюстративного ECD3-связывающего антитела по настоящему изобретению, 13-5G6-1D3 является эффективным агностическим в отношении штамма и имеет высокие уровни связывания как с 4N-, так и с 4D-вариантами HCMV.

Эти данные дополнительно показывают, что в пределах US28 существует агностическая в отношении штамма эпитопная последовательность («SAES»), которую ECD3-связывающие молекулы по настоящему изобретению могут использовать для сохранения высокой специфичности связывания для множества различных штаммов HCMV. Соответственно, связывающие молекулы по настоящему изобретению нацелены на предпочтительный эпитоп, т.е. SAES в ECD3 US28, на который ранее не нацеливались. В отлчиное от этого, известные молекулы VUN100, которые связываются с прерывистым эпитопом в N-концевой области и ECD4, имеют сравнительно более высокое исходное (нецелевое) связывание, существенно более низкую специфичность и проявляют свойства связывания, зависящие от штамма HMCV.

Эти сравнительные результаты демонстрируют, что антитела по настоящему изобретению, которые связываются с SAES в пределах ECD3 US28, как показано на примере rAb US28-13-5G6-1D3, демонстрируют высокую степень свойств поверхностного связывания, специфических для US28, на всех протестированных клеточных линиях и клетках , тогда как оба эталонных антитела: коммерческое поликлональное антитело US28 Ab и моноклональное антитело Ab VUN100 демонстрируют высокую степень неспецифического связывания на поверхности клеток отрицательного контроля US28. Таким образом, антитела, которые были стимулированы против ECD3 US28 в соответствии с протоколом, описанным в данном документе, как показано, в частности, на примере rAb US28-13-5G6-1D3 и других антител к ECD3, полученных способом, описанным в настоящей заявке, насколько известно, являются единственными существующими в настоящее время антителами, которые способны связываться на поверхности клеток, экспрессирующих US28, инфицированных HCMV, высокоспецифичных и в то же время агностических в отношении штамма клеток.

Связывание с искусственно созданным мутантным штаммом US28

US28 имеет ряд известных точек в своей последовательности, которые могут быть мутированы (см. таблицу 3). Кроме того, известно, что такие вирусы, как HCMV, мутируют, чтобы адаптироваться к терапии. Например, валганцикловир чувствителен к вирусу, у которого развивается устойчивость в результате мутаций (Boivin *et al.*, 2012; Göhring *et al.*, 2015; и Jung *et al.*, 2019). Поэтому была подготовлена мутированная версия US28, которая включает мутации во всех известных точках его последовательности (называемая в данном документе «мутантной» формой), чтобы имитировать крайнюю форму возможного будущего генетического дрейфа внутри штаммов HCMV. Последовательность представлена в данном документе как SEQ ID NO: 173 и имеет следующие мутации по сравнению с последовательностью US28, кодируемой штаммом DB HCMV (SEQ ID NO: 5): P3Q, T7del (т.е. делеция), A8T, E18L, A19G, T21A, P22L, V24T, F25L, V35I, N170D, V250L, F265S, R267K.

Клетки CHO, сконструированные для экспрессии мутантной формы («штамм с мутацией CHO»), сравнивали в отношении связывания между иллюстративной ECD3-связывающей молекулой, 1D3, и молекулами VUN100, которые не связываются с ECD3 (см. фиг. 21A).

Интересно, что не было обнаружено связывания с мутантным штаммом выше, чем у отрицательного контроля CHO, наблюдаемого для моновалентного VUN100 (1,41% связывания с мутированным штаммом по сравнению с 2,25% связывания для контрольных клеток CHO в этих экспериментах), что указывает на то, что моновалентное VUN100 на самом деле более прочно связывается с клетками, не являющимися мишенями, чем с US28-экспрессирующими клетками. Это дополнительно проиллюстрировано на фиг. 21B, где показана специфичность менее 1 для моновалентного VUN100 для штамма с мутацией CHO (т.е. он меньше связывается с мутированными US28-экспрессирующими клетками, чем с контрольными клетками).

Бивалентный VUN100 продемонстрировал очень низкое связывание 2,58% с клетками, экспрессирующими мутированную форму US28, что всего на 1,52% выше, чем у контрольных клеток CHO (фиг. 21A), что соответствует увеличению связывания только в 2,43 раза с клетками, экспрессирующими мутированную форму штамма US28, по сравнению с контрольными клетками CHO (фиг. 21B).

В отличие от этого, иллюстративная ECD3-связывающая молекула по настоящему изобретению, 13-5G6-1D3 («1D3»), сохраняла высокую степень связывания с клетками, экспрессирующими мутированную форму US28, на уровне 12,93% по

сравнению с 0,88% контрольных клеток (фиг. 21A), это почти в 15 раз более высокий уровень связывания с клетками, экспрессирующими мутированную форму US28, по сравнению с контрольными клетками (фиг. 21B).

Эти данные демонстрируют, что, тогда как молекулы VUN100 предшествующего уровня техники (которые связываются с прерывистым эпитопом с N-концевой областью и ECD4 US28) могут быть очень чувствительны к изменениям свойств и специфичности связывания в зависимости от вирусной мутации (например, когда развивается с развитием устойчивости), ECD3-связывающие молекулы по настоящему изобретению (такие как 1D3) имеют связывание, направленное на идентифицированную агностическую в отношению штамма эпитопную последовательность («SAES»), и это позволяет ECD3-связывающим молекулам по настоящему изобретению поддерживать высокие уровни специфического связывания с дальнейшими мутировавшими штаммами US28. Следовательно, основываясь на этих данных, менее вероятно, что HCMV разовьет устойчивость к молекулам, связывающим ECD3, посредством мутации, чем, например, к антителам VUN100, как описано в WO 2019/151865, De Groof *et al*, 2019, выше. и De Groof *et al*, 2020, выше. Это является дополнительным преимуществом ECD3-связывающих молекул по настоящему изобретению по сравнению с другими видами терапии HCMV, такими как валганцикловир.

ПРИМЕР 2.

Дополнительные антитела к ECD3 связываются с 4N- и 4D-вариантами HCMV

Учитывая данные, полученные в примере 1, предполагают, что процесс создания и отбора антител и других связывающих молекул против ECD3 US28 описанным выше способом с использованием 4N- и 4D-биопептидов приводит к получению полезных свойств связывания, включая агностическое в отношении штамма связывание благодаря использованию идентифицированной агностической в отношении штамма эпитопной последовательности («SAES») в ECD3.

Чтобы подтвердить эту гипотезу, дополнительные субклоны создавали с использованием тех же способов, которые были описаны ранее, и впоследствии протестированы в отношении связывания с обоими вариантами пептида с помощью ELISA (как описано выше, см. анализ 1). Как и прежде, пептидными последовательностями, использованными в этом анализе ELISA, были биопептид-1, имеющий последовательность TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6,

соответствующая 4N-варианту ECD3), и биопептид-2, имеющий последовательность TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7, соответствующая 4D-варианту ECD3).

Всего тестировали 28 субклонов, которые были созданы со специфичностью к ECD3 US28. Подробную информацию о клонах, из которых получали субклоны, можно увидеть в таблице 4. «13» и «14» обозначают мышь 13 и мышь 14, как описано ранее. Таким образом, субклоны можно полностью охарактеризовать как, например, 13-1C10-1A2, пометив идентификатор субклона в конце идентификатора соответствующего клона и исключив «US28», который просто означает, что клоны созданы для специфичности к US28.

Таблица 4 Клоны и субклоны ECD3-связывающих молекул.

Идентичность клона	**Идентичность субклона**
US28-13-1C10	1A2, 1A8, 1B9, 1B11, 1C10, 1D3, 1G8, 1G9
US28-14-1H3	1A10, 1C10, 1C11, 1C12, 1D2, 1E1
US28-14-2C2	1A2, 1A3, 1G4, 1G9, 1G11
US28-14-4E4	1A1, 1A4, 1E6, 1E8
US28-14-4F11	1A1, 1A2, 1A3, 1A4
US28-14-5H11	1H6

Полная идентичность субклонов приведена в таблице 5A, а значения оптической плотности для каждого субклона численно представлены в соответствующей таблице 5B. Обе эти таблицы представляют собой схему 96-луночного планшета для эксперимента, поэтому клетка (представляющая лунку в 96-луночном планшете) для таблицы 5A, которая обозначает субклон антитела, может быть сопоставлена с соответствующей клеткой для таблицы 5B. Пустые лунки покрывали соответствующими пептидами и обрабатывали вторичными антителами в отсутствие первичного антитела.

Высокие значения поглощения наблюдали для всех 28 субклонов антител как к биопептиду-1, так и к биопептиду-2, что демонстрирует, что против ECD3 можно получить ряд антител с различными последовательностями, которые будут обладать полезным свойством связывания агонистов штаммов с 4N- и 4D-вариантов HCMV.

Таблица 5A. Клоны антител к ECD3, ключевые для дополнительных 28 клонов, тестируемых в отношении связывания с 4N- и 4D-вариантами HCMV.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Пептид-1	13-1C10-1A8	14-2C2-1G4	14-2C2-1G9	13-1C10-1B9	14-5H11-1H6	13-1C10-1G8	14-4E4-1E6	14-4F11-1A1	14-4E4-1A1	14-1H3-1C10	14-1H3-1E1	14-4E4-1A4
Пептид 2												
Пептид-1	14-4F11-1A2	14-1H3-1C12	13-1C10-1A2	14-2C2-1A2	14-1H3-1D2	14-4E4-1E8	13-1C10-1D3	14-2C2-1G11	14-2C2-1A3	14-1H3-1A10	14-1H3-1C11	14-4F11-1A3
Пептид 2												
Пептид-1	13-1C10-1C10	14-4F11-1A4	13-1C10-1G9	13-1C10-1B11	Холостой контроль							
Пептид 2												

Таблица 5B. Значения поглощения для дополнительных 28 клонов, тестируемых в отношении связывания с 4N- и 4D-вариантами HCMV.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Пептид-1	2,921	2,951	2,830	3,097	2,921	2,880	2,880	2,717	2,921	2,983	2,907	2,454
Пептид 2	2,951	2,811	2,747	2,823	2,944	2,993	3,090	2,944	2,976	3,187	2,914	2,374
Пептид-1	2,971	2,752	2,841	2,794	3,005	2,988	3,005	2,742	3,005	3,005	3,005	2,645
Пептид 2	2,902	2,871	2,789	2,488	2,765	2,871	2,661	2,534	2,765	2,842	2,765	2,482
Пептид-1	3,106	2,987	3,106	3,154	0,033							
Пептид 2	3,029	2,922	3,065	2,330	0,032							

Связывание дополнительных клонов с US28-экспрессирующими клетками

Считается, что большая часть патогенеза HCMV ассоциирована с латентностью вируса, которая тесно связана со способностью вируса ускользать от гуморального и клеточного иммунного ответа хозяина с помощью ряда механизмов (Manandhar *et al.*, *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(15)). Один из наиболее важных таких механизмов включает это высокое, постоянно меняющееся генетическое разнообразие HCMV. Многие гены CMV были идентифицированы как высоковариабельные, включая рецептор US28, связанный с G-белком, о котором сообщалось о многочисленных N-концевых полиморфизмах (Goffard *et al.*, *Virus Genes*, 2006; **33**(2):175–81; Arav-Boger *et al.*, *J Infect Dis.*, 2002; **186**(8):1057–64).

Наши исследования показали, что штаммы HCMV могут быть классифицированы по их последовательности ECD3 и попадают в категорию 4N- или 4D-вариантов (это примерно 10%/90% разделение) соответственно. Данные связывания, представленные выше в таблице 5B, показывают, что связывающие молекулы, генерируемые против агностической в отношении штамма эпитопной последовательности («SAES») в ECD3, постоянно демонстрируют агностическое в отношении штамма связывание, в отличие от характеристик антител к ротив US28, которые связываются с другими областями US28. молекула, такая как VUN100 (которая, как сообщается, связывается с прерывистым эпитопом в N-концевой области и ECD4 областях US28), как продемонстрировано данными на фиг. 21 настоящей заявки (как обсуждалось выше в примере 1).

Таким образом, связывающие молекулы по настоящему изобретению могут характеризоваться тем, что они имеют агностическое в отношении штамма связывание с US28-экспрессирующими клетками, при этом степень связывания и/или степень специфичности связывания практически не зависит от штамма HCMV, который экспрессирует US28. Это может быть важно не только ввиду того, что разные люди могут быть инфицированы разными штаммами HCMV, но также и потому, что люди могут быть одновременно инфицированы несколькими разными штаммами HCMV (Gorzer et al., *J Virol*, 2010, **84**(14): 7195-7203; Renzette et al., *PLoS Pathog*, 2011, **7**(5): e1001344; Renzette et al., *Curr Opin Virol*, 2014. **8**: 109-15; Renzette et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(30): E4120-8; Renzette et al., *J Virol*, 2017, **91**(5)). В контексте инфицирования различными штаммами HCMV очень полезно получать связывающие средства, которые способны проявлять свои связывающие свойства независимо от присутствующего штамма HCMV и, таким образом, избежать необходимости классифицировать штамм инфекции HCMV перед началом лечения. В контексте индивидуумов, одновременно

инфицированных несколькими различными штаммами HCMV, очень полезно иметь возможность лечить все штаммы одновременно у человека; в частности, это может помочь избежать создания среды, в которой применяется селективное давление, способствующее развитию инфекции любых несвязанных штаммов.

Также известно, что новые инфекции хозяина приводят к появлению уникального штамма вируса для каждого инфицированного человека и генерируют события отбора, при которых новый генотип может стать доминантным из-за селективного давления иммунного ответа (Renzette et al., 2011, выше), и вполне возможно, что как вирусные факторы, так и факторы хозяина могут способствовать развитию вирусного генетического дрейфа во время инфекции HCMV (Vabret *et al.*, *Trends Immunol*, 2017, **38**(1): 53-65; Christensen & Paludan, *Cell Mol Immunol*, 2017, **14**(1): 4-13). Это еще один контекст, в котором важно обеспечение связывающих US28 молекул с агностическим в отношении штамма связыванием.

По меньшей мере, по этим причинам агностическое в отношении штамма связывание (или, по меньшей мере, минимизация степени вариабельности связывающих свойств US28-связывающих молекул по настоящему изобретению, как между различными штаммами HCMV), является весьма предпочтительным.

Связывающие молекулы по настоящему изобретению в качестве дополнения или в качестве альтернативы могут быть дополнительно охарактеризованы путем преимущественного связывания с US28-экспрессирующими клетками по сравнению со связыванием US28-отрицательных клеток. Таким образом, специфичность является еще одной важной характеристикой, наряду со способностью сохранять эту агностическую в отношении штамма специфичность.

Также важно, по меньшей мере, в некоторых контекстах (например, в терапевтических контекстах, в которых связывающие молекулы по настоящему изобретению используются для обеспечения цитотоксической активности против связанных клеток), что степень нецелевого связывания является низкой в абсолютном смысле. В таких контекстах может быть недостаточно только того, чтобы связывание было строго специфичным к US28-экспрессирующим клеткам. То есть, хотя очень высокие уровни связывания с US28-экспрессирующими клетками могут быть полезны в определенных контекстах, это может быть неприемлемо в терапевтическом контексте, если этот высокий уровень связывания с U28S-экспрессирующими клетками также сопровождается относительно высоким уровнем нецелевого связывания, хотя относительный уровень специфичности связывания (сравнивая абсолютный уровень

связывания с клетками-мишенями по сравнению с клетками, не являющимися целевыми) может дать благоприятное соотношение. Действительно, в таком контексте предотвращение связывания с нецелевыми клетками (т.е. клетками, не инфицированными HCMV) может быть дополнительной характеристикой высокой важности, позволяющей обеспечить терапевтически полезные молекулы, которые избегают нецелевой активности. То есть связывающие молекулы по настоящему изобретению с низким абсолютным уровнем связывания с US28-отрицательными клетками могут в некоторых контекстах обеспечивать более терапевтически значимую активность, поскольку высокий фоновый уровень связывания может привести к нецелевым воздействиям на связывающие молекулы. Например, для CAR-T-клеток или BiTE, которые выборочно уничтожают любую связанную клетку, критически важно, чтобы CAR-T-клетки или BiTE имели низкий уровень исходного связывания с клетками, отрицательными по отношению к мишени. В противном случае CAR-T-клетка или BiTE могут уничтожать клетки, отличные от намеченной мишени.

Как отмечалось выше, в примере 1 настоящей заявки (как дополнительно показано на фиг. 21) по сравнению с антителом к US28 VUN100 предшествующего уровня техники (о котором сообщалось, что оно связывается с прерывистым эпитопом в N-концевой области и ECD4 областях US28), иллюстративные ECD3-связывающие молекулы по настоящему изобретению (13-5G6-1D3), обеспечивали существенно более низкую активность связывания вне мишени, обеспечивали заметно улучшенное агностическое в отношении штамма связывание, а также обеспечивали более высокую специфичность, а также улучшенное сохранение этой специфичности с различными штаммами HCMV.

Поэтому связывающие свойства выбранных дополнительных ECD3-связывающих молекул дополнительно анализировали по сравнению с VUN100 и 1D3.

Чтобы определить степень нецелевого связывания и степень специфичности связывания для US28-экспрессирующих клеток использовали тот же анализ проточной цитометрии, что и анализ 2, приведенный выше, для различных субклонов-кандидатов, выбранных из 28 агностических в отношении штамма ECD3-связывающих молекул, описанных выше (выбранных кандидатов можно увидеть в таблице 6) и по сравнению с 1D3-mFc, формой иллюстративного 13-5G6-1D3, которая содержит мышиный Fc-рецептор, в качестве положительного контроля, и со смесью молекул Mv и Bv VUN100, известных в данной области технеки связывающих молекул для US28, в соотношении 1:1 в 50 мкг/мл в качестве дополнительного сравнительного контроля.

Таблица 6: Субклоны, выбранные для анализа связывания с US28-экспрессирующими клетками.

Идентичность клона	Идентичность субклона
US28-13-1C10	1B9, 1C10, 1G9
US28-14-1H3	1A10, 1C10
US28-14-2C2	1G4
US28-14-4E4	1A1, 1E8

Выбранные субклоны тестировали с помощью проточной цитометрии на связывание с клетками CHO, сконструированными для сверхэкспрессии DB-US28 («клетки CHO-US28»), по сравнению с клетками CHO, которые не сверхэкспрессируют US28 («клетки CHO»), в качестве способа измерения неспецифического связывание с различными связывающими молекулами. Исходные уровни определяли с использованием соответствующих вторичных антител (конъюгированное с FITC антитело к mFc для субклонов или конъюгированное с PE антитело к myc для молекул VUN100) с клетками CHO и клетками CHO-US28. Учитывая, что US28 экспрессируется на поверхности клеток, для этих экспериментов клетки не были проницаемыми.

В таблице 7 и на фиг. 22 суммирован процент связывания по данным проточной цитометрии в контрольных клетках CHO (т.е. не экспрессирующих US28), что указывает на риск нецелевого связывания при удаленных исходных уровнях вторичных антител. Следовательно, процент связывания, указанный каждым условием, представляет собой нецелевое связывание тестируемых связывающих молекул.

Таблица 7. Процент связывания с клетками CHO, которые являются отрицательными в отношении US28.

Условие	**Процент связывания с клетками CHO**
1D3-mFc (1:4) 250 мкг/мл	0,66%
VUN100 Mv+Bv Ab 1:1 смесь 50 мкг/мл	2,47%
13-1C10-1B9 (1:5) (200 мкг/мл)	0,71%
13-1C10-1C10 (1:5) (200 мкг/мл)	0,62%
13-1C10-1G9 (1:5) (200 мкг/мл)	0,44%
14-1H3-1A10 (1:5) (200 мкг/мл)	0,58%
14-1H3-1C10 (1:5) (200 мкг/мл)	0,31%
14-2C2-1G4 (1:20) (50 мкг/мл)	0,35%
14-4E4-1A1 (1:5) (200 мкг/мл)	1,63%
14-4E4-1E8 (1:5) (200 мкг/мл)	0,03%

Данные в таблице 7 и на фиг. 22 показывают, что молекулы VUN100 имеют стабильно более высокий уровень исходного связывания с US28-отрицательными клетками CHO по сравнению с антителами, генерируемыми против независимой от штамма эпитопной последовательности («SAES») в ECD3. Обратите внимание, что VUN100 тестировался при более высоком разведении/более низкой концентрации, чем большинство других антител, что должно способствовать снижению обнаруженного нецелевого связывания образца VUN100 (поскольку более высокие концентрации антител имеют тенденцию приводить к более высокому исходному связыванию). Несмотря на это, данные показывают, что антитела по настоящему изобретению постоянно демонстрируют пониженное исходное связывание по сравнению с образцом VUN100.

Обычно молекулы VUN100 связывают клетки, не являющиеся целевыми, с повышенным уровнем, по крайней мере, в 3-4 раза или более.

Для сравнения, дополнительные ECD3-связывающие молекулы, как и описанная ранее связывающая молекула 1D3, демонстрируют гораздо более низкое фоновое связывание с US28-отрицательными клетками CHO.

Соответственно, ECD3-связывающие молекулы по настоящему изобретению, созданные против агностической в отношении штамм эпитопной последовательности

(«SAES») в ECD3, последовательно демонстрируют более терапевтически значимую активность с более низким риском нецелевого связывания по сравнению с молекулами VUN100.

Хотя улучшенное агностическое в отношении штамма связывание и/или низкие исходные уровни являются достаточно выгодными свойствами для ECD3-связывающих молекул по сравнению с молекулами на основе VUN100, заявитель далее исследовал, можно ли легко получить ECD3-связывающие молекулы, обладающие такой специфичностью связывания, которая лучше, чем у молекул VUN100. Таким образом, пять иллюстративных ECD3-связывающих молекул сравнивали с уже представленным в качестве примера многообещающим кандидатом 1D3 и VUN100 в качестве контроля. Пять иллюстративных ECD3-связывающих молекул перечислены в таблице 8.

Чтобы рассчитать специфичность связывания для клеток CHO, экспрессирующих US28, по сравнению с контрольными клетками, уровень специфичности рассчитывали для типичных ECD3-связывающих молекул следующим образом: исходные уровни вычитали, как описано выше, уровень связывания CHO-US28 для каждого образца тестируемого антитела делили на соответствующий контрольный уровень связывания CHO (т.е. отношение положительного связывания к отрицательному связыванию) и рассчитывали разницу (относительно определенного связывания, определенного для образца VUN100), причем значение > 1 представляет улучшенную специфичность по сравнению с VUN100.

Результаты этих экспериментов представлены в таблице 8 и на фиг. 23.

Таблица 8 Специфичность связывания для 5 иллюстративных ECD3-связывающих субклонов.

Условие	**Специфичность связывания сопоставимаа со специфичностью, демонстрируемой VUN100**
VUN100 Mv+Bv Ab смесь (1:20) 50 мкг/мл	1,00
14-2C2-1G4 (1:20)	5,37
14-4E4-1E8 (1:5)	4,60
14-1H3-1A10 (1:5)	2,29
13-1C10-1C10 (1:5)	1,74

1D3-mFc (1:4) 250 мкг/мл	1,65

Данные о специфичности связывания демонстрируют, что ряд дополнительных субклонов обеспечили и даже увеличили улучшенную специфичность связывающей молекулы 1D3-Fc, которая была выработана против ECD3, а также продемонстрировали улучшенную специфичность связывания по сравнению с молекулами VUN100.

Это демонстрирует, что множественные ECD3-связывающие молекулы, созданные против агностической в отношении штамма эпитопной последовательности («SAES») в ECD3, могут быть легко идентифицированы в соответствии с описанными в данном документе протоколами, которые имеют улучшенную специфичность связывания по сравнению с 1D3 и/или которые, по меньшей мере, обладают улучшенной специфичностью связывания по сравнению с молекулами VUN100.

В целом, эти данные демонстрируют, что связывающие молекулы со специфичностью связывания ECD3, полученные в соответствии с протоколами, описанными в настоящем документе, против агностической в отношении штамма эпитопной последовательности («SAES») в ECD3, могут быть предоставлены для проявления одного, двух или всех трех из следующих характеристик:

1. последовательно улучшенное агностическое в отношении штамма связывание с US28, кодируемым различными штаммами HCMV, по сравнению с молекулами VUN100;
2. стабильно существенно более низкое исходное связывание с US28-отрицательными клетками по сравнению с молекулами VUN100; и необязательно
3. сохранение или предпочтительно улучшение специфичности связывания по сравнению с молекулами VUN100 и/или 1D3.

ПРИМЕР 3.

Связывание с тканями человека, инфицированными HCMV

Ткань легких человека, инфицированную HCMV, использовали для проверки иллюстративной ECD3-связывающей молекулы по настоящему изобретению, US28-13-5G6-1D3 rAb, связывающейся с тканями человека, инфицированными HCMV, с помощью иммуногистохимического анализа (IHC).

RAB US28-13-5G6-1D3 показало окрашивание в диапазоне разбавлений 1:400-1:1600 (масса/объем), и для дальнейших скрининговых исследований было выбрано

разведение 1:400 (масса/объем) (фиг. 12A). Коммерческое антитело MAB810R против HCMV против IE использовалось в качестве положительного контроля и демонстрировало оптимальное окрашивание легочной ткани, инфицированной HCMV, в разведении 1:200 (масса/объем) (фигура 12 D), как рекомендовано в руководстве производителя. lgG использовали в качестве антитела отрицательного контроля (фиг. 12 F). Окрашивание легочной ткани, инфицированной HCMV, с помощью rAb US28-13-5G6-1D3 продемонстрировало специфичность к инфицированным HCMV альвеолярным клеткам, поскольку не было окрашивания альвеолярных клеток и фибробластов в нормальной легочной ткани (фиг. 12 B) или HCMV отрицательном миометрии (данные не показаны). rAb US28-13-5G6-1D3 окрашивало иллюстративные инфицированные HCMV клетки с характерным цитомегало-эффектом на предметном стекле положительного контроля HCMV (фиг. 12A). rAb 13-5G6-1D3 показало сильное цитоплазматическое окрашивание в этих клетках, поскольку известно, что белок US28 локализован в цитоплазме и клеточной мембране, тогда как контрольное антитело против IE MAB810R показало ядерное окрашивание, что вполне ожидаемо, поскольку белки IE известно, что они локализуются в ядре клетки во время продуктивной инфекции HCMV (фиг. 12 D). Положительное окрашивание было подтверждено как специфичное для HCMV с использованием метода гибридизации *in situ* (ISH) с зондом, нацеленным на ДНК HCMV в тех же образцах. Интересно, что в нормальной легочной ткани rAb 13-5G6-1D3 положительно окрашивалось на некоторые тканевые макрофаги (фиг. 12 B), которые, как известно, являются носителями латентного или реактивированного HCMV. Те же макрофаги показали наличие ДНК HCMV, о чем свидетельствуют положительные сигналы ISH (фиг. 12C). Те же макрофаги не показали положительного окрашивания на белок IE (фиг. 12E). Окрашивание отрицательным контрольным антителом Ab к IgG оставалось отрицательным для легочной ткани (фиг. 12 F). Эти результаты согласуются с другими результатами, представленными в данном документе, из клеточных исследований, показывающих специфическое связывание rAb US28-13-5G6-1D3 с тканью человека, инфицированной HCMV. На фиг. 20 показаны конкретные результаты окрашивания дополнительного примера продуктивной инфекции HCMV в морфологически нормальных, прилегающих к опухоли (NAT) тканях поджелудочной железы.

Связывание с видами рака человека, инфицированными HCMV

После этого изучили связывание rAb US28-13-5G6-1D3 с раковыми тканями человека с помощью ISH и подтверждающего анализа ISH. Результаты оценивал старший патологоанатом. Обнаружили специфическое окрашивание rAb US28-13-5G6-1D3 при нескольких типах рака. Среди них были глиобластомы (например, глиобластома 4 степени), рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак молочной железы (например, местно-распространенный рак молочной железы и его метастазы), рак пищевода, желудочной рак /рак желудка, рак поджелудочной железы, рак печени, такой как гепатоцеллюлярная карцинома, рак легких, злокачественная феохромоцитома и рак шейки матки, впервые показывая потенциальную универсальную роль US28 в патологии рака. Интенсивность окрашивания различных раковых клеток классифицировали как отрицательную = 0, слабоположительную = 1+, умеренно положительную = 2+ или сильно положительную = 3+. Окрашивание US28 считалось положительным только в том случае, если опухолевые клетки имели положительное окрашивание, отличающееся от соседних нормальных тканей. В большинстве опухолей с положительным окрашиванием rAb US28-13-5G6-1D3 окрашивание в целом было положительным в больших частях опухолевых клеток. Позитивность опухоли была подтверждена положительным обнаружением ДНК HCMV в ядрах опухолевых клеток с помощью ISH. Во многих случаях образцы опухолей демонстрировали положительное окрашивание эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудов, которые также наблюдались в соседних нормальных тканях и не считались признаком положительного результата опухоли. Окрашивание контрольного Ab на основе IgG использовалось в качестве отрицательного контроля и было отрицательным во всех изученных раковых и нормальных тканях.

В одном из трех изученных образцов аденокарциномы пищевода и желудка наблюдалась положительная интенсивность окрашивания rAb US28-13-5G6-1D3 в сочетании с обнаружением ядерной ДНК HCMV. HCMV положительная опухоль желудка имела морфологические признаки диффузного типа рака желудка, который обычно растет небольшими группами клеток и поражает большие площади, а не только одну область желудка. Положительный образец опухоли был взят у 56-летнего мужчины, опухоль которого имела 3 степень и классифицировалась по TNM как T3N1M0. Кроме того, US28-положительный рак пищевода имел агрессивный тип со стадией IIIa, T3N1M0. Все (3/3) прилегающих тканей пищевода были отрицательными в отношении окрашивания эпителиальных клеток, а 2/3 образцов, прилегающих к опухоли желудка, также были отрицательными в отношении ДНК HCMV.

Интенсивность окрашивания rAb US28-13-5G6-1D3 была положительной (1+) в дополнение к положительному анализу ДНК HCMV в 1/3 протестированных аденокарцином толстой кишки, тогда как все 3/3 контрольных групп были отрицательными для окрашивания US28-13-5G6-1D3 в соседних эпителиальных клетках. ДНК HCMV все еще можно было обнаружить в 2/3 соседних образцов. Положительная опухоль имела степень 3 по классификации TNM T4N1M0. Следует отметить, что стадия T4 означает, что рак проник через стенку толстой кишки и мог прикрепиться или прорасти в другие близлежащие ткани или органы, и поэтому по определению классифицируется как местно-распространенный рак толстой кишки.

Все 3 изученных образца аденокарциномы прямой кишки имели положительное окрашивание US28-13-5G6-1D3 и положительный ISH HCMV. Это были T3N0M0, степень 2; T4H0M0, степень 2; и T3N1M0, степень 3. Из соседних образцов 2/3 были отрицательными на окрашивание HCMV US28-13-5G6-1D3, и 1/3 как положительными на окрашивание US28-13-5G6-1D3, так и положительными на ISH.

2/3 изученных гепатоцеллюлярных карцином были положительными по окрашиванию US28-13-5G6-1D3 и ISH HCMV. Поразительно, но в прилегающих тканях печени наблюдались признаки продуктивной инфекции HCMV с умеренным окрашиванием US28-13-5G6-1D3 и большими и частыми агрегатами цитоплазматической ДНК HCMV в клетках Купфера. Это наблюдалось как в ткани печени, прилегающей к опухоли, так и в отдельных прилегающих образцах.

Также обнаружили как окрашивание US28-13-5G6-1D3, так и положительный ISH в 2/3 образцов рака легких, 2/3 образцов рака шейки матки и 1/3 образцов рака поджелудочной железы.

Затем более подробно изучили экспрессию HCMV US28 в когорте рака молочной железы с помощью IHC и ISH. ~74% из 41 изученного образца первичной опухоли молочной железы показали положительное и специфическое цитоплазматическое окрашивание rAb US28-13-5G6-1D3 и положительное ядерное ДНК HCMV в раковых клетках (фиг. 13 и 15). Удивительно, но чем более агрессивными были формы опухоли, например, те, которые имели низкую экспрессию гормональных рецепторов, были HER2-положительными или трижды негативными формами рака молочной железы (TNBC), в опухолевых клетках наблюдалась тенденция к более сильному окрашиванию для rAb US28-13-5G6-1D3 (фиг. 13 и 16 A). Окрашивание rAb US28-13-5G6-1D3 ограничивалось опухолевыми клетками, хотя также многие опухолевые сосуды демонстрировали сильное положительное окрашивание. Интересно, что ~94% из 30

изученных метастатических лимфатических узлов показали специфическое окрашивание rAb US28-13-5G6-1D3 для метастатических клеток. Наиболее интенсивное окрашивание наблюдалось для TNBC и HER2-положительных метастазов (фиг. 14 и 16 B). Все TNBC (n = 8) и HER2-положительные (n = 11) метастазы имели положительное окрашивание US28-13-5G6-1D3 (фиг. 16 B). ISH HCMV был положительным для 98% изученных образцов рака молочной железы (n=41) и 100% изученных метастазов железистого рака молочной железы (n=30). Интересно, что единственным образцом рака молочной железы, отрицательным по ДНК HCMV, была нейроэндокринная опухоль, которая также показала отрицательное окрашивание US28-13-5G6-1D3. Результаты ISH также соответствовали перечисленным выше результатам IHC, показывающим множество ядерных сигналов ДНК HCMV на опухолевую клетку только в 12% первичных опухолей, тогда как было много ядерных сигналов ISH на опухолевую клетку в 39% метастазов. Множество сигналов ISH на опухолевую клетку наблюдалось как в первичных опухолях, так и в метастазах, и наблюдалось исключительно, за одним или двумя исключениями, в трижды негативных и HER2-положительных опухолях. Не имело место цитоплазматическое окрашивание U28-13-5G6-1D3 в нормальных эпителиальных клетках молочной железы и 10/10 соседних контрольных тканях молочной железы (фиг. 15). Нормальная лимфоидная ткань также не показала положительного окрашивания US28 (оба образца в 2/2 были отрицательными). Однако во многих прилегающих тканях наблюдалось положительное окрашивание эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудов (в 70% прилегающих тканей молочной железы), что было аналогично образцам опухоли. Соответственно, ДНК HCMV также обнаруживалась в небольших количествах в 3/10 нормальных, прилегающих тканях молочной железы. Окрашивание 13-5G6-1D3 было оценено как специфичное для клеток, инфицированных HCMV, как в раке молочной железы, так и в соседних нормальных тканях.

Несколько более ранних исследований подтвердили инфекцию HCMV и экспрессию US28 в тканях глиобластомы [5, 6]. Окрашивали ткани астроцитомы человека 1-3 степени и глиобластомы 4 степени с помощью rAb US28-13-5G6-1D3 и антитела MAB810R. Все астроцитомы 1-й степени (n = 4) были отрицательными по окрашиванию rAb US28-13-5G6-1D3. Из астроцитом 2-3 степени 6 были отрицательными, 37 положительными (1+) и 2 умеренно положительными (2+) по окрашиванию rAb US28-13-5G6-1D3. Все глиобластомы 4-й степени (n = 19) были положительными, из которых 3 были умеренно положительными (2+) по окрашиванию

rAb US28-13-5G6-1D3 (фиг. 17 и 18). Антитело к IE MAB810R показало положительное окрашивание для 17 из 19 образцов глиобластомы 4 степени, тогда как 2 образца были признаны отрицательными. ISH HCMV был положительным во всех образцах опухолей, что указывает на присутствие ДНК HCMV в 100% образцов. Прилегающие контрольные нормальные ткани головного мозга не показали какого-либо общего окрашивания на US28-13-5G6-1D3 rAb (фиг. 17 C). Пять NAT были полностью отрицательными по ДНК HCMV. ДНК HCMV была обнаружена в ядрах астроцитов и глиальных клеток в пяти оставшихся образцах NAT. Отрицательное контрольное окрашивание IgG в опухолевых тканях было отрицательным (фиг. 17 C), что указывает на специфическое окрашивание HCMV US28 с помощью rAb 13-5G6-1D3 в тканях головного мозга.

Только 6 из 41 исследовали образцы рака молочной железы, но большинство образцов глиобластомы 4 степени (17/19) показали положительное цитоплазматическое окрашивание на антитело к IE MAB810R. Положительные образцы рака молочной железы часто содержали только редкие положительные клетки с положительным цитопластическим окрашиванием, но 5/6 положительных образцов были либо HER2-положительными (n = 4), либо TNBC (n = 1).. Кроме того, один HER2-положительный образец положительно окрасился на антитело MAB810R в опухолевых макрофагах. Только 1/37 метастазов дали положительную окраску на антитело MAB810R, но этот образец также был HER2 положительным. Окрашивание антитела MAB810R всегда сочеталось с положительным окрашиванием rAb US28-13-5G6-1D3 в образцах рака молочной железы. Очень интересно, что несколько образцов опухолей с отрицательным окрашиванием MAB810R показали положительное окрашивание эндотелия сосудов и гладкомышечных клеток, которое было положительным как для rAb US28-13-5G6-1D3, так и для антитела MAB810R.

Цитоплазматическое окрашивание белков IE HCMV ранее было описано при нескольких типах рака [7, 8]. Моноклональное антитело MAB810R использовали в качестве положительного контроля HCMV в экспериментах для нацеливания на внутриклеточные белки IE1 и IE2, кодируемые HCMV. Эти белки имеют общие экзоны 1–3 и дополнительно включают экзон 4 (IE1) или 5 (IE2). Полноразмерные белки IE необходимы для репликации и реактивации HCMV из латентного периода, чтобы вызвать продуктивную инфекцию HCMV [4]. Они не экспрессируются во время экспериментальной латентной стадии HCMV [9]. Однако экспрессия РНК и белка экзона 4 белка IE1 (IE1x4) (размером ~60 кДа) ранее была показана в латентно инфицированных HCMV клетках-предшественниках CD34+ гемопоэтических клеток, но не в CD14+

моноцитах как в природных, так и в экспериментальных латентных системах [10]. Таким образом, экспрессия гена HCMV во время латентного периода помимо белка US28 может включать экспрессию IE1x4, но не полноразмерных белков IE1 и 2 [10]. Согласно информации производителя (MerckMillipore.com), антитело MAB810R связывается с полноразмерными белками IE1 и IE2 ~68-72 кДа, что указывает на то, что антитело MAB810R нацелено на клетки с литической или репликативной инфекцией CMV. Поэтому оно не должен связываться с латентно инфицированными клетками HCMV. Результаты показывают, что большинство раковых клеток в положительных образцах опухолей молочной железы экспрессируют белок US28, но не белки IE.

В исследованиях 100% метастазов рака молочной железы и 100% опухолей головного мозга были положительными по ДНК HCMV при исследовании с помощью ISH. Мы наблюдали, что в злокачественных опухолях ДНК HCMV локализуется исключительно в ядре опухолевой клетки. Количество ядерных сигналов ДНК HCMV варьируется в разных образцах опухолей. Мы также заметили, что количество ядерных ISH-сигналов на опухолевую клетку увеличивается при агрессивных типах рака, таких как TNBC и HER2-положительный рак молочной железы. Ядерная локализация сигналов ISH не наблюдалась в нормальных тканях, где вирусная ДНК преимущественно располагалась в цитоплазме, в множественных крупных агрегатах (фиг. 20). При продуктивных инфекциях HCMV вирусные частицы упаковываются в эндоплазматический ретикулум, прежде чем они выводятся из клеток. Это объясняет цитоплазматическую локализацию большей части вирусной ДНК при продуктивной инфекции HCMV. Мы наблюдали такие продуктивные инфекции HCMV только в нормальных тканях (и NAT), таких как ткани поджелудочной железы (фиг. 20), молочной железы, печени и легких (фиг. 12).

В совокупности эти данные показывают, что раковые клетки, и особенно клетки рака молочной железы, несут латентную инфекцию HCMV. Этот вывод подтверждается в исследованиях не только отсутствием экспрессии белка IE и отсутствием цитоплазматических вирусных агрегатов, но и наличием ядерных сигналов HCMV в опухолевых клетках. Результаты и выводы подтверждаются более ранними данными, указывающими на отсутствие цитопатического эффекта и отсутствие доказательств репликации вируса в опухолевых клетках [11, 12].

Моноциты, инфицированные латентно HCMV, запрограммированы на длительное выживание клеток [13], и вполне обоснованно, что латентная инфекция HCMV в опухолевых клетках может способствовать увеличению выживаемости

опухолевых клеток. Показано, что латентно инфицированные HCMV моноциты обладают широкими иммуносупрессивными функциями в своем микроокружении, защищая себя от элиминации иммунной системой [13]. Это также похоже на раковые клетки, и уклонение от иммунного разрушения признано одним из десяти признаков рака [14].

Интересно, что, как описано ранее [7, 8], обнаружили цитоплазматическую экспрессию полноразмерного белка IE в нескольких образцах агрессивного рака молочной железы и большинстве образцов глиобластомы 4 степени. Специфические для рака эпигенные механизмы, такие как модификации гистонов, гипометилирование ДНК или определенные мутации вируса или хозяина, могут ингибировать репликацию вируса, но все же допускают некоторую экспрессию IE при некоторых агрессивных формах рака [15]. Обнаружение присутствия экспрессии белка IE в цитоплазме лишь нескольких клеток некоторых положительных образцов опухоли молочной железы указывает на то, что гетерогенные популяции раковых клеток могут содержать несколько клеток/типов клеток, которые более благоприятны для репликативного вируса. Было высказано предположение, что раковые стволовые клетки особенно устойчивы к инфекции HCMV и что экспрессия белка IE в клетках глиобластомы является мутагенной и индуцирует выживание клеток, рост опухоли и эпителиально-мезенхимальный (EMT) фенотип [16]. Латентно инфицированные HCMV US28-положительные раковые клетки могут дополнительно создавать сильное иммуносупрессивное микроокружение, которое может способствовать экспрессии белков IE, которые, как известно, являются высокоиммуногенными антигенами CD4+ и CD8+ Т-клеток [17], в немногих опухолевых клетках. Результаты показывают, кроме того, что опухоли содержат другие инфицированные HCMV клетки, которые положительно окрашиваются на белки IE, такие как эндотелиальные и гладкомышечные клетки, а иногда и макрофаги. Известно, что эти типы клеток более благоприятны для репликативной вирусной инфекции, чем опухолевые клетки [16], и могут дополнительно способствовать поддержанию и выделению вируса внутри опухоли. Однако механизмы, вовлеченные в инфекцию, связанную с HCMV, в опухолях глиобластомы, могут отличаться от механизмов рака молочной железы вследствие различного клеточного происхождения этих видов рака.

Объединив перечисленные выше результаты, показывают, что связывающие средства, которые специфически связываются с ECD3 US28, как показано в данном документе rAb US28-13-5G6-1D3, специфически связываются с поверхностью инфицированных HCMV клеток, как показано связыванием rAb US28-13-5G6-1D3 на

модели клеток со сверхэкспрессией US28, инфицированных HCMV клетках и тканях, PBMC от HCMV сероположительных индивидуумов и HCMV положительных раковых клеток в опухолевых тканях. В отличие от этого, связывающие средства, которые специфически связываются с ECD3 US28, как показано в данном документе на примере rAb US28-13-5G6-1D3, обычно не связываются с клетками или тканями отрицательного контроля HCMV (как показано на фиг. 12, 15, 17, 19 и 20). Эти данные согласуются с ролью белка US28, который, как показано, присутствует как при литической, так и при латентной инфекции HCMV [18]. В данном документе впервые показано положительное окрашивание US28 при раке молочной железы, прямой кишки, пищевода, желудка, поджелудочной железы, печени, легких и шейки матки у человека и подтверждаем некоторые более ранние результаты экспрессии US28 HCMV при глиобластоме 4 степени [5, 6] и раке толстой кишки [19]. Наиболее важно показано специфическое связывание rAb US28-13-5G6-1D3 с местно-распространенным раком толстой кишки, метастатическими тканями рака молочной железы (~94%) и опухолями глиобластомы IV степени (~100%), что подтверждает гипотезу о высоком уровне экспрессии US28 HCMV при агрессивном, местно-распространенном и метастазирующем раке человека, а также обеспечение дополнительной роли связывающих средств, которые специфически связываются с ECD3 US28.

Эти результаты подтверждают роль US28 HCMV как важной терапевтической мишени против инфекций HCMV (с особым интересом к латентным инфекциям HCMV) и против HCMV-положительного рака (с особым интересом к агрессивному, местно-распространенному и метастазирующему HCMV-положительному раку) и указывают на наличие антител и других связывающих средств против ECD3 US28, особенно те связывающих средств, которые обладают высокой специфичностью к US28 и/или агностическому в отношении штамма связыванию, таких как антитело US28-13-5G6-1D3, в качестве высокоэффективных терапевтических, профилактических и диагностических связывающих молекул. Это включает в себя способность обеспечивать высокоспецифичное нацеливание цитотоксической активности против инфекций HCMV (с особым интересом к латентным инфекциям HCMV) и против HCMV положительных видов рака.

Связывание с первичными тканями, не инфицированными HCMV

При выборе терапевтической молекулы важно оценить риск нецелевого связывания связывающих молекул. Это особенно важно для US28, который имеет уровень гомологичности последовательности с CCR5, который может присутствовать у

субъекта. Таким образом, высокая специфичность связывания и низкое нецелевое связывание являются индикатором перспективной терапевтической связывающей молекулы с низким риском нецелевых эффектов.

Поэтому изучали связывание иллюстративных связывающих молекул по настоящему изобретению с различными первичными тканями человека, чтобы оценить уровень нецелевого связывания. Эти данные получали с использованием антитела к US28-13-5G6-1D3, полученного таким же образом, как описано ранее, методом проточной цитометрии (FACS).

Анализы проточной цитометрии с антителом 13-5G6-1D3 проводили на различных первичных клетках человека, чтобы исключить общее нецелевое связывание. Изучали следующие клеточные линии: первичные клетки коры надпочечников человека, первичные эпителиальные клетки почек человека, первичные эндотелиальные клетки микрососудов сердца человека, первичные эпителиальные клетки печени человека и первичные гладкомышечные клетки вен человека. Антитело 13-5G6-1D3, нацеленное на US28, показало очень низкое поверхностное связывание, намного ниже <1%, для всех этих типов клеток, что указывает на отсутствие нецелевого связывания 13-5G6-1D3 с этими типами клеток (фиг. 19A) в концентрации 1:40. Эти результаты подтверждают наблюдения за лабораторными клетками (т.е. непервичными клеточными линиями), демонстрирующими низкое связывание с нормальными US28-отрицательными клетками. IHC окрашивание ткани поджелудочной железы человека Ab US28-13-5G6-1D3 показало специфическое окрашивание для ткани поджелудочной железы, инфицированной HCMV, и отрицательное окрашивание для ткани поджелудочной железы, не инфицированной HCMV (фиг. 20).

IHC в сердечных тканей человека

Образцы сердечной ткани человека исследовали в отношении окрашивания 13-5G6-1D3 иммуногистохимическим методом в концентрации 1:400. Иммуногистохимия не выявила какого-либо общего нецелевого связывания 13-5G6-1D3 с тканью сердечной мышцы человека (фиг. 19 B). Та же мышечная ткань также была отрицательной на ДНК HCMV (данные не показаны). Окрашивание 13-5G6-1D3 было аналогично окрашиванию отрицательным контрольным антителом IgG. Злокачественную опухоль феохромоцитомы человека использовали в анализе в качестве положительного контроля на инфекцию HCMV. Он находился на той же планшете TMA, что и образцы сердца, и имел положительное окрашивание на антитело 13-5G6-1D3 (фиг. 19 B). Контроль ISH также показал типичное окрашивание ДНК HCMV в ядре опухолевых клеток в той же

биопсии, что подтверждает наличие латентной инфекции HCMV в этом положительном контроле (фиг. 19 B).

Эти данные демонстрируют, что антитело US28-13-5G6-1D3 специфически связывается как с продуктивно, так и с латентно инфицированными HCMV клетками и тканями человека и что оно не связывается с поверхностью здоровых клеток и тканей человека. Положительные и отрицательные результаты были подтверждены другими независимыми суррогатными маркерами инфекции HCMV, такими как окрашивание антителом MAB810 и контроль ДНК HCMV с помощью анализа ISH, а также окрашивание отрицательного контроля антителом на основе IgG человека.

Литературные источники для раздела «Примеры»:

1. Georgiou, G., et al., *The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire.* Nat Biotechnol, 2014. **32**(2): p. 158-68.
2. Arav-Boger, R., et al., *Polymorphisms of the cytomegalovirus (CMV)-encoded tumor necrosis factor-alpha and beta-chemokine receptors in congenital CMV disease.* J Infect Dis, 2002. **186**(8): p. 1057-64.
3. Groves, I.J., M.B. Reeves, and J.H. Sinclair, *Lytic infection of permissive cells with human cytomegalovirus is regulated by an intrinsic 'pre-immediate-early' repression of viral gene expression mediated by histone post-translational modification.* J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 10): p. 2364-2374.
4. Elder, E. and J. Sinclair, *HCMV latency: what regulates the regulators?* Med Microbiol Immunol, 2019. **208**(3-4): p. 431-438.
5. De Groof, T.W.M., et al., *Nanobody-Targeted Photodynamic Therapy Selectively Kills Viral GPCR-Expressing Glioblastoma Cells.* Mol Pharm, 2019. **16**(7): p. 3145-3156.
6. Soroceanu, L., et al., *Human cytomegalovirus US28 found in glioblastoma promotes an invasive and angiogenic phenotype.* Cancer Res, 2011. **71**(21): p. 6643-53.
7. Harkins, L.E., et al., *Detection of human cytomegalovirus in normal and neoplastic breast epithelium.* Herpesviridae, 2010. **1**(1): p. 8.
8. Taher, C., et al., *High prevalence of human cytomegalovirus in brain metastases of patients with primary breast and colorectal cancers.* Transl Oncol, 2014. **7**(6): p. 732-40.
9. Collins-McMillen, D., et al., *Alternative promoters drive human cytomegalovirus reactivation from latency.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(35): p. 17492-17497.
10. Tarrant-Elorza, M., C.C. Rossetto, and G.S. Pari, *Maintenance and replication of the human cytomegalovirus genome during latency.* Cell Host Microbe, 2014. **16**(1): p. 43-54.
11. Naucler, C.S., J. Geisler, and K. Vetvik, *The emerging role of human cytomegalovirus infection in human carcinogenesis: a review of current evidence and potential therapeutic implications.* Oncotarget, 2019. **10**(42): p. 4333-4347.
12. Geisler, J., et al., *A Review of the Potential Role of Human Cytomegalovirus (HCMV) Infections in Breast Cancer Carcinogenesis and Abnormal Immunity.* Cancers (Basel), 2019. **11**(12).
13. Elder, E., et al., *Monocytes Latently Infected with Human Cytomegalovirus Evade Neutrophil Killing.* iScience, 2019. **12**: p. 13-26.

14. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation.* Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
15. Kumar, A., et al., *The Human Cytomegalovirus Strain DB Activates Oncogenic Pathways in Mammary Epithelial Cells.* EBioMedicine, 2018. **30**: p. 167-183.
16. Cobbs, C., *Cytomegalovirus is a tumor-associated virus: armed and dangerous.* Curr Opin Virol, 2019. **39**: p. 49-59.
17. Adamson, C.S. and M.M. Nevels, *Bright and Early: Inhibiting Human Cytomegalovirus by Targeting Major Immediate-Early Gene Expression or Protein Function.* Viruses, 2020. **12**(1).
18. Krishna, B.A., et al., *The Requirement for US28 During Cytomegalovirus Latency Is Independent of US27 and US29 Gene Expression.* Front Cell Infect Microbiol, 2020. **10**: p. 186.
19. Cai, Z.Z., et al., *Human cytomegalovirus-encoded US28 may act as a tumor promoter in colorectal cancer.* World J Gastroenterol, 2016. **22**(9): p. 2789-98.
20. Kumar A, Tripathy MK, Pasquereau S, Al Moussawi F, Abbas W, Coquard L, et al. The Human Cytomegalovirus Strain DB Activates Oncogenic Pathways in Mammary Epithelial Cells. EBioMedicine (2018) **30**:167–83. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.03.015.
21. Sandy Haidar Ahmad, Sebastien Pasquereau, Ranim El Baba, Zeina Nehme, Clara Lewandowski and Georges Herbein. Distinct Oncogenic Transcriptomes in Human Mammary Epithelial Cells Infected With Cytomegalovirus. Frontiers in Immunology (2021) **12**: Article 772160.
22. Liliana Soroceanu et al. Cancer Res. 2011 Nov 1;**71**(21):6643-53.
23. Boivin *et al.* J Clin Virol. 2012 Mar;**53**(3):208-13.
24. Göhring *et al.*, Computational and Structural Biotechnology Journal, 2015;**13**:153-158.
25. Jung et al. BMC Infectious Diseases (2019) **19**:388.

Последовательности

SEQ ID NO:	Последовательность	Описание
SEQ ID NO:1	MTPTTTTAELTTEFDYDEAATPCVFTDVLNQSKPVTL	N-концевой внеклеточный домен 1 (ECD1) US28, кодируемый штаммом DB HCMV (номер доступа KT959235), соответствующий положениям 1-37 SEQ ID NO:5.
SEQ ID NO:2	QYLLDHNSLAS	Внеклеточный домен 2 (ECD2) US28, кодируемый штаммом DB HCMV (номер доступа KT959235), соответствующий положениям 91-101 SEQ ID NO:5.
SEQ ID NO:3	TKKNNQCMTDYDYLEVS	Внеклеточный домен 3 (ECD3) US28, кодируемый штаммом DB HCMV (номер доступа KT959235), соответствующий положениям 167-183 SEQ ID NO:5.
SEQ ID NO:4	VDTLKLLKWISSSCEFERSLKRAL	Внеклеточный домен 4 (ECD4) US28, кодируемый штаммом DB HCMV (номер доступа KT959235), соответствующий положениям 250-273 SEQ ID NO:5.
SEQ ID NO:5	MTPTTTTAELTTEFDYDEAATPCVFTDVLNQSKPVTLFLYGVVFLFGSIG NFLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLA SVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIF WWIFAVIIAIPHFMVVTKKNNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIP LSVISYCYYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDT LKLLKWISSSCEFERSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELH CLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMSFSRRSSPSRRETSSDTLSDEVCRVSQIIP	Полная последовательность US28, кодируемая штаммом DB HCMV (номер доступа KT959235).

SEQ ID NO:6	TKKNNQCMTDYDYLEVS	ECD3 белка US28, кодируемого группой варианта 4N ECD3 штаммов HCMV (например, штамм DB, номер доступа KT959235)
SEQ ID NO:7	TKKDNQCMTDYDYLEVS	ECD3 белка US28, кодируемого группой варианта 4D ECD3 штаммов HCMV (например, штамм AF1, номер доступа GU179291.1)
SEQ ID NO:8	GFTFTDYY	Последовательность V_H-CDR1 1D3
SEQ ID NO: 9	IRSKANGYTT	Последовательность V_H-CDR2 1D3
SEQ ID NO: 10	ARDERRTAWLAY	Последовательность V_H-CDR3 1D3
SEQ ID NO: 11	MKLWLNWIFLVTLLNGIQCEVKLVESGGGLVQPGGSLRLACATSGFTFTDYYMSWVRQPPGKALEWLGFIRSKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNSQSILYLQMNTLRSEDSATYYCARDERRTAWLAYWGQGTLVTVSA	Незрелая форма рекомбинантно экспрессируемой последовательности V_H 1D3, где положения 1-19 соответствуют лидерной последовательности
SEQ ID NO: 12	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLACATSGFTFTDYYMSWVRQPPGKALEWLGFIRSKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNSQSILYLQMNTLRSEDSATYYCARDERRTAWLAYWGQGTLVTVSA	Зрелая форма последовательности V_H 1D3, без лидерной последовательности
SEQ ID NO: 13	MKLWLNWIFLVTLLNGIQC	Лидерная последовательность рекомбинантно экспрессируемой последовательности V_H 1D3
SEQ ID NO: 14	QSIVHSNGNTY	Последовательность V_L-CDR1 1D3
SEQ ID NO: 15	KVS	Последовательность V_L-CDR2 1D3
SEQ ID NO: 16	FQGSHVPTWT	Последовательность V_L-CDR3 1D3
SEQ ID NO: 17	MKLPVRLLVLMVWIPASSSDVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLDWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPTWTFGGGTKLEIK	Незрелая форма рекомбинантно экспрессируемой последовательности V_L 1D3, где положения 1-19 соответствуют лидерной последовательности

SEQ ID NO: 18	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLDWYLQKPGQSPK LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVP TWTFGGGTKLEIK	Зрелая форма последовательности V_L 1D3, без лидерной последовательности
SEQ ID NO: 19	MKLPVRLLVLMVWIPASSS	Лидерная последовательность рекомбинантно экспрессируемой последовательности V_L 1D3
SEQ ID NO: 20	MKLWLNWIFLVTLLNGIQC**EVKLVESGGGLVQPGGSLRLACATSGFT FTDYYMSWVRQPPGKALEWLGFIRSKANGYTTEYSASVKGRFTISR DNSQSILYLQMNTLRSEDSATYYCARDERRTAWLAYWGQGTLVTVS A**AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSS GVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIV PRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEV QFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCR VNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFF PEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFIYSKLNVQKSNWEAGN TFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK	Полная последовательность тяжелой цепи 1D3. Лидерная последовательность подчеркнута; она удаляется в зрелой последовательности. Зрелая последовательность V_H выделена жирным шрифтом.
SEQ ID NO: 21	MKLPVRLLVLMVWIPASSS**DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIV HSNGNTYLDWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPTWTFGGGTKLEIK**RADAAPTVSIFP PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDS KDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	Полная последовательность легкой цепи 1D3. Лидерная последовательность подчеркнута; она удаляется в зрелой последовательности. Зрелая последовательность V_L выделена жирным шрифтом.
SEQ ID NO: 22	GGGTTCACCTTCACTGATTACTAT	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность V_H-CDR1 1D3, как определено SEQ ID NO: 8
SEQ ID NO: 23	ATTAGAAGCAAAGCTAATGGTTACACAACA	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность V_H-CDR2 1D3, как определено SEQ ID NO: 9

SEQ ID NO: 24	GCAAGAGATGAGCGCCGTACTGCCTGGCTTGCTTAC	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность V_H-CDR3 1D3, как определено SEQ ID NO: 10
SEQ ID NO: 25	ATGAAGTTGTGGCTGAACTGGATTTTCCTTGTAACACTTTTAAATGGTATCCAGTGTGAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGTTCTCTGAGACTCGCCTGTGCAACTTCTGGGTTCACCTTCACTGATTACTATATGAGCTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGCACTTGAGTGGCTGGGTTTTATTAGAAGCAAAGCTAATGGTTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTTAAGGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGATAATTCCCAAAGCATCCTCTATCTTCAAATGAACACCCTGAGATCTGAGGACAGTGCCACTTATTACTGTGCAAGAGATGAGCGCCGTACTGCCTGGCTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGC	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая незрелую форму рекомбинантно экспрессируемой последовательности V_H 1D3, как определено SEQ ID NO: 11. Нуклеиновая последовательность, кодирующая лидерную последовательность, подчеркнута
SEQ ID NO: 26	GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGTTCTCTGAGACTCGCCTGTGCAACTTCTGGGTTCACCTTCACTGATTACTATATGAGCTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGCACTTGAGTGGCTGGGTTTTATTAGAAGCAAAGCTAATGGTTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTTAAGGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGATAATTCCCAAAGCATCCTCTATCTTCAAATGAACACCCTGAGATCTGAGGACAGTGCCACTTATTACTGTGCAAGAGATGAGCGCCGTACTGCCTGGCTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGC	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая зрелую форму последовательности V_H 1D3, без лидерной последовательности, как определено SEQ ID NO: 12
SEQ ID NO: 27	ATGAAGTTGTGGCTGAACTGGATTTTCCTTGTAACACTTTTAAATGGTATCCAGTGT	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая лидерную последовательность рекомбинантно экспрессируемой последовательности V_H 1D3, как определено SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 28	CAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTAT	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность V_L-CDR1 1D3, как определено SEQ ID NO: 14

SEQ ID NO: 29	AAAGTTTCC	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность V_L-CDR2 1D3, как определено SEQ ID NO: 15
SEQ ID NO: 30	TTTCAAGGTTCACATGTTCCCACGTGGACG	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность V_L-CDR3 1D3, как определено SEQ ID NO: 16
SEQ ID NO: 31	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGGTCTGGATTCCTGCTTCCAGCAGTGATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGACTGGTACCTTCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCCACGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая незрелую форму рекомбинантно экспрессируемой последовательности V_L 1D3, как определено SEQ ID NO: 17. Последовательность нуклеиновой кислоты, которая является подчеркнутой, кодирует положения 1-19 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, которые соответствуют лидерной последовательности.
SEQ ID NO: 32	GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGACTGGTACCTTCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCCACGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая зрелую форму последовательности V_L 1D3, без лидерной последовательности, как определено SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 33	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGGTCTGGATTCCTGCTTCCAGCAGT	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая лидерную последовательность рекомбинантно экспрессируемой последовательности

		V_L 1D3, как определено SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 34	ATGAAGTTGTGGCTGAACTGGATTTTCCTTGTAACACTTTTAAATGGT ATCCAGTGTGAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACA GCCGGGGGGTTCTCTGAGACTCGCCTGTGCAACTTCTGGGTTCACCTT CACTGATTACTATATGAGCTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGCAC TTGAGTGGCTGGGTTTTATTAGAAGCAAAGCTAATGGTTACACAACA GAGTACAGTGCATCTGTTAAGGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGATAA TTCCCAAAGCATCCTCTATCTTCAAATGAACACCCTGAGATCTGAGG ACAGTGCCACTTATTACTGTGCAAGAGATGAGCGCCGTACTGCCTGG CTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAA AACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCA AACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCC CTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGT GTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGC AGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCAC CTGCAACGTTGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAA ATTGTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCA GAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTC ACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGC AAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGA GGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTC AATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCT CCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGA TAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACA TTACTGTGGAGTGGCAGTGGAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAA GAACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCATCTACA GCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTT CACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGA AGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGA	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полную последовательность тяжелой цепи 1D3, как определено SEQ ID NO: 20. Последовательность нуклеиновой кислоты, которая является подчеркнутой, кодирует лидерную последовательность, которая удаляется в зрелом экспрессируемом белке.

SEQ ID NO: 35	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGGTCTGGATTCCTGCT TCCAGCAGTGATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTC AGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATT GTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGACTGGTACCTTCAGAAACC AGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTC TGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCA CACTCAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTAC TGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCCACGTGGACGTTCGGTGGAGGCACC AAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTT CCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGT GCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAG ATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGA TCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGT TGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCC ACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAA TGAGTGTTAG	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полную последовательность легкой цепи 1D3, как определено SEQ ID NO: 21. Последовательность нуклеиновой кислоты, которая является подчеркнутой, кодирует лидерную последовательность, которая удаляется в зрелом экспрессируемом белке.
SEQ ID NO: 36	MTPTTTTAELTTEFDYDEAATPCVFTDVLNQSKPVTLFLYGVVFLFGSIG NFLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLA SVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIF WWIFAVIIAIPHFMVVTKKNNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIP LSVISYCYYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDT LKLLKWISSSCEFERSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELH CLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMSFSRRSSPSRRETSSDTLSDEVCRVSQIIP	Полная последовательность US28, кодируемая штаммом Toledo HCMV (номер доступа GU937742). Последовательность ECD3 подчеркнута.
SEQ ID NO: 37	MTPTTTTAELTTEFDYDEDATPCVFTDVLNQSKPVTLFLYGVVFLFGSIG NFLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLA SVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIF WWIFAVIIAIPHFMVVTKKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIP LSVISYCYYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDT LKLLKWISSSCEFERSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELH CLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMSFSRRSSPSRRETSSDTLSDEVCRVSQIIP	Полная последовательность US28, кодируемая штаммом Towne HCMV (номер доступа FJ616285). Последовательность ECD3 подчеркнута.
SEQ ID NO: 38	MTPTTTTAELTTEFDYDEDATPCVFTDVLNQSKPVTLFLYGVVFLFGSIG NFLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLA	Полная последовательность US28, кодируемая штаммом VR1814 HCMV

	SVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIF WWIFAVIIAIPHFMVVTKKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIP LSVISYCYYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDT LKLLKWISSSCEFERSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELH CLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMSFSRRGSPSRRETSSDTLSDEVCRVSQIIP	(номер доступа GU179289). Последовательность ECD3 подчеркнута.
SEQ ID NO: 39	MTPTTTTTELTTEFEYDLGATPCTFTDVLNQSKPVTLFLYGVVFLFGSVG NFLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLA SVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIF WWIFAVIIAIPHFMVVTKKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIP LSVISYCYYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDT LKLLKWISSSCEFERSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELH CLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMSFSRRSSPSRRETSSDTLSDEVCRVSQIIP	Полная последовательность US28, кодируемая штаммом TB40/E HCMV (номер доступа KF297339). Последовательность ECD3 подчеркнута.
SEQ ID NO: 40	MTPTTTTAELTTEFDYDEDATPCVFTDVLNQSKPVTLFLYGVVFLFGSIG NFLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLA SVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIF WWIFAVIIAIPHFMVVTKKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIP LSVISYCYYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDT LKLLKWISSSCEFERSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELH CLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMSFSRRGSPSRRETSSDTLSDEVCRVSQIIP	Полная последовательность US28, кодируемая штаммом Merlin HCMV (номер доступа AY446894). Последовательность ECD3 подчеркнута.
SEQ ID NO: 41	MTPTTTTAELTTEFDYDEAATPCVFTDVLNQSKPVTLFLYGVVFLFGSIG NFLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLA SVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIF WWIFAVIIAIPHFMVVTKKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIP LSVISYCYYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDT LKLLKWISSSCEFERSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELH CLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMSFSRRSSPSRRETSSDTLSDEVCRVSQIIP	Полная последовательность US28, кодируемая штаммом JP HCMV (номер доступа GQ221975). Последовательность ECD3 подчеркнута.
SEQ ID NO: 42	MTPTTTTAELTTEFDYDEDATPCVFTDVLNQSKPVTLFLYGVVFLFGSIG NFLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLA SVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIF WWIFAVIIAIPHFMVVTKKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIP LSVISYCYYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDT	Полная последовательность US28, кодируемая штаммом Ad169 HCMV (номер доступа X17403.1). Последовательность ECD3 подчеркнута.

	LKLLKWISSSCEFERSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELH CLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMSFSRRSSPSRRETSSDTLSDEVCRVSQIIP	
SEQ ID NO: 43	MTPPTTTAELTTEFDYDEAATPCVFTDVLNQSKPVTLFLYGVVFLFGSIG NFLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLA SVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIF WWIFAVIIAIPHFMVVTKKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIP LSVISYCYYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDT LKLLKWISSSCEFERSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELH CLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMSFSRRSSPSRRETSSDTLSDEVCRVSQIIP	Полная последовательность US28, кодируемая штаммом AF1 HCMV (номер доступа GU179291.1). Последовательность ECD3 подчеркнута.
SEQ ID NO: 44	MTPTTTTAELTTEFDYDDEATPCVLTDVLNQSKPVTLFLYGVVFLFGSIG NFLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLA SVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIF WWIFAVIIAIPHFMVVTKKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIP LSVISYCYYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDT LKLLKWISSSCEFEKSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELH CLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMSFSRRSSPSRRETSSDTLSDEACRVSQIIP	Полная последовательность US28, кодируемая штаммом VHL/E HCMV (номер доступа L20501.1). Последовательность ECD3 подчеркнута.
SEQ ID NO: 45	MTPTTTTAELTTEFDYDEDATPCVFTDVLNQSKPVTLFLYGVVFLFGSIG NFLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLA SVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIF WWIFAVIIAIPHFMVVTKKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNIELMLGAFVIPL SVISYCYYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDTL KLLKWISSSCEFEKSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELHC LLAEFRQRLFSRDVSWYHSMSFSRRSSPSRRETSSDTLSDEACRVSQIIP	Полная последовательность US28, кодируемая штаммом DAVIS HCMV (номер доступа JX512198.1). Последовательность ECD3 подчеркнута.
SEQ ID NO: 46	MTPTTTTAELTTEFDYDEAATPCVFTDVLNQSKPVTLFLYGVVFIFGSIG NFLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLA SVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIF WWIFAVIIAIPHFMVVTKKNNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIP LSVISYCYYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDT LKLLKWISSSCEFEKSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELH CLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMSFSRRSSPSRRETSSDTLSDEVCRVSQIIP	Полная последовательность US28, кодируемая штаммом TR HCMV (номер доступа KF021605.1). Последовательность ECD3 подчеркнута.
SEQ ID NO: 47	MTPTTTTAELTTEFDYDEAATPCVFTDVLNQSKPVTLFLYGVVFLFGSIG NFLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLA	Слитый белок US28, содержащий последовательность US28 из штамма

	SVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIF WWIFAVIIAIPHFMVVTKKNNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIP LSVISYCYYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDT LKLLKWISSSCEFERSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELH CLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMSFSRRSSPSRRETSSDTLSDEVCRVSQIIP AAALEGSHHHHHH	DB HCMV (номер дост.: KT959235), слитый с меткой 6His в С-концевой части
SEQ ID NO: 48	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEW IGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS	Вариабельная область тяжелой цепи OKT3 мыши (mOKT3)
SEQ ID NO: 49	RYTMH	Последовательность V_H-CDR1 OKT3
SEQ ID NO: 50	YINPSRGYTNYNQKFK	Последовательность V_H-CDR2 OKT3
SEQ ID NO: 51	YCARYYDD	Последовательность V_H-CDR3 OKT3
SEQ ID NO: 52	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYD TSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGS GTKLEIN	Вариабельная область легкой цепи mOKT3
SEQ ID NO: 53	SASSSVSYMNW	Последовательность V_L-CDR1 OKT3
SEQ ID NO: 54	TSKLASG	Последовательность V_L-CDR2 OKT3
SEQ ID NO: 55	QWSSNPFTF	Последовательность V_L-CDR3 OKT3
SEQ ID NO: 56	GGGGSGGGGSGGGGS	Линкерная последовательность
SEQ ID NO: 57	GGGGS	Частичная линкерная последовательность
SEQ ID NO: 58	[EVKLVESGGGLVQPGGSLRLACATSGFTFTDYYMSWVRQPPGKALEW LGFIRSKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNSQSILYLQMNTLRSEDSATYY CARDERRTAWLAYWGQGTLVTVSA][ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP][SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT][KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK][GGGGSGGGGS][QVQLQQSGAELARPGASVKMS CKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKAT	Первая полипептидная последовательность предпочтительной молекулы BiTE, содержащая последовательность тяжелой цепи, которая содержит область VH 1D3, линкерную последовательность и последовательность scFv mOKT3 В качестве дополнительной информации начало и конец

	LTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTV SS][GGGGSGGGGSGGGGS][QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSY MNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAE DAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIN]	отдельных функциональных блоков последовательности обозначены «[» и «]» соответственно, хотя следует понимать, что первый полипептид содержит все эти последовательности в одной непрерывной полипептидной цепи, в представленном порядке.
SEQ ID NO: 59	[DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLDWYLQKPGQSP KLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHV PTWTFGGGTKLEIK][RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC]	Вторая полипептидная последовательность предпочтительной молекулы BiTE, содержащая последовательность легкой цепи, которая содержит область VL 1D3, или, например, имеющая последовательность SQE ID NO: 59 В качестве дополнительной информации начало и конец отдельных функциональных блоков последовательности обозначены «[» и «]» соответственно, хотя следует понимать, что первый полипептид содержит все эти последовательности в одной непрерывной полипептидной цепи.
SEQ ID NO: 60	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAVSGPGLIFKFTGVAWYRRQVPGAKR GLVALITGDGATRYGDSVKGRFTVSRDIAAKRVYLEMNDLRSEDTAVY YCKTGEYWGQGTQVTVSS	Основная последовательность VUN100, как показано на странице 24 WO 2019/151865.
SEQ ID NO: 61	MHSSALLCCLVLLTGVRAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAVSGPGLIF KFTGVAWYRRQVPGAKRGLVALITGDGATRYGDSVKGRFTVSRDIAAK	Последовательность VUN100 SEQ ID NO:60 с дополнительным N-концевым сигнальным пептидом (подчеркнут) и

	RVYLEMNDLRSEDTAVYYCKTGEYWGQGTQVTVSSEQKLISEEDLHHHHHH	последовательностями С-концевой метки Myc-6His (подчеркнуты двойной линией)
SEQ ID NO: 62	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAVSGPGLIFKFTGVAWYRRQVPGAKRGLVALITGDGATRYGDSVKGRFTVSRDIAAKRVYLEMNDLRSEDTAVYYCKTGEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAVSGPGLIFKFTGVAWYRRQVPGAKRGLVALITGDGATRYGDSVKGRFTVSRDIAAKRVYLEMNDLRSEDTAVYYCKTGEYWGQGTQVTVSS	VUN100b, бивалентная молекула VUN100, состоящая из двух копий VUN100, соединенных линкерной последовательностью (линкерная последовательность подчеркнута)
SEQ ID NO: 63	MHSSALLCCLVLLTGVRAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAVSGPGLIFKFTGVAWYRRQVPGAKRGLVALITGDGATRYGDSVKGRFTVSRDIAAKRVYLEMNDLRSEDTAVYYCKTGEYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAVSGPGLIFKFTGVAWYRRQVPGAKRGLVALITGDGATRYGDSVKGRFTVSRDIAAKRVYLEMNDLRSEDTAVYYCKTGEYWGQGTQVTVSSEQKLISEEDLHHHHHH	Последовательность VUN100b SEQ ID NO:62 с дополнительным N-концевым сигнальным пептидом (подчеркнут) и последовательностями С-концевой метки Myc-6His (подчеркнуты двойной линией)
SEQ ID NO: 65	ATGAAGTTGTGGCTGAACTGGATTTTCCTTGTAACACTTTTAAATGGTATCCAGTGTGAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCATCCATTAGTAGTGGTGGTAGCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGATAATGCCAGGAACATCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGAGGCGGGTCTACTATGATTACGACGGGGCTGGGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	Нуклеиновая кислота, кодирующая незрелую форму рекомбинантно экспрессируемой последовательности VH 1G9, как определено SEQ ID NO: 67
SEQ ID NO: 66	GAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCATCCATTAGTAGTGGTGGTAGCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGATAATGCCAGGAACATCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTAC	Нуклеиновая кислота, кодирующая зрелую форму последовательности VH 1G9, как определено SEQ ID NO: 68

	TGTGCAAGAGGCGGGTCTACTATGATTACGACGGGGCTGGGGTTTGC TTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	
SEQ ID NO: 67	MKLWLNWIFLVTLLNGIQCEVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFS SYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGSTYYPDSVKGRFTISRDNARNILY LQMSSLRSEDTAMYYCARGGSTMITTGLGFAYWGQGTLVTVSA	Незрелая форма рекомбинантно экспрессируемой последовательности VH 1G9, где положения 1-19 соответствуют лидерной последовательности
SEQ ID NO: 68	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWV ASISSGGSTYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCARG GSTMITTGLGFAYWGQGTLVTVSA	Зрелая форма последовательности VH 1G9, без лидерной последовательности
SEQ ID NO: 69	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGGTCTGGATTCCTGCT TCCAGCAGTCAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCA TCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGT AAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAA GATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCT TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGC ATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAG TAACCCACCCCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	Нуклеиновая кислота, кодирующая незрелую форму рекомбинантно экспрессируемой последовательности VL 1G9, как определено SEQ ID NO: 71
SEQ ID NO: 70	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGG GAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACAT GCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTT ATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCA GTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCT GAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACC CCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	Нуклеиновая кислота, кодирующая зрелую форму последовательности VL 1G9, как определено SEQ ID NO: 72
SEQ ID NO: 71	MKLPVRLLVLMVWIPASSSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSY MHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAE DAATYYCQQWSSNPPLTFGAGTKLELK	Незрелая форма рекомбинантно экспрессируемой последовательности VL 1G9, где положения 1-19 соответствуют лидерной последовательности

SEQ ID NO: 72	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPPLTFGAGTKLELK	Зрелая форма последовательности VL 1G9, без лидерной последовательности
SEQ ID NO: 73	AGCTATGCCATGTCT	Нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность VH-CDR1 1G9, 1E8, как определено SEQ ID NO: 76
SEQ ID NO: 74	TCCATTAGTAGTGGTGGTAGCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGC	Нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность VH-CDR2 1G9, как определено SEQ ID NO: 77
SEQ ID NO: 75	GGCGGGTCTACTATGATTACGACGGGGCTGGGGTTTGCTTAC	Нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность VH-CDR3 1G9, как определено SEQ ID NO: 78
SEQ ID NO: 76	SYAMS	Последовательность VH-CDR1 1G9, 1E8
SEQ ID NO: 77	SISSGGSTYYPDSVKG	Последовательность VH-CDR2 1G9
SEQ ID NO: 78	GGSTMITTGLGFAY	Последовательность VH-CDR3 1G9
SEQ ID NO: 79	AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCAC	Нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность VL-CDR1 1G9, 1E8, как определено SEQ ID NO: 82
SEQ ID NO: 80	GACACATCCAAACTGGCTTCT	Нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность VL-CDR2 1G9, 1C10, 1A10, как определено SEQ ID NO: 83
SEQ ID NO: 81	CAGCAGTGGAGTAGTAACCCACCCCTCACG	Нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность VL-CDR3 1G9, как определено SEQ ID NO: 84
SEQ ID NO: 82	SASSSVSYMH	Последовательность VL-CDR1 1G9, 1E8
SEQ ID NO: 83	DTSKLAS	Последовательность VL-CDR2 1G9, 1C10, 1A10
SEQ ID NO: 84	QQWSSNPPLT	Последовательность VL-CDR3 1G9

SEQ ID NO: 85	ATGAAGTTGTGGCTGAACTGGATTTTCCTTGTAACACTTTTAAATGGT ATCCAGTGTGAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAA GCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTT CAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGC TGGAGTGGGTCGCATCCATTAGTAGTGGTGGTAGAACCTACTATCCA GACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGATAATGCCAGGAA CATCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAAGACACGGCCA TCTATTACTGTGCACGAGGCGGGACTCGTCATTCCTACGGCAACGGG TTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	Нуклеиновая кислота, кодирующая незрелую форму рекомбинантно экспрессируемой последовательности VH 1E8, как определено SEQ ID NO: 87
SEQ ID NO: 86	GAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAG GGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCT ATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGG GTCGCATCCATTAGTAGTGGTGGTAGAACCTACTATCCAGACAGTGT GAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGATAATGCCAGGAACATCCTGT ACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAAGACACGGCCATCTATTAC TGTGCACGAGGCGGGACTCGTCATTCCTACGGCAACGGGTTTGACTA CTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	Нуклеиновая кислота, кодирующая зрелую форму последовательности VH 1E8, как определено SEQ ID NO: 88
SEQ ID NO: 87	MKLWLNWIFLVTLLNGIQCEVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFS SYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGRTYYPDSVKGRFTISRDNARNILY LQMSSLRSEDTAIYYCARGGTRHSYGNGFDYWGQGTTLTVSS	Незрелая форма рекомбинантно экспрессируемой последовательности VH 1E8, где положения 1-19 соответствуют лидерной последовательности
SEQ ID NO: 88	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWV ASISSGGRTYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAIYYCARG GTRHSYGNGFDYWGQGTTLTVSS	Зрелая форма последовательности VH 1E8, без лидерной последовательности
SEQ ID NO: 89	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGGTCTGGATTCCTGCT TCCAGCAGTCAAATTGTTCTCTCCCAGTCTCCAACAATCATGTCTGCA TCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGT AAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAA GATGGATTTATGACTCATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCT TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGC	Нуклеиновая кислота, кодирующая незрелую форму рекомбинантно экспрессируемой последовательности VL 1E8, как определено SEQ ID NO: 91

	ATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAG TAACCCACCCATCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	
SEQ ID NO: 90	CAAATTGTTCTCTCCCAGTCTCCAACAATCATGTCTGCATCTCCAGGG GAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACAT GCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTT ATGACTCATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCA GTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCT GAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAGTAACCCACC CATCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	Нуклеиновая кислота, кодирующая зрелую форму последовательности VL 1E8, как определено SEQ ID NO: 92
SEQ ID NO: 91	MKLPVRLLVLMVWIPASSSQIVLSQSPTIMSASPGEKVTMTCSASSSVSY MHWYQQKSGTSPKRWIYDSSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAE DAATYYCQQWTSNPPITFGAGTKLELK	Незрелая форма рекомбинантно экспрессируемой последовательности VL 1E8, где положения 1-19 соответствуют лидерной последовательности
SEQ ID NO: 92	QIVLSQSPTIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYD SSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWTSNPPITFG AGTKLELK	Зрелая форма последовательности VL 1E8, без лидерной последовательности
SEQ ID NO: 93	TCCATTAGTAGTGGTGGTAGAACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGG C	Нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность VH-CDR2 1E8, как определено SEQ ID NO: 95
SEQ ID NO: 94	GGCGGGACTCGTCATTCCTACGGCAACGGGTTTGACTAC	Нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность VH-CDR3 1E8, как определено SEQ ID NO: 96
SEQ ID NO: 95	SISSGGRTYYPDSVKG	Последовательность VH-CDR2 1E8
SEQ ID NO: 96	GGTRHSYGNGFDY	Последовательность VH-CDR3 1E8
SEQ ID NO: 97	GACTCATCCAAACTGGCTTCT	Нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность VL-CDR2 1E8, как определено SEQ ID NO: 99
SEQ ID NO: 98	CAGCAGTGGACTAGTAACCCACCCATCACG	Нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность VL-CDR3 1E8, как определено SEQ ID NO: 100
SEQ ID NO: 99	DSSKLAS	Последовательность VL-CDR2 1E8

SEQ ID NO: 100	QQWTSNPPIT	Последовательность VL-CDR3 1E8
SEQ ID NO: 101	ATGAAGTTGTGGCTGAACTGGATTTTCCTTGTAACACTTTTAAATGGT ATCCAGTGTGAAGTGAAACTGGTTGAGTCTGGGGGAGTCTTAGTGAA GCCTGGAGGGTCCCTGAAATTTTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTT CAGTAGCCATGCCTTGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGAC TGGAGTGGGTCGCATCCATTAGTAGTCGTGGTCGAACCTACTATCCA GACAGTGTAAAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGATAATGCCAGGAA CATCCTGTATCTGCAAGTGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCA TGTATTATTGTACAAGAGGCGGGACTCATTATTCCTACGGCAACGGTT TTGACTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	Нуклеиновая кислота, кодирующая незрелую форму рекомбинантно экспрессируемой последовательности VH 1C10, как определено SEQ ID NO: 103
SEQ ID NO: 102	GAAGTGAAACTGGTTGAGTCTGGGGGAGTCTTAGTGAAGCCTGGAGG GTCCCTGAAATTTTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCCA TGCCTTGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGACTGGAGTGGG TCGCATCCATTAGTAGTCGTGGTCGAACCTACTATCCAGACAGTGTA AAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGATAATGCCAGGAACATCCTGTA TCTGCAAGTGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTATT GTACAAGAGGCGGGACTCATTATTCCTACGGCAACGGTTTTGACTTCT GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	Нуклеиновая кислота, кодирующая зрелую форму последовательности VH 1C10, как определено SEQ ID NO: 104
SEQ ID NO: 103	MKLWLNWIFLVTLLNGIQCEVKLVESGGVLVKPGGSLKFSCAASGFTFS SHALSWVRQTPEKRLEWVASISSRGRTYYPDSVKGRFTVSRDNARNILY LQVSSLRSEDTAMYYCTRGGTHYSYGNGFDFWGQGTTLTVSS	Незрелая форма рекомбинантно экспрессируемой последовательности VH 1C10, где положения 1-19 соответствуют лидерной последовательности
SEQ ID NO: 104	EVKLVESGGVLVKPGGSLKFSCAASGFTFSSHALSWVRQTPEKRLEWVA SISSRGRTYYPDSVKGRFTVSRDNARNILYLQVSSLRSEDTAMYYCTRGG THYSYGNGFDFWGQGTTLTVSS	Зрелая форма последовательности VH 1C10, без лидерной последовательности
SEQ ID NO: 105	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGGTCTGGATTCCTGCT TCCAGCAGTCAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCA TCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGTCAGCTCAAGTGT TAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAA GATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCT	Нуклеиновая кислота, кодирующая незрелую форму рекомбинантно экспрессируемой последовательности VL 1C10, как определено SEQ ID NO: 107

	TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCACCA TGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAAT AACCCACCCATCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAACTGAAA	
SEQ ID NO: 106	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGG GAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGTCAGCTCAAGTGTTAGTTACAT GCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTT ATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCA GTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCACCATGGAGGCT GAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAATAACCCACC CATCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAACTGAAA	Нуклеиновая кислота, кодирующая зрелую форму последовательности VL 1C10, как определено SEQ ID NO: 108
SEQ ID NO: 107	MKLPVRLLVLMVWIPASSSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSVSSSVSY MHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTMEAE DAATYYCQQWSNNPPITFGAGTKLELK	Незрелая форма рекомбинантно экспрессируемой последовательности VL 1C10, где положения 1-19 соответствуют лидерной последовательности
SEQ ID NO: 108	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSVSSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYD TSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTMEAEDAATYYCQQWSNNPPITFG AGTKLELK	Зрелая форма последовательности VL 1C10, без лидерной последовательности
SEQ ID NO: 109	AGCCATGCCTTGTCT	Нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность VH-CDR1 1C10, 1A10, как определено SEQ ID NO: 112
SEQ ID NO: 110	TCCATTAGTAGTCGTGGTCGAACCTACTATCCAGACAGTGTAAAGGG C	Нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность VH-CDR2 1C10, 1A10, как определено SEQ ID NO: 113
SEQ ID NO: 111	GGCGGGACTCATTATTCCTACGGCAACGGTTTTGACTTC	Нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность VH-CDR3 1C10, 1A10, как определено SEQ ID NO: 114
SEQ ID NO: 112	SHALS	Последовательность VH-CDR1 1C10, 1A10
SEQ ID NO: 113	SISSRGRTYYPDSVKG	Последовательность VH-CDR2 1C10, 1A10

SEQ ID NO: 114	GGTHYSYGNGFDF	Последовательность VH-CDR3 1C10, 1A10
SEQ ID NO: 115	AGTGTCAGCTCAAGTGTTAGTTACATGCAC	Нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность VL-CDR1 1C10, 1A10, как определено SEQ ID NO: 117
SEQ ID NO: 116	CAGCAGTGGAGTAATAACCCACCCATCACG	Нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность VL-CDR3 1C10, 1A10, как определено SEQ ID NO: 118
SEQ ID NO: 117	SVSSSVSYMH	Последовательность VL-CDR1 1C10, 1A10
SEQ ID NO: 118	QQWSNNPPIT	Последовательность VL-CDR3 1C10, 1A10
SEQ ID NO: 119	ATGAAGTTGTGGCTGAACTGGATTTTCCTTGTAACACTTTTAAATGGT ATCCAGTGTGAAGTGAAACTGGTTGAGTCTGGGGGAGTCTTAGTGAA GCCTGGAGGGTCCCTGAAATTTTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCT CAGTAGCCATGCCTTGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGAC TGGAGTGGGTCGCATCCATTAGTAGTCGTGGTCGAACCTACTATCCA GACAGTGTAAAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGATAATGCCAGGAA CATCCTGTATCTGCAAGTGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCA TGTATTATTGTACAAGAGGCGGGACTCATTATTCCTACGGCAACGGTT TTGACTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	Нуклеиновая кислота, кодирующая незрелую форму рекомбинантно экспрессируемой последовательности VH 1A10, как определено SEQ ID NO: 121
SEQ ID NO: 120	GAAGTGAAACTGGTTGAGTCTGGGGGAGTCTTAGTGAAGCCTGGAGG GTCCCTGAAATTTTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTAGCCA TGCCTTGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGACTGGAGTGGG TCGCATCCATTAGTAGTCGTGGTCGAACCTACTATCCAGACAGTGTA AAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGATAATGCCAGGAACATCCTGTA TCTGCAAGTGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTATT GTACAAGAGGCGGGACTCATTATTCCTACGGCAACGGTTTTGACTTCT GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	Нуклеиновая кислота, кодирующая зрелую форму последовательности VH 1A10, как определено SEQ ID NO: 122
SEQ ID NO: 121	MKLWLNWIFLVTLLNGIQCEVKLVESGGVLVKPGGSLKFSCAASGFTLS SHALSWVRQTPEKRLEWVASISSRGRTYYPDSVKGRFTVSRDNARNILY LQVSSLRSEDTAMYYCTRGGTHYSYGNGFDFWGQGTTLTVSS	Незрелая форма рекомбинантно экспрессируемой последовательности VH 1A10, где положения 1-19

		соответствуют лидерной последовательности
SEQ ID NO: 122	EVKLVESGGVLVKPGGSLKFSCAASGFTLSSHALSWVRQTPEKRLEWVA SISSRGRTYYPDSVKGRFTVSRDNARNILYLQVSSLRSEDTAMYYCTRGG THYSYGNGFDFWGQGTTLTVSS	Зрелая форма последовательности VH 1A10, без лидерной последовательности
SEQ ID NO: 123	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGGTCTGGATTCCTGCT TCCAGCAGTCAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCA TCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGTCAGCTCAAGTGT TAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAA GATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCT TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCACCA TGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAAT AACCCACCCATCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAACTGAAA	Нуклеиновая кислота, кодирующая незрелую форму рекомбинантно экспрессируемой последовательности VL 1A10, как определено SEQ ID NO: 125
SEQ ID NO: 124	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGG GAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGTCAGCTCAAGTGTTAGTTACAT GCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTT ATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCA GTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCACCATGGAGGCT GAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAATAACCCACC CATCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAACTGAAA	Нуклеиновая кислота, кодирующая зрелую форму последовательности VL 1A10, как определено SEQ ID NO: 126
SEQ ID NO: 125	MKLPVRLLVLMVWIPASSSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSVSSSVSY MHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTMEAE DAATYYCQQWSNNPPITFGAGTKLELK	Незрелая форма рекомбинантно экспрессируемой последовательности VL 1A10, где положения 1-19 соответствуют лидерной последовательности
SEQ ID NO: 126	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSVSSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYD TSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTMEAEDAATYYCQQWSNNPPITFG AGTKLELK	Зрелая форма последовательности VL 1A10, без лидерной последовательности
SEQ ID NO: 127	MTPTTTTAELTTEFDYDEDAAPCVLTDVLNQSKPVTLFLYGVVFLFGSIG NFLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLA SVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIF WWIFAVIIAIPHFMVVTKKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIP	Полная последовательность US28, кодируемая штаммом BL HCMV (номер доступа MW980585.1).

	LSVISYCYYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFLDT LKLLKWISSSCEFEKSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELH CLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMSFSRRSSPSRRETSSDTLSDEACRVSQIIP	Последовательность ECD3 подчеркнута.
SEQ ID NO: 147	ATGAAGTTGTGGCTGAACTGGATTTTCCTTGTAACACTTTTAAATGGT ATCCAGTGTGAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAA GCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTT CAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGC TGGAGTGGGTCGCATCCATTAGTAGTGGTGGTAGCACCTACTATCCA GACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGATAATGCCAGGAA CATCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCA TGTATTACTGTGCAAGAGGCGGGTCTACTATGATTACGACGGGGCTG GGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCACA AAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCC AAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTC CCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGG TGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAG CAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCA CCTGCAACGTTGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAA AATTGTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCC AGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCT CACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAG CAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGG AGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAG CACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCT CAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGC TCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGG ATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGAC ATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACA AGAACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCATCTAC AGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTT	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полную последовательность тяжелой цепи 1G9, как определено SEQ ID NO: 149. Последовательность нуклеиновой кислоты, которая является подчеркнутой, кодирует лидерную последовательность, которая удаляется в зрелом экспрессируемом белке.

	TCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAG AAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGA	
SEQ ID NO: 148	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGGTCTGGATTCCTGCT TCCAGCAGTCAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCA TCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGT AAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAA GATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCT TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGC ATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAG TAACCCACCCCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAC GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGC AGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCT ACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACG ACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGAC AGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTA TGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAA CTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAG	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полную последовательность легкой цепи 1G9, как определено SEQ ID NO: 150. Последовательность нуклеиновой кислоты, которая является подчеркнутой, кодирует лидерную последовательность, которая удаляется в зрелом экспрессируемом белке.
SEQ ID NO: 149	MKLWLNWIFLVTLLNGIQC**EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFT FSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGSTYYPDSVKGRFTISRDNAR NILYLQMSSLRSEDTAMYYCARGGSTMITTGLGFAYWGQGTLVTVS A**AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSS GVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIV PRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEV QFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCR VNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFF PEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFIYSKLNVQKSNWEAGN TFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK	Полная последовательность тяжелой цепи 1G9. Лидерная последовательность подчеркнута; она удаляется в зрелой последовательности. Зрелая последовательность V_H выделена жирным шрифтом.
SEQ ID NO: 150	MKLPVRLLVLMVWIPASSS**QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVS YMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSM EAEDAATYYCQQWSSNPPLTFGAGTKLELK**RADAAPTVSIFPPSSEQL TSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTY SMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	Полная последовательность легкой цепи 1G9. Лидерная последовательность подчеркнута; она удаляется в зрелой последовательности. Зрелая

		последовательность V_L выделена жирным шрифтом.
SEQ ID NO: 151	ATGAAGTTGTGGCTGAACTGGATTTTCCTTGTAACACTTTTAAATGGT ATCCAGTGTGAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAA GCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTT CAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGC TGGAGTGGGTCGCATCCATTAGTAGTGGTGGTAGAACCTACTATCCA GACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGATAATGCCAGGAA CATCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAAGACACGGCCA TCTATTACTGTGCACGAGGCGGGACTCGTCATTCCTACGGCAACGGG TTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCACAAAA CGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAA CTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTG AGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTG CACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGC TCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTG CAACGTTGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATT GTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGA AGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCAC CATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAA GGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGG TGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACT TTCCGCTCAGTCAGTGAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAAT GGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCA CAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAA AGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTAC TGTGGAGTGGCAGTGGAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAAC ACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCATCTACAGCAA GCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTCACCT GCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGC CTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGA	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полную последовательность тяжелой цепи 1E8, как определено SEQ ID NO: 153. Последовательность нуклеиновой кислоты, которая является подчеркнутой, кодирует лидерную последовательность, которая удаляется в зрелом экспрессируемом белке.

SEQ ID NO: 152	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGGTCTGGATTCCTGCT TCCAGCAGTCAAATTGTTCTCTCCCAGTCTCCAACAATCATGTCTGCA TCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGT AAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAA GATGGATTTATGACTCATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCT TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGC ATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGACTAG TAACCCACCCATCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAC GGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGC AGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCT ACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACG ACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGAC AGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTA TGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAA CTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAG	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полную последовательность легкой цепи 1E8, как определено SEQ ID NO: 154. Последовательность нуклеиновой кислоты, которая является подчеркнутой, кодирует лидерную последовательность, которая удаляется в зрелом экспрессируемом белке.
SEQ ID NO: 153	MKLWLNWIFLVTLLNGIQC**EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFT FSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGRTYYPDSVKGRFTISRDNAR NILYLQMSSLRSEDTAIYYCARGGTRHSYGNGFDYWGQGTTLTVSS** AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVP RDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEV QFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCR VNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFF PEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFIYSKLNVQKSNWEAGN TFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK	Полная последовательность тяжелой цепи 1E8. Лидерная последовательность подчеркнута; она удаляется в зрелой последовательности. Зрелая последовательность V_H выделена жирным шрифтом.
SEQ ID NO: 154	MKLPVRLLVLMVWIPASSS**QIVLSQSPTIMSASPGEKVTMTCSASSSVS YMHWYQQKSGTSPKRWIYDSSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSM EAEDAATYYCQQWTSNPPITFGAGTKLELK**RADAAPTVSIFPPSSEQL TSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTY SMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	Полная последовательность легкой цепи 1E8. Лидерная последовательность подчеркнута; она удаляется в зрелой последовательности. Зрелая последовательность V_L выделена жирным шрифтом.

SEQ ID NO: 155	ATGAAGTTGTGGCTGAACTGGATTTTCCTTGTAACACTTTTAAATGGT ATCCAGTGTGAAGTGAAACTGGTTGAGTCTGGGGGAGTCTTAGTGAA GCCTGGAGGGTCCCTGAAATTTTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTT CAGTAGCCATGCCTTGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGAC TGGAGTGGGTCGCATCCATTAGTAGTCGTGGTCGAACCTACTATCCA GACAGTGTAAAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGATAATGCCAGGAA CATCCTGTATCTGCAAGTGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCA TGTATTATTGTACAAGAGGCGGGACTCATTATTCCTACGGCAACGGTT TTGACTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCACAAAAC GACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAAC TAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGA GCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGC ACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCT CAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGC AACGTTGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGT GCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAG TATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCA TTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAG GATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGT GCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTT TCCGCTCAGTCAGTGAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAAT GGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCA CAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAA AGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTAC TGTGGAGTGGCAGTGGAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAAC ACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCATCTACAGCAA GCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTCACCT GCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGC CTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGA	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полную последовательность тяжелой цепи 1C10, как определено SEQ ID NO: 157. Последовательность нуклеиновой кислоты, которая является подчеркнутой, кодирует лидерную последовательность, которая удаляется в зрелом экспрессируемом белке.
SEQ ID NO: 156	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGGTCTGGATTCCTGCT TCCAGCAGTCAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCA	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полную

	TCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGTCAGCTCAAGTGT TAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAA GATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCT TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCACCA TGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAAT AACCCACCCATCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAACTGAAACG GGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCA GTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTA CCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGAC AAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAG CACCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATG AACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACT TCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAG	последовательность легкой цепи 1C10, как определено SEQ ID NO: 158. Последовательность нуклеиновой кислоты, которая является подчеркнутой, кодирует лидерную последовательность, которая удаляется в зрелом экспрессируемом белке.
SEQ ID NO: 157	MKLWLNWIFLVTLLNGIQC**EVKLVESGGVLVKPGGSLKFSCAASGFT FSSHALSWVRQTPEKRLEWVASISSRGRTYYPDSVKGRFTVSRDNAR NILYLQVSSLRSEDTAMYYCTRGGTHYSYGNGFDFWGQGTTLTVSS** AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVP RDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEV QFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCR VNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFF PEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFIYSKLNVQKSNWEAGN TFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK	Полная последовательность тяжелой цепи 1C10. Лидерная последовательность подчеркнута; она удаляется в зрелой последовательности. Зрелая последовательность V_H выделена жирным шрифтом.
SEQ ID NO: 158	MKLPVRLLVLMVWIPASSS**QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSVSSSVS YMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTM EAEDAATYYCQQWSNNPPITFGAGTKLELK**RADAAPTVSIFPPSSEQL TSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTY SMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	Полная последовательность легкой цепи 1C10. Лидерная последовательность подчеркнута; она удаляется в зрелой последовательности. Зрелая последовательность V_L выделена жирным шрифтом.
SEQ ID NO: 159	ATGAAGTTGTGGCTGAACTGGATTTTCCTTGTAACACTTTTAAATGGT ATCCAGTGTGAAGTGAAACTGGTTGAGTCTGGGGGAGTCTTAGTGAA	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полную

	GCCTGGAGGGTCCCTGAAATTTTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCT CAGTAGCCATGCCTTGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGAC TGGAGTGGGTCGCATCCATTAGTAGTCGTGGTCGAACCTACTATCCA GACAGTGTAAAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGATAATGCCAGGAA CATCCTGTATCTGCAAGTGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCA TGTATTATTGTACAAGAGGCGGGACTCATTATTCCTACGGCAACGGTT TTGACTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCACAAAAC GACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAAC TAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGA GCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGC ACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCT CAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGC AACGTTGCCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGT GCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAG TATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCA TTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAG GATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGT GCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTT TCCGCTCAGTCAGTGAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAAT GGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCA CAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAA AGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTAC TGTGGAGTGGCAGTGGAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAAC ACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCATCTACAGCAA GCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTCACCT GCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGC CTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGA	последовательность тяжелой цепи 1A10, как определено SEQ ID NO: 161. Последовательность нуклеиновой кислоты, которая является подчеркнутой, кодирует лидерную последовательность, которая удаляется в зрелом экспрессируемом белке.
SEQ ID NO: 160	<u>ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGGTCTGGATTCCTGCT TCCAGCAGT</u>CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCA TCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGTCAGCTCAAGTGT TAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAA	Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полную последовательность легкой цепи 1A10, как определено SEQ ID NO:

	GATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCT TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCACCA TGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAAT AACCCACCCATCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAACTGAAACG GGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCA GTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTA CCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGAC AAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAG CACCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATG AACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACT TCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAG	162. Последовательность нуклеиновой кислоты, которая является подчеркнутой, кодирует лидерную последовательность, которая удаляется в зрелом экспрессируемом белке.
SEQ ID NO: 161	MKLWLNWIFLVTLLNGIQC**EVKLVESGGVLVKPGGSLKFSCAASGFT LSSHALSWVRQTPEKRLEWVASISSRGRTYYPDSVKGRFTVSRDNAR NILYLQVSSLRSEDTAMYYCTRGGTHYSYGNGFDFWGQGTTLTVSS** AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVP RDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEV QFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCR VNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFF PEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFIYSKLNVQKSNWEAGN TFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK	Полная последовательность тяжелой цепи 1A10. Лидерная последовательность подчеркнута; она удаляется в зрелой последовательности. Зрелая последовательность V_H выделена жирным шрифтом.
SEQ ID NO: 162	MKLPVRLLVLMVWIPASSS**QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSVSSSVS YMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTM EAEDAATYYCQQWSNNPPITFGAGTKLELK**RADAAPTVSIFPPSSEQL TSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTY SMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	Полная последовательность легкой цепи 1A10. Лидерная последовательность подчеркнута; она удаляется в зрелой последовательности. Зрелая последовательность V_L выделена жирным шрифтом.
SEQ ID NO: 167	S(Y/H)A(M/L)S	Консенсусная последовательность V_H-CDR1
SEQ ID NO: 168	SISS(G/R)G(S/R)TYYPDSVKG	Консенсусная последовательность V_H-CDR2, вариант 1

SEQ ID NO: 169	GG(S/T)(T/R/H)(M/H/Y)(I/S)(T/Y)(T/G)(G/N)(L/*)GF(A/D)(Y/F)	Консенсусная последовательность V_H-CDR3, вариант 1
SEQ ID NO: 170	S(A/V)SSSVSYMH	Консенсусная последовательность V_L-CDR1
SEQ ID NO: 171	D(T/S)SKLAS	Консенсусная последовательность V_L-CDR2
SEQ ID NO: 172	QQW(S/T/*)SN(*/N)PP(I/L)T	Консенсусная последовательность V_L-CDR3, вариант 1
SEQ ID NO: 173	MT**Q**TTT_**T**ELTTEF**D**YD**LG**A**AL**C**TL**TDVLNQSKP**I**TLFLYGVVFLFGSIG NFLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLA SVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIF WWIFAVIIAIPHFMVVTKK**D**NQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIP LSVISYCYYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLF**L**DT LKLLKWISSSCE**S**E**K**SLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELH CLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMSFSRRSSPSRRETSSDTLSDEVCRVSQIIP	Мутантный штамм US28 (искусственно созданный). Обратите внимание, что пробел указывает на удаление мутантной последовательности (которой не присутствует в версии этой последовательности в перечне последовательностей). Подчеркнутые участки по порядку соответствуют N-концу (т.е. ECD1), ECD2, ECD3 и ECD4 соответственно. Аминокислоты, выделенные жирным подчеркиванием и жирным шрифтом, обозначают положения, которые были мутированы.
SEQ ID NO: 174	SISS(G/R)GRTYYPDSVKG	Консенсусная последовательность V_H-CDR2, вариант 2
SEQ ID NO: 175	GG(S/T)(T/R/H)(M/H/Y)(I/S)(T/Y) (T/G)(G/N)GF(A/D)(Y/F)	Консенсусная последовательность V_H-CDR3, вариант 2
SEQ ID NO: 176	QQW(T/*)SN(*/N)PPIT	Консенсусная последовательность V_L-CDR3, вариант 2
SEQ ID NO: 177	MTPTTTTTELTTEFEYDLGATPCTFTDVLNQSKPVTLFLYGVVFLFGSVG NFLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLA SVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIF	Слитый белок US28, содержащий последовательность US28 из штамма HCMV TB40/E

	WWIFAVIIAIPHFMVVTKKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIP LSVISYCYYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDT LKLLKWISSSCEFERSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELH CLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMSFSRRSSPSRRETSSDTLSDEVCRVSQIIP AAALEGSHHHHHH	
SEQ ID NO: 178	MTQTTTTELTTEFDYDLGAALCTLTDVLNQSKPITLFLYGVVFLFGSIGN FLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLAS VPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIFW WIFAVIIAIPHFMVVTKKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIPLS VISYCYYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFLDTLK LLKWISSSCESEKSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFVGTKFRQELHCL LAEFRQRLFSRDVSWYHSMSFSRRSSPSRRETSSDTLSDEVCRVSQIIPAA ALEGSHHHHHH	Слитый белок US28, содержащий последовательность US28 из мутантного штамма HCMV

Таблица 1. По данным поиска Blast, 90% штаммов HCMV имеют 4D-вариант ECD. Штаммы, показывающие 4N-вариант, перечислены ниже:

Номер доступа	**Название штамма**	**Источник**	**Variant US28 ECD3**	**Год**
MT044485.1	SYD-SCT1	Плазма	4N	2020
KF021605.1	TR	Глаз пациента с HIV	4N	2013
AF073835	N8	?	4N	2015
KP745645.1	BE/13/2010	Моча	4N	2015
KP745727.1	BE/17/2010	Моча	4N	2015
AF073834.1	L10	?	4N	2000
KY490076.1	HANRTR8	Кровь пациента с тр. пат. почек	4N	2017
AF073833.1	FS4	?	4N	2000
MH836520.1	P020	?	4N	2018
MH836506.1	P003	?	4N	2018
GU93774	Toledo	Моча младенца с врожд. деф.	4N	2003
KT959235	DB	Беременная женщина	4N	2009

Таблица 2. Сравнение специфичности поверхностного связывания потенциальных антител, связывающихся с US28

АНТИТЕЛО	Специфичность связывания
клон 13-5G6-1D3	15,2*
rAb 13-5G6-1D3	21,5*
клон 13-5C6-1B5	11*
клон 14-1H3-1A6	26*
VUN100	4**
коммерческое Ab к US28	1,70***

Соотношение основано на поверхностном связывании антитела с клетками *CHO-US28-A1 по сравнению с клетками CHO отрицательного контроля US28; **US28, экспрессирующий HEK-293, по сравнению с мембранами имитационного контроля HEK-293, как сообщает De Groof et al. 2019 (выше); *** Ad169 HCMV инфицировал клетки MRC-5 по сравнению с клетками имитационного контроля MRC-5. Значения > 1 означают более высокое связывание с US28-экспрессирующими клетками, чем с клетками отрицательного контроля.

Таблица 3. Структура белка US28, кодируемого штаммом DB HCMV (SEQ ID NO: 5 / номер доступа KT959235; мутации выделены жирным шрифтом), и мутации в белке US28, кодируемом различными штаммами HCMV:

MTP**T**TTT**A**EL**T**TEF**D**YD**EA**A**T**PC**VF**TDVLNQSKPVTLFLYGVVF**L**FGS**I**GNFLVIFTIT WRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLASVPCTLLTACFYVAM FASLCFITEIALDRYYAIVYMRYRPVKQACLFSIFWWIFAVIIAIPHFMVVTKK**N**NQCM TDYDYLEVSYPIILN**V**ELMLGAFVIPLSVISYCYYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVV LVFIIFWLPYHLTLF**V**DTLKLLKWISSSCEFE**R**SLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFV GTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMSFSRR**S**SPSRRETSSDTLSDE**V**CRVSQII P (SEQ ID No:5)

DB HCMV (KT959235) и	**мутации US28**
Toledo (GU937742)	Идентиный (генотип A1)
Towne (FJ616285)	A19D; N170D (генотип A2)
VR1814 (GU179289)	A19D; N170D; S330G (генотип A2)
TR (KF021605.1)	L45I; R267K (генотип A1)
TB40/E (KF297339)	A8T; D15E; E18L; A19G; V24T; N170D (генотип B1)
Merlin (AY446894)	A19D; N170D; S330G (генотип A2)
JP (GQ221975)	N170D (генотип A1)
AD169 (X17403.1)	A19D; N170D (генотип A2)
AF1 (GU179291.1)	N170D (генотип A1)
VHL/E (L20501.1)	E18D; A19E; F25L; N170D; R267K; V346A (генотип D)
Davis (JX512198.1)	A19D, N170D, V190I, R267K, V346A (генотип A1)
BL (MW980585)	A19D, T21A, F25L, N170D, V250L, R267K, V346A (генотип C)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Связывающая молекула, содержащая одну или несколько полипептидных цепей, при этом указанная связывающая молекула имеет специфичность связывания в отношении эпитопа во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV),

где ECD3 белка US28 содержит аминокислотную последовательность, представленную в белке US28 в положениях, соответствующих положениям 167-183 белка US28, кодируемого цитомегаловирусом человека (HCMV), как указано в SEQ ID NO: 5.

2. Связывающая молекула по п. 1, причем связывающая молекула выбрана из антитела и химерного антигенного рецептора (CAR).

3. Связывающая молекула по п. 1 или п. 2, причем связывающая молекула имеет специфичность связывания в отношении эпитопа, полностью присутствующего во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 HCMV.

4. Связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где связывающая молекула имеет специфичность связывания в отношении линейного эпитопа в ECD3 белка US28.

5. Связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, имеющая специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, который является агностическим в отношении штамма HCMV,

например, при этом связывающая молекула: (a) имеет специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, которая является агностической в отношении двух или более (например, всех) штаммов HCMV, (b) имеет специфичность связывания, которая является агностической в отношении 4D-вариантных штаммов и 4N-вариантных штаммов, и/или (c) имеет специфичность связывания, которая является агностической в отношении двух или более (например, всех) штаммов HCMV, выбранных из группы, состоящей из DB, Towne, AF1, VHL/E, AD169, BL, DAVIS, JP, Merlin, PH, TB40/E, Toledo, TR и VR1814 (FIX).

6. Связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где связывающая молекула имеет специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, независимо от того, содержит ли ECD3 белка US28 последовательность 4D-варианта или 4N-варианта:

- при этом 4D-вариант содержит последовательность TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7), обнаруженную в ECD3 US28, кодируемую первой группой штаммов HCMV, таких как Towne, VR1814, TB40/E, Merlin, JP, Ad169, AF1, VHL/E, BL и DAVIS; и
- при этом 4N-вариант содержит последовательность TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), обнаруженную в ECD3 US28, кодируемую второй группой штаммов HCMV, таких как штаммы Toledo, TR и DB.

7. Связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, содержащая одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей (CDR), соответствующих любой одной, двум, трем, четырем, пяти или всем шести последовательностям CDR антитела:

(a) 1D3, как определено SEQ ID NO: 8, 9, 10, 14, 15 и 16 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1D3;

(b) 1C10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83 и 118 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1C10;

(c) 1A10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83 и 118 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1A10;

(d) 1G9, как определено SEQ ID NO: 76, 77, 78, 82, 83 и 84 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1G9; и/или

(e) 1E8, как определено SEQ ID NO: 76, 95, 96, 82, 99 и 100 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1E8;

и

необязательно при этом связывающая молекула выбрана из антитела и CAR.

8. Связывающая молекула по п. 7, содержащая:

(a) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области тяжелой цепи (V_H) антитела:

(i) 1D3, как определено SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно;

(ii) 1C10, как определено SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно;

(iii) 1A10, как определено SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно;

(iv) 1G9, как определено SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно; и/или

(v) 1E8, как определено SEQ ID NO: 76, 95 и 96 соответственно;

и/или

(b) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области легкой цепи (V_L) антитела:

(i) 1D3, как определено SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно; (ii) 1C10, как определено SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно;

(iii) 1A10, как определено SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно;

(iv) 1G9, как определено SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно; и/или

(v) 1E8, как определено SEQ ID NO: 82, 99 и 100 соответственно.

9. Связывающая молекула по п. 7 или п. 8, содержащая:

(a) по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности:

(i) SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно, и

необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 12;

(ii) SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно, и

необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 104;

(iii) SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно, и

необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 122;

(iv) SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно, и

необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 68; и/или

(v) SEQ ID NO: 76, 95 и 96 соответственно, и

необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 88;

и/или

(b) по меньшей мере один полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности:

(i) SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно, и

необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 18;

(ii) SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно, и

необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 108;

(iii) SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно, и

необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 126;

(iv) SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно, и

необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 72; и/или

(v) SEQ ID NO: 82, 99 и 100 соответственно, и

необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 92.

10. Связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где связывающая молекула выбрана из группы, состоящей из:

(a) бивалентных антител, таких как антитела IgG-scFv (например, где первый связывающий домен представляет собой интактный IgG, а второй связывающий домен представляет собой scFv, прикрепленный к первому связывающему домену на N-конце легкой цепи и/или на C-конце легкой цепи, и/или на N-конце тяжелой цепи и/или на C-конце тяжелой цепи IgG, или наоборот);

(b) моновалентных антител, таких как *DuoBody*® или биспецифическое антитело типа «выступ во впадине» (например, scFv-KIH, scFv-KIH^r, BiTE-KIH или BiTE-KIH^r;

(c) антител $scFv_2$-Fc;

(d) биспецифических антител, таких как антитела на основе привлекающих Т-клетки биспецифических активаторов (BiTE);

(e) антител с двойным вариабельным доменом (DVD)-Ig;

(f) переориентирующихся антител с двойной аффинностью (DART) (например, $DART_2$-Fc или DART);

(g) триспецифических антител, таких как антитела DNL-Fab_3;

(h) антител scFv-HSA-scFv;

(i) однодоменных антител;

(j) IgG, содержащих только тяжелые цепи (hcIgG), таких как IgG верблюдовых (например, антитела VHH) и рецептор нового антигена иммуноглобулина акулы (IgNAR), и их одноцепочечных антител; и

(k) химерного антигенного рецептора (CAR), содержащего внеклеточный домен по п. 1 или любому другому зависимому от него пункту, например, внеклеточный домен, который содержит любой из вариантов (a)-(h) данного пункта или их комбинации.

11. Связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где связывающая молекула представляет собой:

(i) антитело на основе привлекающего иммунные клетки биспецифического активатора, например, привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BiTE), и необязательно при этом антитело BiTE содержит CD3-связывающий домен; или

(ii) моноклональное антитело, необязательно рекомбинантное моноклональное антитело, например, моноклональное антитело, продуцируемое рекомбинантно клетками CHO.

12. Функциональный фрагмент связывающей молекулы по любому из предыдущих пунктов, где функциональный фрагмент:

(a) содержит или состоит из антигенсвязывающего фрагмента связывающей молекулы, как определено в любом из предыдущих пунктов, или его варианта, слияния или производного, выбранного из группы, состоящей из: фрагмента Fv (такого как одноцепочечный фрагмент Fv (scFv) или фрагмент Fv с дисульфидной связью), Fab-подобного фрагмента (такого как Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент или фрагмент $F(ab)_2$) и однодоменных антител (dAb, включая одиночные и двойные форматы, такие как dAb-линкер-dAb и нанотела);

(b) обеспечивает связывающие характеристики по любому из пп.1-6;

(c) содержит последовательности CDR по любому из пп.7-9; и/или

(d) содержит последовательности V_H и/или V_L по п. 9.

13. Связывающая молекула по любому из пп. 1-11 или функциональный фрагмент указанной связывающей молекулы по п. 12, где связывающая молекула или ее функциональный фрагмент содержит слитую полипептидную последовательность,

при этом указанная последовательность слитого полипептида содержит первую аминокислотную последовательность, слитую со второй аминокислотной последовательностью, где

первая аминокислотная последовательность содержит или состоит из по меньшей мере одной из полипептидных цепей связывающей молекулы или ее функционального фрагмента, и

вторая аминокислотная последовательность является партнером по слиянию.

14. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:

(i) внеклеточный домен, где внеклеточный домен содержит или состоит из связывающей молекулы по любому из пп. 1-11 или п. 13, или функционального фрагмента указанной связывающей молекулы по любому из п. 12 или п. 13;

(ii) трансмембранный домен; и

(iii) внутриклеточный домен;

где внеклеточный домен CAR имеет специфичность связывания в отношении эпитопа внеклеточного домена 3 (ECD3) белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV), и

где ECD3 белка US28 содержит аминокислотную последовательность, представленную в белке US28 в положениях, соответствующих положениям 167-183

белка US28, кодируемого цитомегаловирусом человека (HCMV), как указано в SEQ ID NO: 5.

15. CAR по п. 14, где:

(a) внеклеточный домен CAR имеет специфичность связывания в отношении эпитопа, полностью присутствующего во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 HCMV;

(b) внеклеточный домен CAR имеет специфичность связывания в отношении линейного эпитопа в ECD3 белка US28;

(c) внеклеточный домен CAR имеет специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, который является агностическим в отношении штамма HCMV, например, специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, который является агностическим в отношении двух или более (например, всех) штаммов HCMV, выбранных из группы, состоящей из DB, Towne, AD169, BL, DAVIS, JP, Merlin, PH, TB40/E, Toledo, TR, VHL/E и VR1814 (FIX); и/или

(d) внеклеточный домен CAR имеет специфичность в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, независимо от того, содержит ли ECD3 белка US28 последовательность:

- TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7), обнаруженную в ECD3 US28, кодируемую большинством штаммов HCMV, или
- TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), обнаруженную в ECD3 US28, кодируемую меньшинством штаммов HCMV.

16. CAR по п. 14 или п. 15, где:

(a) внеклеточный домен CAR содержит одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей (CDR), соответствующих любой одной, двум, трем, четырем, пяти или всем шести последовательностям CDR антитела:

(i) 1D3, как определено SEQ ID NO: 8, 9, 10, 14, 15 и 16 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1D3;

(ii) 1C10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83 и 118 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1C10;

(iii) 1A10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83 и 118 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1A10;

(iv) 1G9, как определено SEQ ID NO: 76, 77, 78, 82, 83 и 84 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1G9; и/или

(v) 1E8, как определено SEQ ID NO: 76, 95, 96, 82, 99 и 100 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1E8;

(b) внеклеточный домен CAR содержит:

одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области тяжелой цепи (V_H) антитела:

(i) 1D3, как определено SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно;

(ii) 1C10, как определено SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно;

(iii) 1A10, как определено SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно;

(iv) 1G9, как определено SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно; и/или

(v) 1E8, как определено SEQ ID NO: 76, 95 и 96 соответственно; и/или

одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области легкой цепи (V_L) антитела:

(vii) 1D3, как определено SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно;

(viii) 1C10, как определено SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно;

(ix) 1A10, как определено SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно;

(x) 1G9, как определено SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно; и/или

(xi) 1E8, как определено SEQ ID NO: 82, 99 и 100 соответственно; и/или

(c) внеклеточный домен CAR содержит:

по меньшей мере одну полипептидную последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H), которая содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности:

(i) SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно, и необязательно при этом по меньшей мере одна полипептидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 12;

(ii) SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно, и

необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 104;

(iii) SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно, и

необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 122;

(iv) SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно, и

необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 68; и/или

(v) SEQ ID NO: 76, 95 и 96 соответственно, и

необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 88; и/или

по меньшей мере одну полипептидную последовательность вариабельной области легкой цепи (V_L), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности:

(vii) SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно, и необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 18;

(viii) SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно, и

необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 108;

(ix) SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно, и

необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 126;

(x) SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно, и

необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 72; и/или

(xi) SEQ ID NO: 82, 99 и 100 соответственно, и

необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 92.

17. CAR по любому из пп. 14-16, где внеклеточный домен представляет собой антитело, например, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

18. CAR по любому из пп. 14-17, где трансмембранный домен содержит трансмембранный домен белка, например, трансмембранный домен белка трансмембранного рецептора, и

необязательно при этом трансмембранный домен содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD8, CD45 и CD4.

19. CAR по любому из пп. 14-18, где внеклеточный домен соединен с трансмембранным доменом шарнирной областью.

20. CAR по любому из пп. 14-19, где внутриклеточный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен, например, при этом:

(a) внутриклеточный сигнальный домен содержит один или несколько мотивов активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM); и/или

(b) внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета, Fc-гамма-рецептора, Fc-бета-рецептора, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

21. CAR по п. 20, где внутриклеточный домен содержит один или несколько костимулирующих доменов, например:

(a) где один или несколько костимулирующих доменов содержат один или несколько функциональных сигнальных доменов, полученных из белка, выбранного из группы, состоящей из CD28, 41BB, OX40, ICOS, CD27 и DAP10;

(b) где внутриклеточный домен содержит костимулирующий домен, проксимальный в отношении внутриклеточного сигнального домена,

(c) где внутриклеточный домен содержит два или более костимулирующих домена, например, два последовательных костимулирующих домена, и/или

(d) где внутриклеточный домен содержит отдельные цитокиновые сигналы.

22. CAR по любому из пп. 14-21, где CAR дополнительно содержит лидерную последовательность.

23. Молекула нуклеиновой кислоты или комбинация нескольких отдельных молекул нуклеиновой кислоты,

где молекула нуклеиновой кислоты содержит или комбинация множества отдельных молекул нуклеиновой кислоты вместе содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, которые отдельно или в комбинации кодируют связывающую молекулу по любому из пп. 1-13 или CAR по любому из пп. 14-22.

24. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 23.

25. Вектор по п. 24, где вектор выбран из группы, состоящей из ретровирусного вектора, плазмиды, лентивирусного вектора и аденовирусного вектора.

26. Клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 23, или вектор по п. 24 или п. 25,

необязательно при этом клетка экспрессирует одну или несколько связывающих молекул по любому из пп. 1-13 и/или один или несколько CAR по любому из пп. 14-22, при этом указанная одна или несколько связывающих молекул и/или CAR кодируются молекулой нуклеиновой кислоты или комбинацией множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 23, или вектором по п. 24 или п. 25.

27. Клетка по п. 26, где клетка содержит:

(a) молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 23, где кодируемая связывающая молекула представляет собой антитело по любому из пп. 1-11, функциональный фрагмент указанного антитела по п. 12 или антитело его функционального фрагмента, который содержит последовательность слитого полипептида по п. 13; и/или

(b) вектор по п. 25 или п. 26, где указанный вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты, как определено частью (a) этого пункта.

28. Клетка по п. 26, где клетка содержит:

(a) молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 23, где кодируемая связывающая молекула представляет собой CAR по любому из пп. 14-22; и/или

(b) вектор по п. 25 или п. 26, где указанный вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты, как определено частью (a) этого пункта.

29. Клетка, содержащая связывающую молекулу по любому из пп. 1-13 и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанную связывающую молекулу, необязательно при этом нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту или вектор по любому из пп. 23-25.

30. Клетка по п. 29, где

связывающая молекула представляет собой антитело по любому из пп. 1-11, функциональный фрагмент указанного антитела по п. 12 или антитело его функционального фрагмента, который содержит слитую полипептидную последовательность по п. 13, и

необязательно при этом антитело представляет собой моноклональное антитело, и дополнительно, например, где клетка представляет собой клетку CHO, которая рекомбинантно экспрессирует моноклональное антитело.

31. Клетка, содержащая CAR по любому из пп. 14-22 и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный CAR, необязательно при этом нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту или вектор по любому из пп. 23-25.

32. Клетка по пп. 26, 28, 29 или п. 31 или способ по п. 32, где клетка представляет собой Т-клетку, естественную клетку-киллер (NK) или макрофаг.

33. Клетка по п. 31 или п. 32, где клетка представляет собой CAR-T-клетку, CAR-NK-клетку или CAR-макрофаг, и

необязательно, когда клетка представляет собой CAR-T-клетку, то T-клетка выбрана из группы, состоящей из $CD8^+$ T-клеток, CD4+ T-клеток, эффекторных T-клеток, T-клеток-хелперов, T-клеток памяти, цитотоксических T-лимфоцитов (CTL), EBV-специфического T-клеточного рецептора (TCR) или подтипов γδ-T-клеток.

34. Способ получения клетки, включающий введение в клетку молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 23 и/или вектора по п. 24 или п. 25.

35. Способ получения связывающей молекулы по любому из пп. 1-13 или CAR по любому из пп. 14-22, при этом способ включает:

экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 23 и/или вектора по п. 24 или п. 25 в клетке.

36. Способ по п. 35, включающий стадию выделения полученной таким образом связывающей молекулы из клетки; и

необязательно при этом связывающая молекула представляет собой антитело по любому из пп. 1-11, функциональный фрагмент указанного антитела по п. 12 или антитело его функционального фрагмента, который содержит слитую полипептидную последовательность по п. 13.

37. Выделенная связывающая молекула, которую получают или которую можно получить с помощью способа по п. 36,

необязательно при этом выделенную связывающую молекулу дополнительно готовят для введения субъекту.

38. Конъюгат, при этом конъюгат содержит фрагмент, конъюгированный со связывающей молекулой по любому из пп. 1-11 или п. 13, или с функциональным фрагментом указанной связывающей молекулы по п. 12 или п. 13.

39. Конъюгат по п. 38, где указанный фрагмент представляет собой терапевтический, профилактический, диагностический, прогностический или терагностический фрагмент.

40. Конъюгат по п. 38 или п. 39, где указанный фрагмент представляет собой лекарственное средство (например, при этом конъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство («ADC»)) и/или радиоактивный фрагмент (например, при этом конъюгат применим для применения в радиоиммунотерапии («RIT»)).

41. Способ получения конъюгата по любому из пп. 38-40, при этом способ включает стадии:

(a) получение связывающей молекулы по любому из пп. 1-11 или п. 13, или функционального фрагмента указанной связывающей молекулы по любому из п. 12 или п. 13; и

(b) конъюгирование фрагмента со связывающей молекулой по любому из пп. 1-11 или п. 13, или с функциональным фрагментом указанной связывающей молекулы по любому из п. 12 или п. 13.

42. Способ по п. 41, включающий стадию выделения полученного таким образом конъюгата.

43. Конъюгат по любому из пп. 38-40 или способ по п. 41 или п. 42, где связывающая молекула представляет собой антитело по любому из пп. 1-11, функциональный фрагмент указанного антитела по п. 12 или антитело его функционального фрагмента, который содержит слитую полипептидную последовательность по п. 13.

44. Выделенный конъюгат, который получают или который можно получить с помощью способа по п. 42 или п. 43,

необязательно при этом выделенный конъюгат дополнительно готовят для введения субъекту.

45. Способ борьбы с HCMV или заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, при этом способ включает введение субъекту, или *ex vivo*

или *in vitro* в клеточный материал любого одного или нескольких средств, выбранных из группы, состоящей из:

i. связывающей молекулы по любому из пп. 1-11 или п. 13,

ii. функционального фрагмента указанной связывающей молекулы по п. 12 или п. 13,

iii. выделенной связывающей молекулы по п. 37,

iv. молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 23,

v. вектора по п. 24 или п. 25,

vi. клетки по любому из пп. 26-33,

vii. конъюгата по любому из пп. 38-40, и

viii. выделенного конъюгата по п. 44.

46. Одно или несколько средств для применения в борьбе с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, у субъекта или клеточного материала *ex vivo* или *in vitro*, где указанные или каждое одно или несколько средств в отдельности выбраны из группы, состоящей из:

i. связывающей молекулы по любому из пп. 1-11 или п. 13,

ii. функционального фрагмента указанной связывающей молекулы по п. 12 или п. 13,

iii. выделенной связывающей молекулы по п. 37,

iv. молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 23,

v. вектора по п. 24 или п. 25,

vi. клетки по любому из пп. 26-33,

vii. конъюгата по любому из пп. 38-40, и

viii. выделенного конъюгата по п. 44.

47. Применение одного или нескольких средств в производстве лекарственного препарата для применения в борьбе с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, у субъекта или клеточного материала *ex vivo* или *in vitro*, где указанные или каждое одно или несколько средств в отдельности выбраны из группы, состоящей из:

i. связывающей молекулы по любому из пп. 1-11 или п. 13,

ii. функционального фрагмента указанной связывающей молекулы по п. 12 или п. 13,

iii. выделенной связывающей молекулы по п. 37,

iv. молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 23,

v. вектора по п. 24 или п. 25,

vi. клетки по любому из пп. 26-33,

vii. конъюгата по любому из пп. 38-40, и

viii. выделенного конъюгата по п. 44.

48. Способ по п. 45, одно или несколько средств для применения по п. 46 или применение по п. 47, где:

i. заболевание или состояние представляет собой инфекцию HCMV или ассоциировано с инфекцией HCMV, и необязательно инфекция HCMV включает инфекцию, состоящую из нескольких штаммов HCMV, при этом мультиштаммовая инфекция HCMV включает инфекцию более чем одним различным штаммом HCMV, например, одним или несколькими штаммами HCMV, которые кодируют 4N-вариант ECD3 US28, и один или несколько штаммов HCMV, которые кодируют 4D-вариант ECD3 US28;

ii. заболевание или состояние представляет собой латентную инфекцию HCMV (необязательно мультиштаммовую латентную инфекцию HCMV) или ассоциировано с латентной инфекцией HCMV (необязательно мультиштаммовой латентной инфекцией HCMV);

iii. заболевание или состояние представляет собой литическую инфекцию HCMV (необязательно мультиштаммовую литическую инфекцию HCMV) или ассоциировано с литической инфекцией HCMV (необязательно мультиштаммовой литической инфекцией HCMV);

iv. заболевание или состояние представляет собой врожденную одноштаммовую или мультиштаммовую инфекцию HCMV, такую как латентная врожденная одноштаммовая или мультиштаммовая инфекция HCMV или литическая врожденная одноштаммовая или мультиштаммовая инфекция HCMV;

v. заболевание или состояние представляет собой рак;

vi. заболевание или состояние представляет собой инфицированный HCMV рак (необязательно мультиштаммовый инфицированный HCMV рак), такой как

латентный инфицированный HCMV рак (необязательно мультиштаммовый латентный инфицированный HCMV рак);

vii. заболевание или состояние представляет собой эпителиальный рак; необязательно при этом эпителиальный рак представляет собой рак молочной железы; например, при этом рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы (TNBC) или HER2-положительный рак молочной железы (такой как трижды положительный рак молочной железы «TPBC»);

viii. заболевание представляет собой метастазирующую и/или агрессивную форму рака, такую как метастазирующая и/или агрессивная форма инфицированного HCMV рака (например, рака, имеющего латентную инфекцию HCMV и/или мультиштаммовую инфекцию HCMV);

ix. заболевание или состояние не является глиобластомой;

x. у субъекта, нуждающегося в этом, были диагностированы инфицированные HCMV раковые клетки, такие как латентные инфицированные HCMV раковые клетки или раковые клетки с продуктивной инфекцией HCMV (включая без ограничения опухолеассоциированные макрофаги с продуктивной инфекцией HCMV); и/или

xi. субъект, нуждающийся в этом, является или предполагается быть получателем донорского органа или донором органов.

49. Способ по п. 45 или п. 48, одно или несколько средств для применения по п. 46 или п. 48 или применение по п. 47 или п. 48,

где средство выбрано из группы, состоящей из:

i. терапевтического антитела по любому из пп. 1-11,

ii. функционального фрагмента указанного терапевтического антитела по п. 12,

iii. терапевтического антитела, которое содержит слитую полипептидную последовательность по п. 13; и

iv. функционального фрагмента указанного терапевтического антитела, который содержит слитую полипептидную последовательность по п. 13.

50. Способ по п. 45 или п. 48, одно или несколько средств для применения по п. 46 или п. 48 или применение по п. 47 или п. 48,

где средство представляет собой биспецифическое антитело, например, антитело на основе привлекающего иммунные клетки биспецифического активатора, такое как антитело на основе привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BiTE), необязательно при этом антитело BiTE содержит CD3-связывающий домен.

51. Способ по п. 45 или п. 48, одно или несколько средств для применения по п. 46 или п. 48 или применение по п. 47 или п. 48,

где средство представляет собой конъюгат по любому из пп. 38-40, такой как конъюгат, который представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство («ADC»), или конъюгат, который содержит радиоактивный фрагмент, такой как конъюгат, который является подходящим для применения в радиоиммунотерапии («RIT»).

52. Способ по п. 45 или п. 48, одно или несколько средств для применения по п. 46 или п. 48 или применение по п. 47 или п. 48,

где средство представляет собой клетку, содержащую CAR по любому из пп. 31-33, например, CAR-T-клетку, CAR-NK-клетку или CAR-макрофаг.

53. Способ по п. 45 или любому из пп. 48-52, одно или несколько средств для применения по п. 46 или любому из пп. 48-52, или применение по любому из пп. 47-52,

где субъект представляет собой субъекта, которому вводят дополнительное вещество, такое как дополнительное терапевтическое, профилактическое, диагностическое, прогностическое или терагностическое вещество, и

необязательно при этом дополнительное вещество вводят отдельно, последовательно или одновременно с указанными или каждым одним или несколькими средствами.

54. Средство для применения в медицине, где средство выбрано из группы, состоящей:

i. связывающей молекулы по любому из пп. 1-11 или п. 13,

ii. функционального фрагмента указанной связывающей молекулы по п. 12 или п. 13,

iii. выделенной связывающей молекулы по п. 37,

iv. молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 23,

v. вектора по п. 24 или п. 25,

vi. клетки по любому из пп. 26-33,

vii. конъюгата по любому из пп. 38-40, и

viii. выделенного конъюгата по п. 44.

55. Вакцинная композиция, подходящая для применения в вакцинации, снижении риска, предупреждении или борьбе с заболеванием или состоянием, ассоциированным с цитомегаловирусом человека (HCMV),

где вакцина может представлять собой активную или пассивную вакцину,

где вакцина запускает и/или обеспечивает иммунный ответ, направленный на эпитоп, присутствующий в ECD3 белка US28 HCMV, и

где ECD3 белка US28 содержит аминокислотную последовательность, представленную в белке US28 в положениях, соответствующих положениям 167-183 белка US28, кодируемого HCMV, как указано в SEQ ID NO:5.

56. Вакцинная композиция по п. 55, где вакцина запускает и/или обеспечивает иммунный ответ:

(a) в отношении одного или нескольких эпитопов, полностью присутствующих во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 HCMV;

(b) в отношении одного или нескольких линейных эпитопов в ECD3 белка US28;

(c) в отношении одного или нескольких эпитопов в ECD3 белка US28 HCMV, который представляет собой эпитоп или эпитопы, присутствующие в идентичной форме как в 4D-вариантных штаммах, так и в 4N-вариантных штаммах HCMV, при этом 4D-вариантный штамм HCMV кодирует белок US28, содержащий ECD3, имеющий последовательность TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7), и при этом 4N-вариантный штамм HCMV кодирует белок US28, содержащий ECD3, имеющий последовательность TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6); и/или

(d) при этом иммунный ответ, который запускается или обеспечивается вакциной, является агностическим в отношении штамма HCMV по отношению к 4D-вариантным штаммам и 4N-вариантным штаммам HCMV, и запускает и/или обеспечивает иммунный ответ, направленный на один или несколько из 4D-вариантных штаммов HCMV,

выбранных из Towne, VR1814, TB40/E, Merlin, JP, Ad169, VHL/E, AF1, BL и DAVIS, а также направленный на один или несколько 4N-вариантных штаммов HCMV, выбранных из Toledo, TR и DB.

57. Вакцинная композиция по п. 55 или п. 56, где:

(i) вакцина представляет собой пассивную вакцину и/или необязательно содержит:

(a) одну или несколько связывающих молекул по любому из пп. 1-11 или п. 13,

(b) один или несколько функциональных фрагментов указанной одной или нескольких связывающих молекул по п. 12 или п. 13,

(c) одну или несколько выделенных связывающих молекул по п. 37,

(d) одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 23,

(e) один или несколько векторов по п. 24 или п. 25,

(f) одну или несколько клеток по любому из пп. 26-33,

(g) один или несколько конъюгатов по любому из пп. 38-40, и/или

(h) один или несколько выделенных конъюгатов по п. 44; и/или

(ii) вакцина представляет собой активную вакцину и/или необязательно содержит:

(a) один или несколько пептидов или полипептидов по любому из пп. 84-88, комбинацию по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов по п. 89, слитый белок по п. 90, комбинацию по меньшей мере двух различных слитых белков по п.91, конъюгат по любому из пп.92-94 и/или комбинацию по меньшей мере двух различных конъюгатов по п.95; и/или

(b) одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 101 или п. 102, или вектор по п. 103 или п. 104; и/или

(c) дендритную клетку или ее гомогенную или гетерогенную популяцию, где указанная или каждая дендритная клетка нагружена одним или более из следующих веществ: пептидом или полипептидом по любому из пп. 84-88, комбинацией по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов по п. 89, слитым

белком по п. 90, комбинацией по меньшей мере двух различных слитых белков по п. 91, конъюгатом по любому из пп. 92-94, комбинацией по меньшей мере двух отдельных конъюгатов по п. 95, молекулой нуклеиновой кислоты или комбинацией множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 101 или п. 102 и/или одним или несколькими векторами по п. 103 или п. 104.

58. Способ вакцинации, снижения риска, предупреждения и/или борьбы с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, при этом способ включает введение субъекту вакцины по пп. 55-57,

необязательно при этом заболевание или состояние представляет собой латентную инфекцию HCMV или представляет собой заболевание или состояние, ассоциированное с латентной инфекцией HCMV.

59. Вакцина по любому из пп. 55-57 для применения в вакцинации, снижении риска, предупреждении и/или борьбе с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, у субъекта,

необязательно при этом заболевание или состояние представляет собой латентную инфекцию HCMV или представляет собой заболевание или состояние, ассоциированное с латентной инфекцией HCMV.

60. Применение вакцины по любому из пп. 55-57 в производстве лекарственного препарата для вакцинации, снижения риска, предупреждения и/или борьбы с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, у субъекта,

необязательно при этом заболевание или состояние представляет собой латентную инфекцию HCMV или представляет собой заболевание или состояние, ассоциированное с латентной инфекцией HCMV.

61. Вакцинная композиция по любому из пп. 55-57, способ по п. 58, вакцинная композиция для применения по п. 59 или применение по п. 60, где:

i. заболевание или состояние представляет собой инфекцию HCMV или ассоциировано с инфекцией HCMV, и необязательно инфекция HCMV включает инфекцию, состоящую из нескольких штаммов HCMV, при этом мультиштаммовая инфекция HCMV включает инфекцию более чем одним различным штаммом HCMV,

например, одним или несколькими штаммами HCMV, которые кодируют 4N-вариант ECD3 US28, и один или несколько штаммов HCMV, которые кодируют 4D-вариант ECD3 US28;

ii. заболевание или состояние представляет собой латентную инфекцию HCMV (необязательно мультиштаммовую латентную инфекцию HCMV) или ассоциировано с латентной инфекцией HCMV (необязательно мультиштаммовой латентной инфекцией HCMV);

iii. заболевание или состояние представляет собой литическую инфекцию HCMV (необязательно мультиштаммовую литическую инфекцию HCMV) или ассоциировано с литической инфекцией HCMV (необязательно мультиштаммовой литической инфекцией HCMV);

iv. заболевание или состояние представляет собой врожденную одноштаммовую или мультиштаммовую инфекцию HCMV, такую как латентная врожденная одноштаммовая или мультиштаммовая инфекция HCMV или литическая врожденная одноштаммовая или мультиштаммовая инфекция HCMV;

v. заболевание или состояние представляет собой рак;

vi. заболевание или состояние представляет собой инфицированный HCMV рак (необязательно мультиштаммовый инфицированный HCMV рак), такой как латентный инфицированный HCMV рак (необязательно мультиштаммовый латентный инфицированный HCMV рак);

vii. заболевание или состояние представляет собой эпителиальный рак; необязательно при этом эпителиальный рак представляет собой рак молочной железы; например, при этом рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы (TNBC) или HER2-положительный рак молочной железы (такой как трижды положительный рак молочной железы «TPBC»);

viii. заболевание или состояние представляет собой метастазирующую и/или агрессивную форму рака, такую как метастазирующая и/или агрессивная форма инфицированного HCMV рака (например, рака, имеющего латентную инфекцию HCMV и/или мультиштаммовую инфекцию HCMV);

ix. заболевание или состояние не является глиобластомой;

x. у субъекта, нуждающегося в этом, были диагностированы инфицированные HCMV раковые клетки, такие как латентные инфицированные HCMV раковые клетки или раковые клетки с продуктивной инфекцией HCMV (включая без

ограничения опухолеассоциированные макрофаги с продуктивной инфекцией HCMV); и/или

xi. субъект, нуждающийся в этом, является или предполагается быть получателем донорского органа или донором органов.

62. Способ оценки одного или нескольких биологических состояний и/или биологических характеристик субъекта и/или биологического материала *ex vivo*, при этом способ включает:

(a) приведение субъекта и/или биологического материала в контакт *ex vivo* со связывающей молекулой по любому из пп. 1-13 или конъюгатом по любому из пп. 38-40, 43 или п. 44; и

(b) проведение оценки субъекта и/или биологического материала *ex vivo* на основе прямого и/или опосредованного измерения связывания связывающей молекулы или конъюгата с субъектом и/или биологическим материалом *ex vivo*.

63. Способ по п. 62, где способ включает метод ELISA и необязательно способ осуществляют в отношении биологического материала *ex vivo*, такого как одна или несколько жидкостей.

64. Способ по п. 62, где способ включает метод проточной цитометрии и необязательно способ представляет собой способ оценки образца крови *ex vivo* и/или образца костного мозга *ex vivo* от субъекта.

65. Способ по п. 62, где способ включает применение конъюгата по любому из пп. 38-40, 43 или п. 44,

где конъюгат содержит обнаружимый фрагмент, такой как радиоактивный фрагмент, и способ включает обнаружение радиоактивного фрагмента у субъекта и/или биологического материала *ex vivo*,

например, где способ представляет собой метод иммунопозитронно-эмиссионной (PET) визуализации.

66. Способ по п. 62, где способ представляет собой метод иммуногистохимии, выполняемый в отношении образца биологического материала *ex vivo*.

67. Способ по любому из пп. 62-66, где способ осуществляют в отношении субъекта или биологического материала *ex vivo*, полученного от субъекта, с целью проведения диагностической или прогностической оценки заболевания или состояния, ассоциированного с HCMV, у субъекта.

68. Способ по п. 67, где:

i. заболевание или состояние представляет собой инфекцию HCMV или ассоциировано с инфекцией HCMV, и необязательно инфекция HCMV включает инфекцию, состоящую из нескольких штаммов HCMV, при этом мультиштаммовая инфекция HCMV включает инфекцию более чем одним различным штаммом HCMV, например, одним или несколькими штаммами HCMV, которые кодируют 4N-вариант ECD3 US28, и один или несколько штаммов HCMV, которые кодируют 4D-вариант ECD3 US28;

ii. заболевание или состояние представляет собой латентную инфекцию HCMV (необязательно мультиштаммовую латентную инфекцию HCMV) или ассоциировано с латентной инфекцией HCMV (необязательно мультиштаммовой латентной инфекцией HCMV);

iii. заболевание или состояние представляет собой литическую инфекцию HCMV (необязательно мультиштаммовую литическую инфекцию HCMV) или ассоциировано с литической инфекцией HCMV (необязательно мультиштаммовой литической инфекцией HCMV);

iv. заболевание или состояние представляет собой врожденную одноштаммовую или мультиштаммовую инфекцию HCMV, такую как латентная врожденная одноштаммовая или мультиштаммовая инфекция HCMV или литическая врожденная одноштаммовая или мультиштаммовая инфекция HCMV;

v. заболевание или состояние представляет собой рак;

vi. заболевание или состояние представляет собой инфицированный HCMV рак (необязательно мультиштаммовый инфицированный HCMV рак), такой как латентный инфицированный HCMV рак (необязательно мультиштаммовый латентный инфицированный HCMV рак);

vii. заболевание или состояние представляет собой эпителиальный рак; необязательно при этом эпителиальный рак представляет собой рак молочной железы; например, при этом рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак

молочной железы (TNBC) или HER2-положительный рак молочной железы (такой как трижды положительный рак молочной железы «TPBC»);

viii. заболевание или состояние представляет собой метастазирующую и/или агрессивную форму рака, такую как метастазирующая и/или агрессивная форма инфицированного HCMV рака (например, рака, имеющего латентную инфекцию HCMV и/или мультиштаммовую инфекцию HCMV);

ix. заболевание или состояние не является глиобластомой; и/или

x. у субъекта, нуждающегося в этом, были диагностированы инфицированные HCMV раковые клетки, такие как латентные инфицированные HCMV раковые клетки или раковые клетки с продуктивной инфекцией HCMV (включая без ограничения опухолеассоциированные макрофаги с продуктивной инфекцией HCMV), и/или инфицированные мультиштаммовой инфекций HCMV раковые клетки;

xi. субъект является или предполагается быть получателем донорского органа или донором органов.

69. Способ борьбы с инфекцией HCMV (такой как латентная инфекция HCMV, и/или литическая инфекция HCMV, и/или мультиштаммовая инфекция HCMV) в живом биологическом материале *ex vivo*, при этом способ включает приведение живого биологического материала *ex vivo* в контакт с любым одним или несколькими средствами, выбранными из группы, состоящей из:

i. связывающей молекулы по любому из пп. 1-11 или п. 13,

ii. функционального фрагмента указанной связывающей молекулы по п. 12 или п. 13,

iii. выделенной связывающей молекулы по п. 37,

iv. молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 23,

v. вектора по п. 24 или п. 25,

vi. клетки по любому из пп. 26-33,

vii. конъюгата по любому из пп. 38-40, и

viii. выделенного конъюгата по п. 44.

70. Живой биологический материал *ex vivo*, который получают или можно получить с помощью способа по п. 69.

71. Способ по п. 69 или живой биологический материал *ex vivo* по п. 70, где живой биологический материал *ex vivo* содержит, состоит по сути из или состоит из живого биологического материала *ex vivo*, выбранного из группы, которая включает: один или несколько типов клеток *ex vivo*; один или несколько типов клеточных культур *ex vivo*; один или несколько типов тканей *ex vivo*; один или несколько типов культур тканей *ex vivo*; один или несколько типов органоидов *ex vivo*; один или несколько типов органоидных культур *ex vivo*; один или несколько типов органов *ex vivo*; и/или один или несколько типов культур органов *ex vivo*.

72. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту живого биологического материала *ex vivo* по п. 60 или п. 61.

73. Способ по п. 72, где способ представляет собой способ трансплантации живого биологического материала *ex vivo*, такого как трансплантат органа или ткани.

74. Способ скрининга связывающей молекулы, имеющей специфичность связывания в отношении эпитопа во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV),

где ECD3 белка US28 содержит аминокислотную последовательность, представленную в белке US28 в положениях, соответствующих положениям 167-183 белка US28, кодируемого HCMV, как указано в SEQ ID NO:5,

при этом способ включает:

(a) получение одного или нескольких пептидов, соответствующих аминокислотной последовательности, присутствующей в ECD3 белка US28, необязательно при этом один или несколько пептидов представлены в форме одного или нескольких пептидов или полипептидов по любому из пп. 84-88, комбинации по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов по п. 89, одного или нескольких слитых белков по п. 90, комбинации по меньшей мере двух различных слитых белков по п. 91, конъюгата по любому из пп. 92-94 или комбинации по меньшей мере двух различных конъюгатов по п. 95;

(b) получение одной или нескольких связывающих молекул-кандидатов;

(c) определение специфичности связывания и/или аффинности связывания одной или нескольких связывающих молекул-кандидатов с одним или несколькими пептидами.

75. Способ по п. 74, где указанный или каждый из одного или нескольких пептидов содержат, состоят по сути или состоят из полипептидной последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7) и/или TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), и/или иммуногенного фрагмента любого из них или обоих;

необязательно при этом один или несколько пептидов представлены в форме одного или нескольких пептидов или полипептидов по любому из пп. 84-88, комбинации по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов по п. 89, одного или нескольких слитых белков по п. 90, комбинации по меньшей мере двух различных слитых белков по п. 91, конъюгата по любому из пп. 92-94 или комбинации по меньшей мере двух различных конъюгатов по п. 95.

76. Способ по п. 74 или п. 75, где одна или несколько связывающих молекул-кандидатов представляют собой антитела и/или CAR, такие как любое одно или несколько из:

(a) бивалентных антител, таких как антитела IgG-scFv (например, где первый связывающий домен представляет собой интактный IgG, а второй связывающий домен представляет собой scFv, прикрепленный к первому связывающему домену на N-конце легкой цепи и/или на C-конце легкой цепи, и/или на N-конце тяжелой цепи и/или на C-конце тяжелой цепи IgG, или наоборот);

(b) моновалентных антител, таких как *DuoBody*® или биспецифическое антитело типа «выступ во впадине» (например, scFv-KIH, scFv-KIH^r, BiTE-KIH или BiTE-KIH^r;

(c) антител $scFv_2$-Fc;

(d) биспецифических антител, таких как антитела на основе привлекающих T-клетки биспецифических активаторов (BiTE);

(e) антител с двойным вариабельным доменом (DVD)-Ig;

(f) переориентирующихся антител с двойной аффинностью (DART) (например, $DART_2$-Fc или DART);

(g) триспецифических антител, таких как антитела DNL-Fab_3;

(h) антител scFv-HSA-scFv; и

(i) химерного антигенного рецептора (CAR).

77. Способ по любому из пп. 74-76, дополнительно включающий стадию отбора связывающей молекулы-кандидата на основе специфичности связывания и/или аффинности связывания в отношении одного или нескольких пептидов.

78. Способ по п. 77, где выбранная связывающая молекула-кандидат:

(a) имеет специфичность связывания в отношении эпитопа, полностью присутствующего во внеклеточном домене 3 (ECD3) белка US28 HCMV;

(b) имеет специфичность связывания в отношении линейного эпитопа в ECD3 белка US28;

(c) имеет специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, который является агностическим в отношении штамма HCMV, например, специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, который является агностическим в отношении двух или более (например, всех) штаммов HCMV, выбранных из группы, состоящей из DB, Towne, AD169, DAVIS, BL, JP, Merlin, PH, TB40/E, Toledo, VHL/E, TR и VR1814 (FIX); и/или

(d) имеет специфичность в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, независимо от того, содержит ли ECD3 белка US28 CAR последовательность TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7) или TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6).

79. Способ по п. 77 или п. 78, где выбранная связывающая молекула-кандидат имеет специфичность связывания и/или аффинность связывания в отношении одного или нескольких пептидов, которая эквивалентна специфичности связывания и/или аффинности связывания в отношении того же одного или нескольких пептидов, как продемонстрировано. антителом, которое содержит полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H), который состоит из последовательности SEQ ID NO:12, и полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L), который состоит из последовательности SEQ ID NO:18.

80. Способ получения композиции, содержащей множество копий связывающей молекулы, при этом указанный способ включает воспроизведение выбранной связывающей молекулы-кандидата, которая была выбрана в соответствии со способом по любому из пп. 77, 78 или п. 79.

81. Способ оценки выбранной связывающей молекулы-кандидата, которая была выбрана в соответствии со способом по любому из пп. 77, 78 или п. 79, при этом указанный способ включает и идентифицирует структуру(ы) внутри выбранной связывающей молекулы-кандидата, которая обеспечивает ее связывающие характеристики,

например, идентифицирует указанную или каждую последовательность CDR в выбранной связывающей молекуле-кандидате, которая представляет собой антитело или CAR.

82. Способ получения композиции, содержащей множество копий связывающей молекулы, где указанная связывающая молекула содержит указанную или каждую структуру(ы), которые были идентифицированы внутри выбранной связывающей молекулы-кандидата как обеспечивающие ее связывающие характеристики, в соответствии со способом по п. 81,

при этом указанный способ включает воспроизведение связывающей молекулы.

83. Композиция связывающей молекулы, полученная с помощью способа по п. 80 или п. 82.

84. Пептид или полипептид, содержащий, состоящий по сути из или состоящий из последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), или содержащий последовательность иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 6, где указанный пептид или полипептид не является белком US28, и предпочтительно при этом единственной последовательностью, полученной из US28, в указанном пептиде или полипептиде является последовательность SEQ ID NO: 6 или последовательность иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 6.

85. Пептид или полипептид, содержащий, состоящий по сути или состоящий из последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7), или содержащий последовательность иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 7, где указанный пептид или полипептид не является белком US28, и предпочтительно при этом единственной последовательностью, полученной из US28, в указанном пептиде или полипептиде является последовательность SEQ ID NO: 7 или последовательность иммуногенного фрагмента SEQ ID NO: 7.

86. Пептид или полипептид по п. 84 или п. 85, где иммуногенный фрагмент эталонной последовательности SEQ ID NO: 6 или 7 содержит менее чем полную последовательность эталонной последовательности и содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 последовательных аминокислот эталонной последовательности.

87. Пептид или полипептид по пп. 84, 85 или п. 86, где иммуногенный фрагмент содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности, которая является общей и присутствует в обеих SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO:7.

88. Пептид или полипептид, содержащий, состоящий по сути из или состоящий из последовательности иммуногенного фрагмента или варианта TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6) или TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7), где иммуногенный фрагмент или вариант содержит последовательность эпитопа в ECD3 US28, которая связывается антителом 1D3, 1C10, 1A10, 1G9 и/или 1E8.

89. Комбинация по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов, содержащая первый пептид или полипептид и второй пептид или полипептид, где:

первый пептид или полипептид содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), или ее иммуногенного фрагмента, такого как иммуногенный фрагмент по п. 86 или п. 88, при условии, что указанный иммуногенный фрагмент содержит по меньшей мере 4N аминокислоту SEQ ID NO: 6; и

второй пептид или полипептид содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7) или ее иммуногенного фрагмента, такого как иммуногенный фрагмент по п. 86 или п. 88, при условии, что указанный иммуногенный фрагмент содержит по меньшей мере 4D аминокислоту SEQ ID NO: 7.

90. Слитый белок, содержащий, состоящий по сути из или состоящий из первой аминокислотной последовательности, либо слитой непосредственно или через

одну или несколько линкерных аминокислотных последовательностей со второй аминокислотной последовательностью, где

первая аминокислотная последовательность представляет собой последовательность пептида или полипептида по любому из пп. 84-88; и

вторая аминокислотная последовательность представляет собой партнера по слиянию, необязательно при этом партнер по слиянию представляет собой белок-носитель, такой как белок-носитель, который выбран для получения слитого белка, который является подходящим для иммунизации и получения антител против первой аминокислотной последовательности,

необязательно при этом белок-носитель выбран из группы, состоящей из гемоцианина лимфы улитки (KLH), HSA (человеческого сывороточного альбумина), BSA (бычьего сывороточного альбумина), OVA (овальбумина), столбнячного анатоксина (TT), дифтерийного анатоксина (DT), генетически модифицированный перекрестно реагирующего материала (CRM) дифтерийного токсина, белкового комплекса внешней мембраны менингококка (OMPC) и белка D *H. influenzae* (HiD).

91. Комбинация по меньшей мере двух различных слитых белков, содержащая первый слитый белок и второй слитый белок, где:

первый слитый белок по п. 90 содержит в качестве первой аминокислотной последовательности первого слитого белка последовательность, которая содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), или ее иммуногенного фрагмента, такого как иммуногенный фрагмент по п. 86 или п. 88, при условии, что указанный иммуногенный фрагмент содержит по меньшей мере 4N аминокислоту SEQ ID NO: 6; и

второй слитый белок по п. 90 содержит в качестве первой аминокислотной последовательности второго слитого белка последовательность, которая содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7) или ее иммуногенного фрагмента, такого как иммуногенный фрагмент по п. 86 или п. 88, при условии, что указанный иммуногенный фрагмент содержит по меньшей мере 4D-аминокислоту SEQ ID NO:7.

92. Конъюгат, содержащий фрагмент, конъюгированный с пептидом или полипептидом по любому из пп. 84-88, или со слитым белком по п. 90.

93. Конъюгат по п. 92, где:

(i) фрагмент, конъюгированный непосредственно с пептидом или полипептидом по пп. 84-88 или со слитым белком по п. 90; или

(ii) фрагмент, конъюгированный опосредованно, например, через линкер, с пептидом или полипептидом по любому из пп. 84-88 или со слитым белком по п. 90.

94. Конъюгат по п. 92 или п. 93, где указанный фрагмент представляет собой носитель, например, белок-носитель, например, носитель, выбранный из KLH (гемоцианин лимфы улитки), HSA (сывороточный альбумин человека), BSA (бычий сывороточный альбумин), OVA (овальбумин), столбнячный анатоксин (TT), дифтерийный анатоксин (DT), генетически модифицированный перекрестно реагирующий материал (CRM) дифтерийного токсина, белковый комплекс наружной мембраны менингококка (OMPC) и белок D *H. influenzae* (HiD).

95. Комбинация по меньшей мере двух различных конъюгатов, где комбинация содержит:

первый конъюгат по любому из пп. 92-94, где первый конъюгат содержит, состоит по сути из или состоит из фрагмента, конъюгированного с пептидом или полипептидом, где пептид или полипептид содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), или ее иммуногенного фрагмента, такого как иммуногенный фрагмент по п. 86 или п. 88, при условии, что указанный иммуногенный фрагмент содержит по меньшей мере 4N аминокислоту SEQ ID NO: 6; и

второй конъюгат по любому из пп. 92-94, где второй конъюгат содержит, состоит по сути из или состоит из фрагмента, конъюгированного с пептидом или полипептидом, при этом указанный пептид или полипептид содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7) или ее иммуногенного фрагмента, такого как иммуногенный фрагмент по п. 86 или п. 88, при условии, что указанный иммуногенный фрагмент содержит по меньшей мере 4D-аминокислоту SEQ ID NO:7 .

96. Способ получения конъюгата по любому из пп. 92-94, при этом способ включает стадии:

(a) получение пептида или полипептида по любому из пп. 84-88 или слитого белка по п. 90; и

(b) конъюгирование фрагмента с пептидом или полипептидом по любому из пп. 84-88 или со слитым белком по п. 90.

97. Способ получения комбинации по меньшей мере двух различных конъюгатов по п. 95, включающий стадии:

(a) получение первого конъюгата по п. 90 с помощью способа по п. 95;

(b) получение второго конъюгата по п. 90 с помощью способа по п. 95; и

(c) комбинирование первого и второго конъюгатов с образованием таким образом комбинации по п. 95.

98. Способ получения комбинации по меньшей мере двух различных конъюгатов по п. 95, включающий стадии:

(a) получение комбинации по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов по п. 89 или комбинации по меньшей мере двух различных слитых белков по п. 91; и

(b) конъюгирование фрагмента с комбинацией по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов по п. 89 или с комбинацией по меньшей мере двух различных слитых белков по п. 91 с образованием тем самым комбинации по п. 95.

99. Способ по пп. 96, 97 или п. 98, включающий стадию выделения полученного таким образом конъюгата или комбинации конъюгатов.

100. Выделенный конъюгат или комбинация конъюгатов, полученная или которую можно получить с помощью способа по любому из пп. 97-99,

необязательно при этом выделенный конъюгат дополнительно готовят для введения субъекту.

101. Молекула нуклеиновой кислоты или комбинация нескольких отдельных молекул нуклеиновой кислоты,

где молекула нуклеиновой кислоты содержит или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты вместе содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, которые по отдельности или в комбинации

кодируют один или несколько пептидов и/или полипептидов по любому из пп. 84-88, комбинацию по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов по п. 89, слитый белок по п. 90 и/или комбинацию по меньшей мере двух различных слитых белков по п. 91.

102. Молекула нуклеиновой кислоты или комбинация множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 101, где указанная или каждая молекула нуклеиновой кислоты независимо выбрана из молекулы ДНК или РНК.

103. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 101 или п. 102.

104. Вектор по п. 103, где вектор выбран из группы, состоящей из ретровирусного вектора, плазмиды, лентивирусного вектора и аденовирусного вектора.

105. Клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 101 или п. 102, или вектор по п. 103 или п. 104,

Необязательно при этом клетка экспрессирует один или несколько пептидов или полипептидов по любому из пп. 84-88, комбинацию по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов по п. 89, слитый белок по п. 90 или комбинацию по меньшей мере два различных слитых белка по п. 91.

106. Клетка, которая подвергается воздействию содержит один или несколько пептидов или полипептидов по любому из пп. 84-88 и/или комбинацию по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов по п. 89, слитый белок по п. 90, комбинацию по меньшей мере двух различных слитых белков по п. 91, конъюгат по любому из пп. 92-94, комбинацию по меньшей мере двух различных конъюгатов по п. 95, молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию нескольких отдельных молекул нуклеиновой кислоты по п. 101 или п. 102, или вектор по п. 103 или п. 104.

107. Способ выделения и/или обогащения клеток, содержащих Т-клеточный рецептор (TCR) со специфичностью в отношении эпитопа в ECD3 US28 (например, встречающихся в природе Т-клеток или рекомбинантных клеток, экспрессирующих

CAR, по любому из пп. 14-22, например, CAR-T-клеток, CAR-NK-клеток и/или CAR-макрофагов), где способ включает стадию применения средства,

при этом средство выбрано из группы, состоящей из пептида или полипептида по любому из пп. 84-88, комбинации по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов по п. 89, слитого белка по п. 90, комбинации по меньшей мере двух различных слитых белков по п. 91, конъюгата по любому из пп. 92-94 и/или комбинации по меньшей мере двух различных конъюгатов по п. 95,

для выделения и/или обогащения клеток со специфичностью связывания в отношении одной или обеих последовательностей SEQ ID NO: 6 и/или 7.

108. Способ по п. 107, где последовательности составлены в виде тетрамера MHC,

например, тетрамера MHC класса I для обнаружения антигенспецифических $CD8^+$ Т-клеток, тетрамера MHC класса II для обнаружения антигенспецифических $CD4^+$ Т-клеток, меченого флуорофором тетрамера для проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии.

109. Способ по п. 107 или п. 108, где клетка представляет собой CAR-T-клетку, то Т-клетка выбрана из группы, состоящей из $CD8^+$ Т-клеток, CD4+ Т-клеток, эффекторных Т-клеток, Т-клеток-хелперов, Т-клеток памяти, цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), EBV-специфического Т-клеточного рецептора (TCR) или подтипов γδ-Т-клеток.

110. Тетрамер MHC, содержащий пептид или полипептид по любому из пп. 84-88, комбинацию по меньшей мере двух различных пептидов и/или полипептидов по п. 89, необязательно при этом пептид содержит или соответствует SEQ ID NO:6 или SEQ ID. NO:7 или иммуногенный фрагмент одного или обоих,

например, при этом тетрамер MHC представляет собой тетрамер MHC класса I для обнаружения антигенспецифических $CD8^+$ Т-клеток, тетрамера MHC класса II для обнаружения антигенспецифических $CD4^+$ Т-клеток, меченого флуорофором тетрамера для проточной цитометрии или флуоресцентной микроскопии.

111. Тетрамер MHC по п. 110 для применения в выделении и/или обогащении клеток, содержащих Т-клеточный рецептор (TCR) со специфичностью в отношении

эпитопа в ECD3 US28, например, Т-клетку, выбранную из группы, состоящей из $CD8^+$ Т-клеток, $CD4^+$ Т-клеток, эффекторных Т-клеток, Т-клеток-хелперов, Т-клеток памяти, цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), EBV-специфического Т-клеточного рецептора (TCR) или подтипов γδ-Т-клеток и/или рекомбинантной клетки, экспрессирующей CAR по пп. 14-22, например, CAR Т-клетки, CAR NK-клетки и/или CAR-макрофага.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

измененная на международной стадии

1. Связывающая молекула, содержащая одну или несколько полипептидных цепей, при этом указанная связывающая молекула имеет специфичность связывания в отношении эпитопа, общего для и присутствующего как в последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), так и в последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7),

где последовательность SEQ ID NO: 6 представляет собой последовательность внеклеточного домена 3 (ECD3) 4N-варианта белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV) и SEQ ID NO: 7 представляет собой последовательность ECD3 4D-варианта белка US28 HCMV.

2. Связывающая молекула по п. 1, причем связывающая молекула выбрана из антитела и химерного антигенного рецептора (CAR).

3. Связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где связывающая молекула имеет специфичность связывания в отношении линейного эпитопа в ECD3 белка US28.

4. Связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где связывающая молекула:

(a) имеет специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, которая является агностической в отношении двух или более (например, всех) штаммов HCMV, и/или

(b) имеет специфичность связывания, которая является агностической в отношении двух или более (например, всех) штаммов HCMV, выбранных из группы, состоящей из DB, Towne, AF1, VHL/E, AD169, BL, DAVIS, JP, Merlin, PH, TB40/E, Toledo, TR и VR1814 (FIX).

5. Связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где связывающая молекула имеет специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, присутствующего в последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7), обнаруженной в ECD3 US28, кодируемой первой группой штаммов HCMV, таких как Towne, VR1814, TB40/E, Merlin, JP, Ad169, AF1, VHL/E, BL и DAVIS; а также имеет специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV,

присутствующего в последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), обнаруженной в ECD3 US28, кодируемой второй группой штаммов HCMV, таких как штаммы Toledo, TR и DB.

6. Связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, содержащая одну, две, три, четыре, пять или шесть определяющих комплементарность областей (CDR), соответствующих любой одной, двум, трем, четырем, пяти или всем шести последовательностям CDR антитела:

(a) 1D3, как определено SEQ ID NO: 8, 9, 10, 14, 15 и 16 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1D3;

(b) 1C10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83 и 118 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1C10;

(c) 1A10, как определено SEQ ID NO: 112, 113, 114, 117, 83 и 118 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1A10;

(d) 1G9, как определено SEQ ID NO: 76, 77, 78, 82, 83 и 84 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1G9; и/или

(e) 1E8, как определено SEQ ID NO: 76, 95, 96, 82, 99 и 100 соответственно, и/или функциональный вариант любого одного или нескольких указанных последовательностей CDR антитела 1E8;

и

необязательно при этом связывающая молекула выбрана из антитела и CAR.

7. Связывающая молекула по п. 6, содержащая:

(a) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области тяжелой цепи (V_H) антитела:

(i) 1D3, как определено SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно;

(ii) 1C10, как определено SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно;

(iii) 1A10, как определено SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно;

(iv) 1G9, как определено SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно; и/или

(v) 1E8, как определено SEQ ID NO: 76, 95 и 96 соответственно;

и/или

(b) одну, две или все три из последовательностей CDR 1, 2 и 3 вариабельной области легкой цепи (V_L) антитела:

(i) 1D3, как определено SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно;

(ii) 1C10, как определено SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно;

(iii) 1A10, как определено SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно;

(iv) 1G9, как определено SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно; и/или

(v) 1E8, как определено SEQ ID NO: 82, 99 и 100 соответственно.

8. Связывающая молекула по п. 6 или п. 7, содержащая:

(a) по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности:

(i) SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно, и

необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 12;

(ii) SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно, и

необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 104;

(iii) SEQ ID NO: 112, 113 и 114 соответственно, и

необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 122;

(iv) SEQ ID NO: 76, 77 и 78 соответственно, и

необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 68; и/или

(v) SEQ ID NO: 76, 95 и 96 соответственно, и

необязательно при этом по меньшей мере один полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 88;

и/или

(b) по меньшей мере один полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L), который содержит последовательности CDR 1, 2 и 3, имеющие последовательности:

(i) SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно, и

необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 18;

(ii) SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно, и

необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 108;

(iii) SEQ ID NO: 117, 83 и 118 соответственно, и

необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 126;

(iv) SEQ ID NO: 82, 83 и 84 соответственно, и

необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 72; и/или

(v) SEQ ID NO: 82, 99 и 100 соответственно, и

необязательно при этом полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L) содержит, состоит по сути из или состоит из последовательности SEQ ID NO: 92.

9. Связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где связывающая молекула выбрана из группы, состоящей из:

(a) бивалентных антител, таких как антитела IgG-scFv (например, где первый связывающий домен представляет собой интактный IgG, а второй связывающий домен представляет собой scFv, прикрепленный к первому связывающему домену на N-конце легкой цепи и/или на C-конце легкой цепи, и/или на N-конце тяжелой цепи и/или на C-конце тяжелой цепи IgG, или наоборот);

(b) моновалентных антител, таких как *DuoBody*® или биспецифическое антитело типа «выступ во впадине» (например, scFv-KIH, scFv-KIH^r, BiTE-KIH или BiTE-KIH^r;

(c) антител $scFv_2$-Fc;

(d) биспецифических антител, таких как антитела на основе привлекающих Т-клетки биспецифических активаторов (BiTE);

(e) антител с двойным вариабельным доменом (DVD)-Ig;

(f) переориентирующихся антител с двойной аффинностью (DART) (например, $DART_2$-Fc или DART);

(g) триспецифических антител, таких как антитела DNL-Fab_3;

(h) антител scFv-HSA-scFv;

(i) однодоменных антител;

(j) IgG, содержащих только тяжелые цепи (hcIgG), таких как IgG верблюдовых (например, антитела VHH) и рецептор нового антигена иммуноглобулина акулы (IgNAR), и их одноцепочечных антител; и

(k) химерного антигенного рецептора (CAR), содержащего внеклеточный домен по п. 1 или любому другому зависимому от него пункту, например, внеклеточный домен, который содержит любой из вариантов (a)-(h) данного пункта или их комбинации.

10. Связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где связывающая молекула представляет собой:

(i) антитело на основе привлекающего иммунные клетки биспецифического активатора, например, привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BiTE), и необязательно при этом антитело BiTE содержит CD3-связывающий домен; или

(ii) моноклональное антитело, необязательно рекомбинантное моноклональное антитело, например, моноклональное антитело, продуцируемое рекомбинантно клетками CHO.

11. Функциональный фрагмент связывающей молекулы по любому из предыдущих пунктов, где функциональный фрагмент имеет специфичность связывания в отношении эпитопа, общего для и присутствующего как в последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), так и в последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7), и:

(a) содержит или состоит из антигенсвязывающего фрагмента связывающей молекулы, как определено в любом из предыдущих пунктов, или его варианта, слияния или производного, выбранного из группы, состоящей из: фрагмента Fv (такого как одноцепочечный фрагмент Fv (scFv) или фрагмент Fv с дисульфидной связью), Fab-подобного фрагмента (такого как Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент или фрагмент $F(ab)_2$) и однодоменных антител (dAb, включая одиночные и двойные форматы, такие как dAb-линкер-dAb и нанотела);

(b) обеспечивает связывающие характеристики по любому из пп. 2-5;

(c) содержит последовательности CDR по любому из пп. 6-8; и/или

(d) содержит последовательности V_H и/или V_L по п. 8.

12. Связывающая молекула по любому из пп. 1-10 или функциональный фрагмент указанной связывающей молекулы по п. 11, где связывающая молекула или ее функциональный фрагмент содержит слитую полипептидную последовательность,

при этом указанная последовательность слитого полипептида содержит первую аминокислотную последовательность, слитую со второй аминокислотной последовательностью, где

первая аминокислотная последовательность содержит или состоит из по меньшей мере одной из полипептидных цепей связывающей молекулы или ее функционального фрагмента, и

вторая аминокислотная последовательность является партнером по слиянию.

13. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:

(i) внеклеточный домен, где внеклеточный домен содержит или состоит из связывающей молекулы по любому из пп. 1-10 или п. 12, или функционального фрагмента указанной связывающей молекулы по любому из п. 11 или п. 12;

(ii) трансмембранный домен; и

(iii) внутриклеточный домен;

где внеклеточный домен CAR имеет специфичность связывания в отношении эпитопа, общего для и присутствующего как в последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), так и в последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7),

где последовательность SEQ ID NO: 6 представляет собой последовательность внеклеточного домена 3 (ECD3) 4N-варианта белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV) и SEQ ID NO: 7 представляет собой последовательность ECD3 4D-варианта белка US28 HCMV.

14. CAR по п. 13, где внеклеточный домен представляет собой антитело, например, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

15. CAR по п. 13 или п. 14, где трансмембранный домен содержит трансмембранный домен белка, например, трансмембранный домен белка трансмембранного рецептора, и

необязательно при этом трансмембранный домен содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD8, CD45 и CD4.

16. CAR по любому из пп. 13-15, где:

(a) внеклеточный домен соединен с трансмембранным доменом шарнирной областью;

(b) внутриклеточный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен;

(c) внутриклеточный домен содержит один или несколько костимулирующих доменов; и/или

(d) CAR дополнительно содержит лидерную последовательность.

17. Молекула нуклеиновой кислоты или комбинация нескольких отдельных молекул нуклеиновой кислоты,

где молекула нуклеиновой кислоты содержит или комбинация множества отдельных молекул нуклеиновой кислоты вместе содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, которые отдельно или в комбинации кодируют связывающую молекулу по любому из пп. 1-12 или CAR по любому из пп. 13-16.

18. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 17.

19. Клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 17, или вектор по п. 18,

необязательно при этом клетка экспрессирует одну или несколько связывающих молекул по любому из пп. 1-12 и/или один или несколько CAR по любому из пп. 13-16, при этом указанная одна или несколько связывающих молекул и/или CAR кодируются молекулой нуклеиновой кислоты или комбинацией множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 17, или вектором по п. 18.

20. Клетка, содержащая связывающую молекулу по любому из пп. 1-12 и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанную связывающую молекулу, необязательно при этом нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту или вектор по п. 17 или п. 18.

21. Клетка по п. 20, где

связывающая молекула представляет собой антитело по любому из пп. 1-10, функциональный фрагмент указанного антитела по п. 11 или антитело его функционального фрагмента, который содержит слитую полипептидную последовательность по п. 12, и

необязательно при этом антитело представляет собой моноклональное антитело.

22. Клетка, содержащая CAR по любому из пп. 13-16 и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный CAR, необязательно при этом нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту или вектор по п. 17 или п. 18.

23. Клетка по п. 19, 20 или п. 21, где клетка представляет собой Т-клетку, естественную клетку-киллер (NK) или макрофаг.

24. Клетка по п. 22 или п. 23, где клетка представляет собой CAR-Т-клетку, CAR-NK-клетку или CAR-макрофаг, и

необязательно, когда клетка представляет собой CAR-Т-клетку, то Т-клетка выбрана из группы, состоящей из $CD8^+$ Т-клеток, CD4+ Т-клеток, эффекторных Т-клеток, Т-клеток-хелперов, Т-клеток памяти, цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), EBV-специфического Т-клеточного рецептора (TCR) или подтипов γδ-Т-клеток.

25. Способ получения клетки, включающий введение в клетку молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 17 и/или вектора по п. 18 в клетку.

26. Способ получения связывающей молекулы по любому из пп. 1-12 или CAR по любому из пп. 13-16, при этом способ включает:

экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 17 и/или вектора по п. 18 в клетке.

27. Способ по п. 26, включающий стадию выделения полученной таким образом связывающей молекулы из клетки; и

необязательно при этом связывающая молекула представляет собой антитело по любому из пп. 1-10, функциональный фрагмент указанного антитела по п. 11 или антитело его функционального фрагмента, который содержит слитую полипептидную последовательность по п. 12.

28. Выделенная связывающая молекула, которую получают или которую можно получить с помощью способа по п. 27,

необязательно при этом выделенную связывающую молекулу дополнительно готовят для введения субъекту.

29. Конъюгат, при этом конъюгат содержит фрагмент, конъюгированный со связывающей молекулой по любому из пп. 1-10 или п. 12, или с функциональным фрагментом указанной связывающей молекулы по п. 11 или п. 12.

30. Конъюгат по п. 29, где указанный фрагмент представляет собой терапевтический, профилактический, диагностический, прогностический или терагностический фрагмент.

31. Конъюгат по п. 29 или п. 30, где указанный фрагмент представляет собой лекарственное средство (например, при этом конъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство («ADC»)) и/или радиоактивный фрагмент (например, при этом конъюгат применим для применения в радиоиммунотерапии («RIT»)).

32. Способ получения конъюгата по любому из пп. 29-31, при этом способ включает стадии:

(a) получение связывающей молекулы по любому из пп. 1-10 или п. 12, или функционального фрагмента указанной связывающей молекулы по любому из п. 11 или п. 12; и

(b) конъюгирование фрагмента со связывающей молекулой по любому из пп. 1-10 или п. 12, или с функциональным фрагментом указанной связывающей молекулы по любому из п. 11 или п. 12.

33. Способ по п. 32, включающий стадию выделения полученного таким образом конъюгата.

34. Выделенный конъюгат, который получают или который можно получить с помощью способа по п. 33,

необязательно при этом выделенный конъюгат дополнительно готовят для введения субъекту.

35. Способ борьбы с HCMV или заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, при этом способ включает введение субъекту, или *ex vivo* или *in vitro* в клеточный материал любого одного или нескольких средств, выбранных из группы, состоящей из:

i. связывающей молекулы по любому из пп. 1-10 или п. 12,

ii. функционального фрагмента указанной связывающей молекулы по п. 11 или п. 12,

iii. выделенной связывающей молекулы по п. 28,

iv. молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 17,

v. вектора по п. 18,

vi. клетки по любому из пп. 19-24,

vii. конъюгата по любому из пп. 29-32, и

viii. выделенного конъюгата по п. 34.

36. Одно или несколько средств для применения в борьбе с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, у субъекта или клеточного материала *ex vivo* или *in vitro*, где указанные или каждое одно или несколько средств в отдельности выбраны из группы, состоящей из:

i. связывающей молекулы по любому из пп. 1-10 или п. 12,

ii. функционального фрагмента указанной связывающей молекулы по п. 11 или п. 12,

iii. выделенной связывающей молекулы по п. 28,

iv. молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 17,

v. вектора по п. 18,

vi. клетки по любому из пп. 19-24,

vii. конъюгата по любому из пп. 29-32, и

viii. выделенного конъюгата по п. 34.

37. Применение одного или нескольких средств в производстве лекарственного препарата для применения в борьбе с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, у субъекта или клеточного материала *ex vivo* или *in vitro*, где указанные или каждое одно или несколько средств в отдельности выбраны из группы, состоящей из:

i. связывающей молекулы по любому из пп. 1-10 или п. 12,

ii. функционального фрагмента указанной связывающей молекулы по п. 11 или п. 12,

iii. выделенной связывающей молекулы по п. 28,

iv. молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 17,

v. вектора по п. 18,

vi. клетки по любому из пп. 19-24,

vii. конъюгата по любому из пп. 29-32, и

viii. выделенного конъюгата по п. 34.

38. Способ по п. 35, одно или несколько средств для применения по п. 36 или применение по п. 37, где:

i. заболевание или состояние представляет собой инфекцию HCMV или ассоциировано с инфекцией HCMV, и необязательно инфекция HCMV включает инфекцию, состоящую из нескольких штаммов HCMV, при этом мультиштаммовая инфекция HCMV включает инфекцию более чем одним различным штаммом HCMV, например, одним или несколькими штаммами HCMV, которые кодируют 4N-вариант ECD3 US28, и один или несколько штаммов HCMV, которые кодируют 4D-вариант ECD3 US28;

ii. заболевание или состояние представляет собой латентную инфекцию HCMV (необязательно мультиштаммовую латентную инфекцию HCMV) или ассоциировано с латентной инфекцией HCMV (необязательно мультиштаммовой латентной инфекцией HCMV);

iii. заболевание или состояние представляет собой литическую инфекцию HCMV (необязательно мультиштаммовую литическую инфекцию HCMV) или ассоциировано с литической инфекцией HCMV (необязательно мультиштаммовой литической инфекцией HCMV);

iv. заболевание или состояние представляет собой врожденную одноштаммовую или мультиштаммовую инфекцию HCMV, такую как латентная врожденная одноштаммовая или мультиштаммовая инфекция HCMV или литическая врожденная одноштаммовая или мультиштаммовая инфекция HCMV;

v. заболевание или состояние представляет собой рак;

vi. заболевание или состояние представляет собой инфицированный HCMV рак (необязательно мультиштаммовый инфицированный HCMV рак), такой как латентный инфицированный HCMV рак (необязательно мультиштаммовый латентный инфицированный HCMV рак);

vii. заболевание или состояние представляет собой эпителиальный рак; необязательно при этом эпителиальный рак представляет собой рак молочной железы; например, при этом рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы (TNBC) или HER2-положительный рак молочной железы (такой как трижды положительный рак молочной железы «TPBC»);

viii. заболевание представляет собой метастазирующую и/или агрессивную форму рака, такую как метастазирующая и/или агрессивная форма инфицированного HCMV рака (например, рака, имеющего латентную инфекцию HCMV и/или мультиштаммовую инфекцию HCMV);

ix. заболевание или состояние не является глиобластомой;

x. у субъекта, нуждающегося в этом, были диагностированы инфицированные HCMV раковые клетки, такие как латентные инфицированные HCMV раковые клетки или раковые клетки с продуктивной инфекцией HCMV (включая без ограничения опухолеассоциированные макрофаги с продуктивной инфекцией HCMV); и/или

xi. субъект, нуждающийся в этом, является или предполагается быть получателем донорского органа или донором органов.

39. Способ по п. 35 или п. 38, одно или несколько средств для применения по п. 36 или п. 38 или применение по п. 37 или п. 38,

где средство выбрано из группы, состоящей из:

i. терапевтического антитела по любому из пп. 1-10,

ii. функционального фрагмента указанного терапевтического антитела по п. 11,

iii. терапевтического антитела, которое содержит слитую полипептидную последовательность по п. 12; и

iv. функционального фрагмента указанного терапевтического антитела, который содержит слитую полипептидную последовательность по п. 12.

40. Способ по п. 35 или п. 38, одно или несколько средств для применения по п. 36 или п. 38 или применение по п. 37 или п. 38,

где средство представляет собой биспецифическое антитело, например, антитело на основе привлекающего иммунные клетки биспецифического активатора, такое как антитело на основе привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BiTE), необязательно при этом антитело BiTE содержит CD3-связывающий домен.

41. Способ по п. 35 или п. 38, одно или несколько средств для применения по п. 36 или п. 38 или применение по п. 37 или п. 38,

где средство представляет собой конъюгат по любому из пп. 29-32, такой как конъюгат, который представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство («ADC»), или конъюгат, который содержит радиоактивный фрагмент, такой как конъюгат, который является подходящим для применения в радиоиммунотерапии («RIT»).

42. Способ по п. 35 или п. 38, одно или несколько средств для применения по п. 36 или п. 38 или применение по п. 37 или п. 38,

где средство представляет собой клетку, содержащую CAR по любому из пп. 22-24, например, CAR-T-клетку, CAR-NK-клетку или CAR-макрофаг.

43. Способ по п. 35 или любому из пп. 38-42, одно или несколько средств для применения по п. 36 или любому из пп. 38-42, или применение по любому из пп. 37-42,

где субъект представляет собой субъекта, которому вводят дополнительное вещество, такое как дополнительное терапевтическое, профилактическое, диагностическое, прогностическое или терагностическое вещество, и

необязательно при этом дополнительное вещество вводят отдельно, последовательно или одновременно с указанными или каждым одним или несколькими средствами.

44. Средство для применения в медицине, где средство выбрано из группы, состоящей:

i. связывающей молекулы по любому из пп. 1-10 или п. 12,

ii. функционального фрагмента указанной связывающей молекулы по п. 11 или п. 12,

iii. выделенной связывающей молекулы по п. 28,

iv. молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 17,

v. вектора по п. 18,

vi. клетки по любому из пп. 19-24,

vii. конъюгата по любому из пп. 29-32, и

viii. выделенного конъюгата по п. 34.

45. Вакцинная композиция, подходящая для применения в вакцинации, снижении риска, предупреждении или борьбе с заболеванием или состоянием, ассоциированным с цитомегаловирусом человека (HCMV),

где вакцина представляет собой пассивную вакцину и содержит:

(a) одну или несколько связывающих молекул по любому из пп. 1-10 или п. 12,

(b) один или несколько функциональных фрагментов указанной одной или нескольких связывающих молекул по п. 11 или п. 12,

(c) одну или несколько выделенных связывающих молекул по п. 28,

(d) одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты или комбинацию множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 17,

(e) один или несколько векторов по п. 18,

(f) одну или несколько клеток по любому из пп. 19-24,

(g) один или несколько конъюгатов по любому из пп. 29-32, и/или

(h) один или несколько выделенных конъюгатов по п. 34.

46. Способ вакцинации, снижения риска, предупреждения и/или борьбы с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, при этом способ включает введение субъекту вакцины по п. 45,

необязательно при этом заболевание или состояние представляет собой латентную инфекцию HCMV или представляет собой заболевание или состояние, ассоциированное с латентной инфекцией HCMV.

47. Вакцинная композиция по п. 45 для применения в вакцинации, снижении риска, предупреждении и/или борьбе с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, у субъекта,

необязательно при этом заболевание или состояние представляет собой латентную инфекцию HCMV или представляет собой заболевание или состояние, ассоциированное с латентной инфекцией HCMV.

48. Применение вакцинной композиции по п. 45 в производстве лекарственного препарата для вакцинации, снижения риска, предупреждения и/или борьбы с заболеванием или состоянием, ассоциированным с HCMV, у субъекта,

необязательно при этом заболевание или состояние представляет собой латентную инфекцию HCMV или представляет собой заболевание или состояние, ассоциированное с латентной инфекцией HCMV.

49. Вакцинная композиция по п. 45, способ по п. 46, вакцинная композиция для применения по п. 47 или применение по п. 48, где:

i. заболевание или состояние представляет собой инфекцию HCMV или ассоциировано с инфекцией HCMV, и необязательно инфекция HCMV включает инфекцию, состоящую из нескольких штаммов HCMV, при этом мультиштаммовая инфекция HCMV включает инфекцию более чем одним различным штаммом HCMV, например, одним или несколькими штаммами HCMV, которые кодируют 4N-вариант ECD3 US28, и один или несколько штаммов HCMV, которые кодируют 4D-вариант ECD3 US28;

ii. заболевание или состояние представляет собой латентную инфекцию HCMV (необязательно мультиштаммовую латентную инфекцию HCMV) или ассоциировано с латентной инфекцией HCMV (необязательно мультиштаммовой латентной инфекцией HCMV);

iii. заболевание или состояние представляет собой литическую инфекцию HCMV (необязательно мультиштаммовую литическую инфекцию HCMV) или ассоциировано с литической инфекцией HCMV (необязательно мультиштаммовой литической инфекцией HCMV);

iv. заболевание или состояние представляет собой врожденную одноштаммовую или мультиштаммовую инфекцию HCMV, такую как латентная врожденная одноштаммовая или мультиштаммовая инфекция HCMV или литическая врожденная одноштаммовая или мультиштаммовая инфекция HCMV;

v. заболевание или состояние представляет собой рак;

vi. заболевание или состояние представляет собой инфицированный HCMV рак (необязательно мультиштаммовый инфицированный HCMV рак), такой как латентный инфицированный HCMV рак (необязательно мультиштаммовый латентный инфицированный HCMV рак);

vii. заболевание или состояние представляет собой эпителиальный рак; необязательно при этом эпителиальный рак представляет собой рак молочной железы; например, при этом рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы (TNBC) или HER2-положительный рак молочной железы (такой как трижды положительный рак молочной железы «TPBC»);

viii. заболевание или состояние представляет собой метастазирующую и/или агрессивную форму рака, такую как метастазирующая и/или агрессивная форма инфицированного HCMV рака (например, рака, имеющего латентную инфекцию HCMV и/или мультиштаммовую инфекцию HCMV);

ix. заболевание или состояние не является глиобластомой;

x. у субъекта, нуждающегося в этом, были диагностированы инфицированные HCMV раковые клетки, такие как латентные инфицированные HCMV раковые клетки или раковые клетки с продуктивной инфекцией HCMV (включая без ограничения опухолеассоциированные макрофаги с продуктивной инфекцией HCMV); и/или

xi. субъект, нуждающийся в этом, является или предполагается быть получателем донорского органа или донором органов.

50. Способ оценки одного или нескольких биологических состояний и/или биологических характеристик субъекта и/или биологического материала *ex vivo*, при этом способ включает:

(a) приведение субъекта и/или биологического материала в контакт *ex vivo* со связывающей молекулой по любому из пп. 1-12 или конъюгатом по любому из пп. 29-31 или п. 34; и

(b) проведение оценки субъекта и/или биологического материала *ex vivo* на основе прямого и/или опосредованного измерения связывания связывающей молекулы или конъюгата с субъектом и/или биологическим материалом *ex vivo*.

51. Способ по п. 50, где:

(a) способ включает метод ELISA и необязательно способ осуществляют в отношении биологического материала *ex vivo*, такого как одна или несколько жидкостей организма;

(b) способ включает метод проточной цитометрии и необязательно способ представляет собой способ оценки образца крови *ex vivo* и/или образца костного мозга *ex vivo* от субъекта;

(c) способ включает применение конъюгата по любому из пп. 29-31 или п. 34, где конъюгат содержит обнаружимый фрагмент, такой как радиоактивный фрагмент, и способ включает обнаружение радиоактивного фрагмента у субъекта и/ или биологического материала *ex vivo*,

например, где способ представляет собой метод иммунопозитронно-эмиссионной (PET) визуализации; или

(d) способ представляет собой метод иммуногистохимии, выполняемый в отношении образца биологического материала *ex vivo*.

52. Способ по п. 50, где способ осуществляют в отношении субъекта или биологического материала *ex vivo*, полученного от субъекта, с целью проведения диагностической или прогностической оценки заболевания или состояния, ассоциированного с HCMV, у субъекта.

53. Способ по п. 52, где:

i. заболевание или состояние представляет собой инфекцию HCMV или ассоциировано с инфекцией HCMV, и необязательно инфекция HCMV включает инфекцию, состоящую из нескольких штаммов HCMV, при этом мультиштаммовая инфекция HCMV включает инфекцию более чем одним различным штаммом HCMV, например, одним или несколькими штаммами HCMV, которые кодируют 4N-вариант ECD3 US28, и один или несколько штаммов HCMV, которые кодируют 4D-вариант ECD3 US28;

ii. заболевание или состояние представляет собой латентную инфекцию HCMV (необязательно мультиштаммовую латентную инфекцию HCMV) или ассоциировано с латентной инфекцией HCMV (необязательно мультиштаммовой латентной инфекцией HCMV);

iii. заболевание или состояние представляет собой литическую инфекцию HCMV (необязательно мультиштаммовую литическую инфекцию HCMV) или

ассоциировано с литической инфекцией HCMV (необязательно мультиштаммовой литической инфекцией HCMV);

iv. заболевание или состояние представляет собой врожденную одноштаммовую или мультиштаммовую инфекцию HCMV, такую как латентная врожденная одноштаммовая или мультиштаммовая инфекция HCMV или литическая врожденная одноштаммовая или мультиштаммовая инфекция HCMV;

v. заболевание или состояние представляет собой рак;

vi. заболевание или состояние представляет собой инфицированный HCMV рак (необязательно мультиштаммовый инфицированный HCMV рак), такой как латентный инфицированный HCMV рак (необязательно мультиштаммовый латентный инфицированный HCMV рак);

vii. заболевание или состояние представляет собой эпителиальный рак; необязательно при этом эпителиальный рак представляет собой рак молочной железы; например, при этом рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы (TNBC) или HER2-положительный рак молочной железы (такой как трижды положительный рак молочной железы «TPBC»);

viii. заболевание или состояние представляет собой метастазирующую и/или агрессивную форму рака, такую как метастазирующая и/или агрессивная форма инфицированного HCMV рака (например, рака, имеющего латентную инфекцию HCMV и/или мультиштаммовую инфекцию HCMV);

ix. заболевание или состояние не является глиобластомой; и/или

x. у субъекта, нуждающегося в этом, были диагностированы инфицированные HCMV раковые клетки, такие как латентные инфицированные HCMV раковые клетки или раковые клетки с продуктивной инфекцией HCMV (включая без ограничения опухолеассоциированные макрофаги с продуктивной инфекцией HCMV), и/или инфицированные мультиштаммовой инфекций HCMV раковые клетки;

xi. субъект является или предполагается быть получателем донорского органа или донором органов.

54. Способ борьбы с инфекцией HCMV (такой как латентная инфекция HCMV, и/или литическая инфекция HCMV, и/или мультиштаммовая инфекция HCMV) в живом биологическом материале *ex vivo*, при этом способ включает приведение живого биологического материала *ex vivo* в контакт с любым одним или несколькими средствами, выбранными из группы, состоящей из:

i. связывающей молекулы по любому из пп. 1-10 или п. 12,

ii. функционального фрагмента указанной связывающей молекулы по п. 11 или п. 12,

iii. выделенной связывающей молекулы по п. 28,

iv. молекулы нуклеиновой кислоты или комбинации множества различных молекул нуклеиновой кислоты по п. 17,

v. вектора по п. 18,

vi. клетки по любому из пп. 19-24,

vii. конъюгата по любому из пп. 29-32, и

viii. выделенного конъюгата по п. 34.

55. Живой биологический материал *ex vivo*, который получают или можно получить с помощью способа по п. 54.

56. Способ по п. 54 или живой биологический материал *ex vivo* по п. 55, где живой биологический материал *ex vivo* содержит, состоит по сути из или состоит из живого биологического материала *ex vivo*, выбранного из группы, которая включает: один или несколько типов клеток *ex vivo*; один или несколько типов клеточных культур *ex vivo*; один или несколько типов тканей *ex vivo*; один или несколько типов культур тканей *ex vivo*; один или несколько типов органоидов *ex vivo*; один или несколько типов органоидных культур *ex vivo*; один или несколько типов органов *ex vivo*; и/или один или несколько типов культур органов *ex vivo*.

57. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту живого биологического материала *ex vivo* по п. 55 или п. 56.

58. Способ по п. 57, где способ представляет собой способ трансплантации живого биологического материала *ex vivo*, такого как трансплантат органа или ткани.

59. Способ скрининга связывающей молекулы, имеющей специфичность связывания в отношении эпитопа, общего для и присутствующего как в последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), так и в последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7),

где последовательность SEQ ID NO: 6 представляет собой последовательность во внеклеточном домене 3 (ECD3) 4N-варианта белка US28 цитомегаловируса человека (HCMV) и SEQ ID NO: 7 представляет собой последовательность ECD3 4D-варианта белка US28 HCMV,

при этом способ включает:

(a) получение пептида, который содержит, состоит по сути из или состоит из полипептидной последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7) или ее иммуногенного фрагмента, и пептида, который содержит, состоит по сути из или состоит из полипептидной последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6) или ее иммуногенного фрагмента;

(b) получение одной или нескольких связывающих молекул-кандидатов;

(c) определение специфичности связывания и/или аффинности связывания одной или нескольких связывающих молекул-кандидатов с одним или несколькими пептидами.

60. Способ по п. 59, где одна или несколько связывающих молекул-кандидатов представляют собой антитела и/или CAR, такие как любое одно или несколько из:

(a) бивалентных антител, таких как антитела IgG-scFv (например, где первый связывающий домен представляет собой интактный IgG, а второй связывающий домен представляет собой scFv, прикрепленный к первому связывающему домену на N-конце легкой цепи и/или на C-конце легкой цепи, и/или на N-конце тяжелой цепи и/или на C-конце тяжелой цепи IgG, или наоборот);

(b) моновалентных антител, таких как *DuoBody*® или биспецифическое антитело типа «выступ во впадине» (например, scFv-KIH, scFv-KIH^r, BiTE-KIH или BiTE-KIH^r;

(c) антител $scFv_2$-Fc;

(d) биспецифических антител, таких как антитела на основе привлекающих Т-клетки биспецифических активаторов (BiTE);

(e) антител с двойным вариабельным доменом (DVD)-Ig;

(f) переориентирующихся антител с двойной аффинностью (DART) (например, $DART_2$-Fc или DART);

(g) триспецифических антител, таких как антитела DNL-Fab_3;

(h) антител scFv-HSA-scFv; и

(i) химерного антигенного рецептора (CAR).

61. Способ по п. 59 или п. 60, дополнительно включающий стадию выбора связывающей молекулы-кандидата на основе специфичности связывания и/или аффинности связывания в отношении пептида, который содержит, состоит по сути из или состоит из полипептидной последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7) или ее иммуногенного фрагмента, и в отношении пептида, который содержит, состоит по сути из или состоит из полипептидной последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6) или ее иммуногенного фрагмента.

62. Способ по п. 61, где выбранная связывающая молекула-кандидат:

(a) имеет специфичность связывания в отношении линейного эпитопа в ECD3 белка US28; и/или

(b) имеет специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, который является агностическим в отношении штамма HCMV, например, специфичность связывания в отношении эпитопа в ECD3 белка US28 HCMV, который является агностическим в отношении двух или более (например, всех) штаммов HCMV, выбранных из группы, состоящей из DB, Towne, AD169, DAVIS, BL, JP, Merlin, PH, TB40/E, Toledo, VHL/E, TR и VR1814 (FIX.

63. Способ по п. 61 или п. 62, где выбранная связывающая молекула-кандидат имеет специфичность связывания и/или аффинность связывания в отношении пептида, который содержит, состоит по сути из или состоит из полипептидной последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7) или ее иммуногенного фрагмента, и в отношении пептида, который содержит, состоит по сути из или состоит из полипептидной последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6) или ее иммуногенного фрагмента, который эквивалентен специфичности связывания и/или аффинности связывания в отношении тех же пептидов, как продемонстрировано антителом, которое содержит полипептид вариабельной области тяжелой цепи (V_H), который состоит из последовательности SEQ ID NO:12, и полипептид вариабельной области легкой цепи (V_L), который состоит из последовательности SEQ ID NO:18.

64. Способ получения композиции, которая содержит множество копий связывающей молекулы, имеющей специфичность связывания в отношении эпитопа, общего для и присутствующего как в последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), так и в последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7), при этом

указанный способ включает воспроизведение выбранной связывающей молекулы-кандидата, которая была выбрана в соответствии со способом по любому из пп. 61, 62 или п. 63.

65. Способ оценки выбранной связывающей молекулы-кандидата, имеющей специфичность связывания в отношении эпитопа, общего для и присутствующего как в последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), так и в последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7) которая была выбрана в соответствии со способом по любому из пп. 61, 62 или п. 63, при этом указанный способ включает и идентифицирует структуру(ы) внутри выбранной связывающей молекулы-кандидата, которая обеспечивает ее связывающие характеристики,

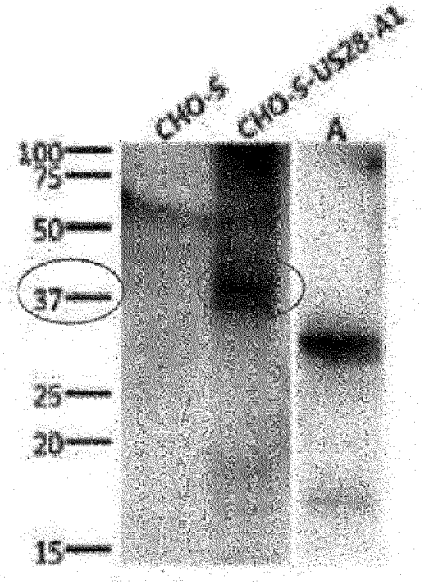
например, идентифицирует указанную или каждую последовательность CDR в выбранной связывающей молекуле-кандидате, которая представляет собой антитело или CAR.

66. Способ получения композиции, которая содержит множество копий связывающей молекулы, имеющей специфичность связывания в отношении эпитопа, общего для и присутствующего как в последовательности TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6), так и в последовательности TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7), где указанная связывающая молекула содержит указанную или каждую структуру(ы), которые были идентифицированы внутри выбранной связывающей молекулы-кандидата как обеспечивающие ее связывающие характеристики, в соответствии со способом по п. 65,

при этом указанный способ включает воспроизведение связывающей молекулы.

67. Композиция связывающих молекул, полученная с помощью способа по п. 64 или п. 66.

Фиг. 1



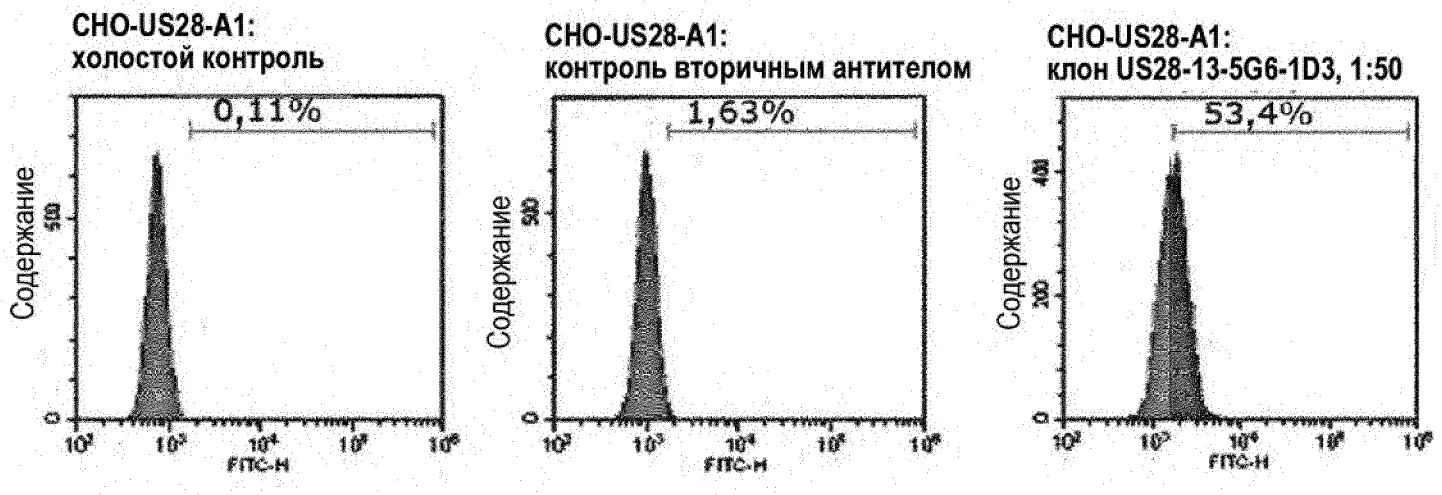
М.м. US28: ~40 кДа

Фиг. 3

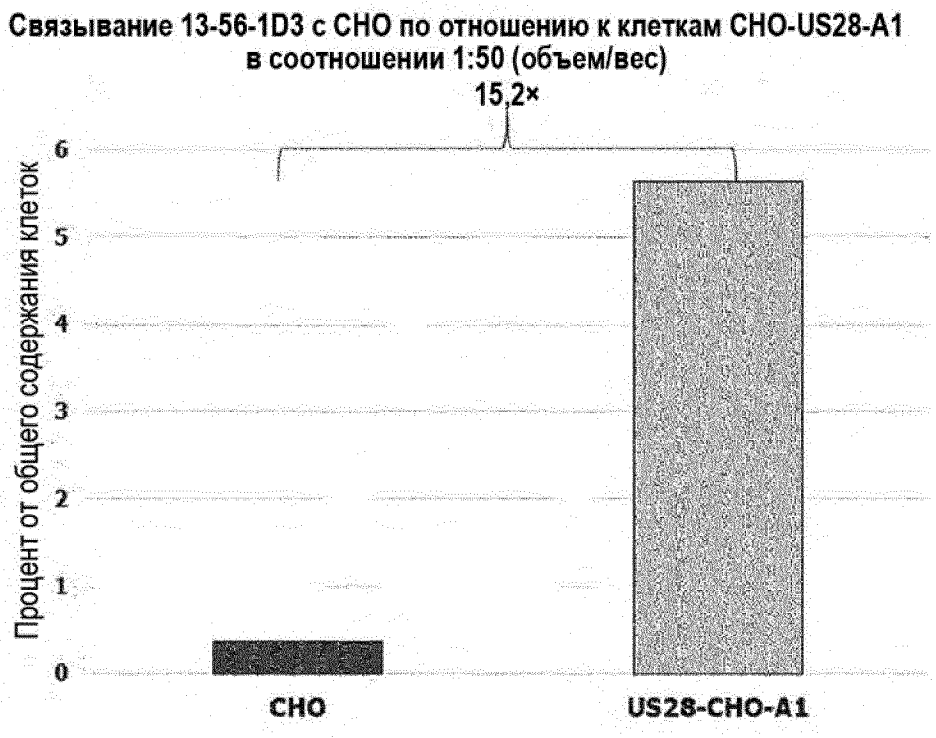


Фиг. 2

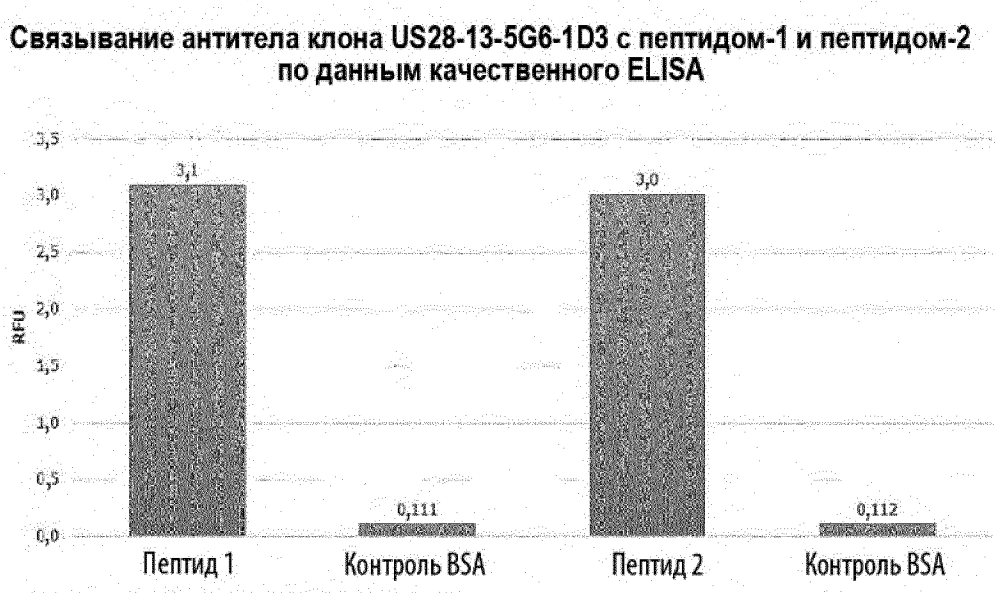
% поверхностного связывания антитела клона US28-13-5G6-1D3 на клетках CHO-US28-A1



Фиг. 4



Фиг. 5

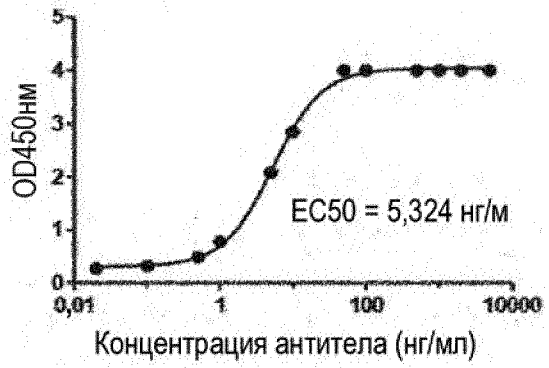


Пептид-1: TKK**N**NOCMTDYDYLEVS;
Пептид-2: TKK**D**NQCMTDYDYLEVS

Фиг. 6

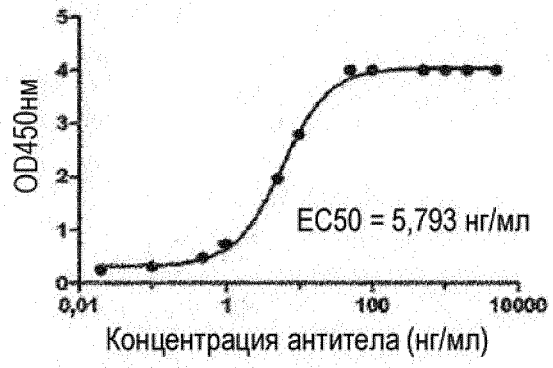
Кривая связывания US28-13-5G6-1D3 (rAb) по данным Elisa

13-5G6-1D3 (rAb) к пептиду-1

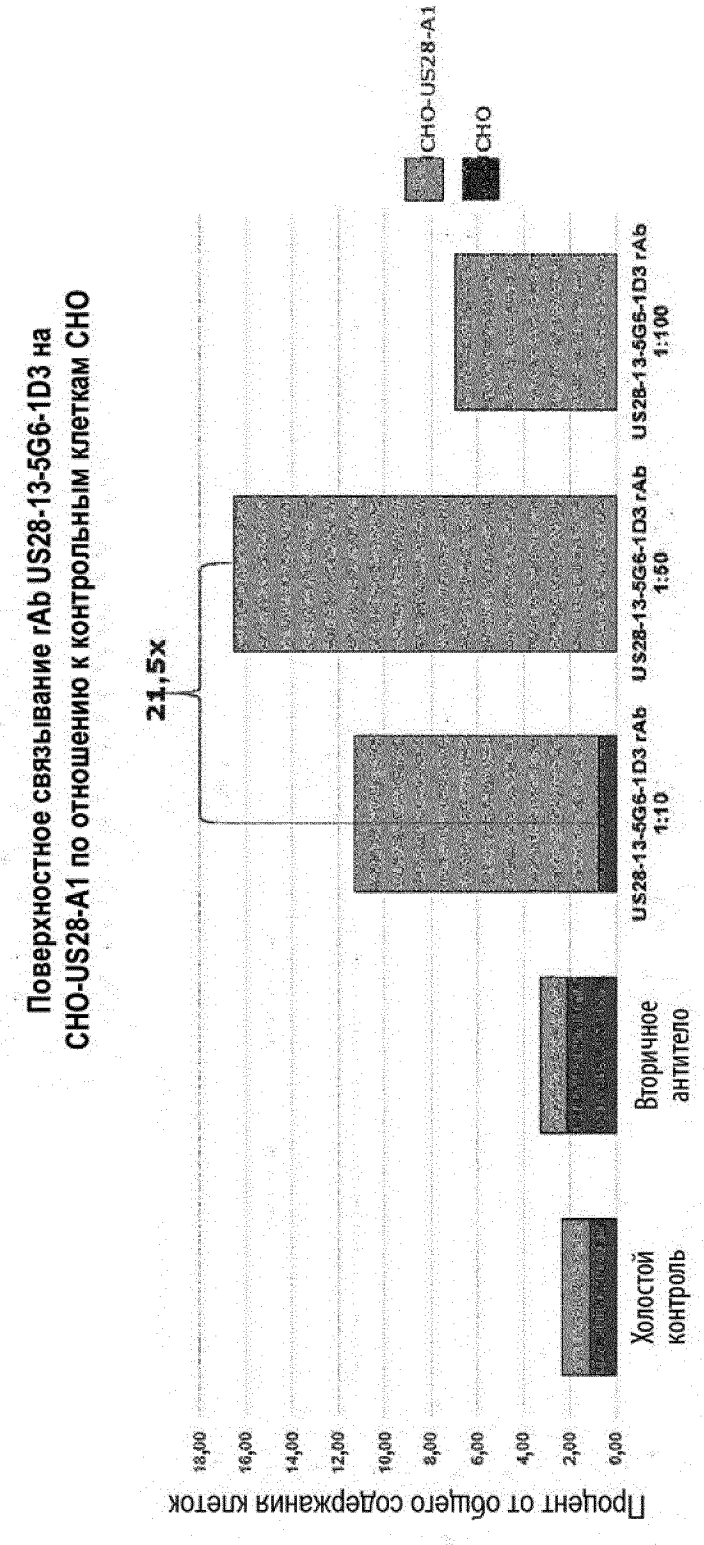


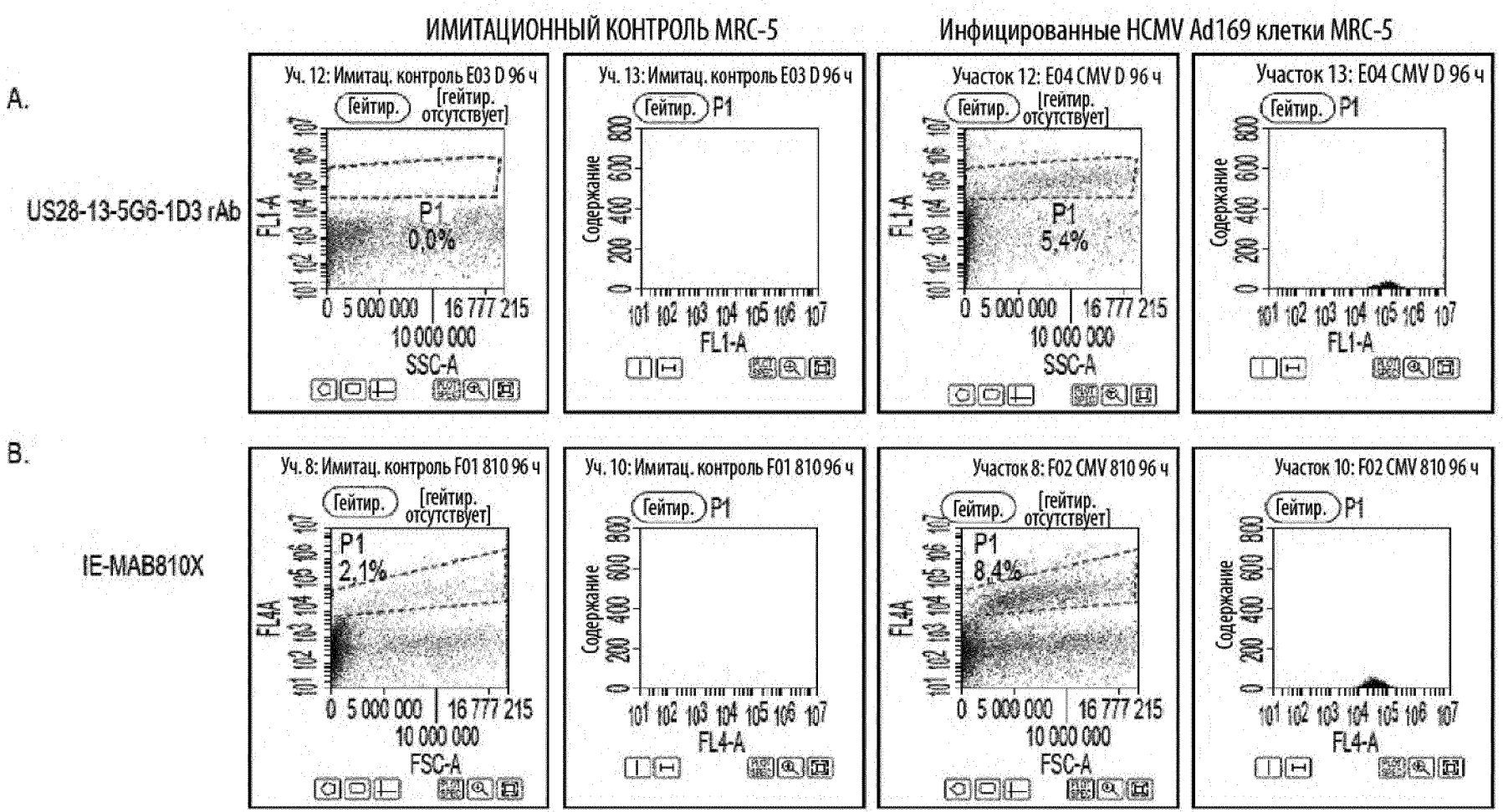
Предельное значение: 4

13-5G6-1D3 (rAb) к пептиду-2



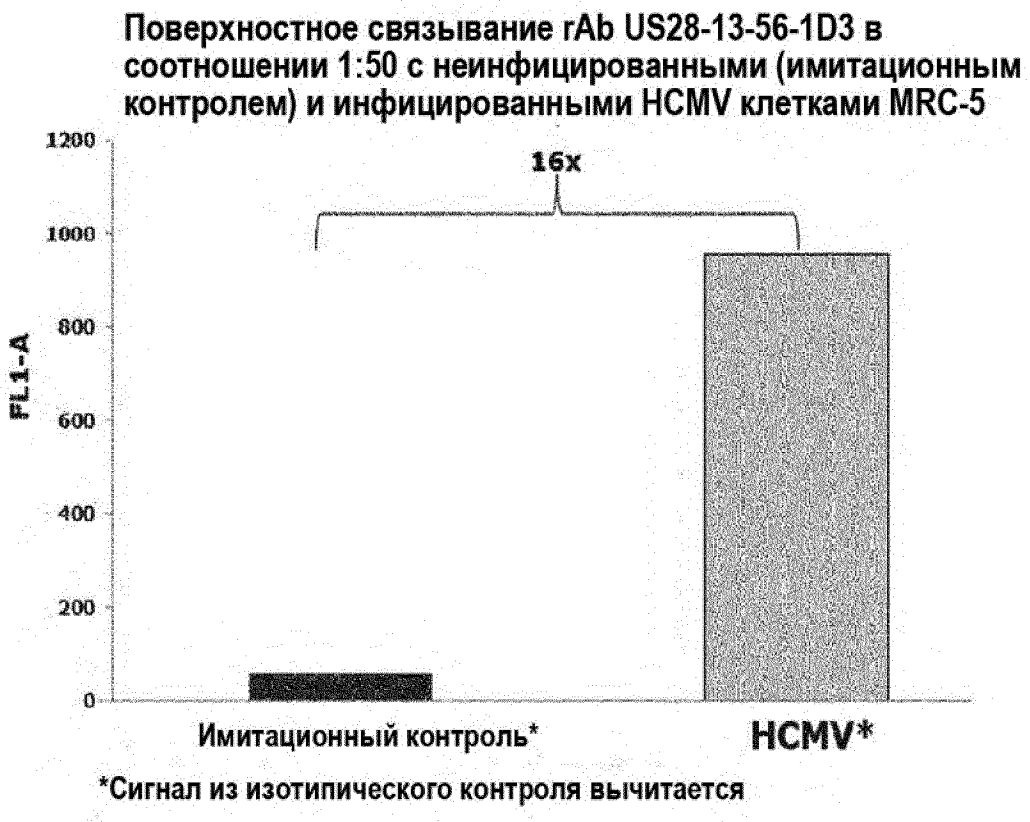
Фиг. 7

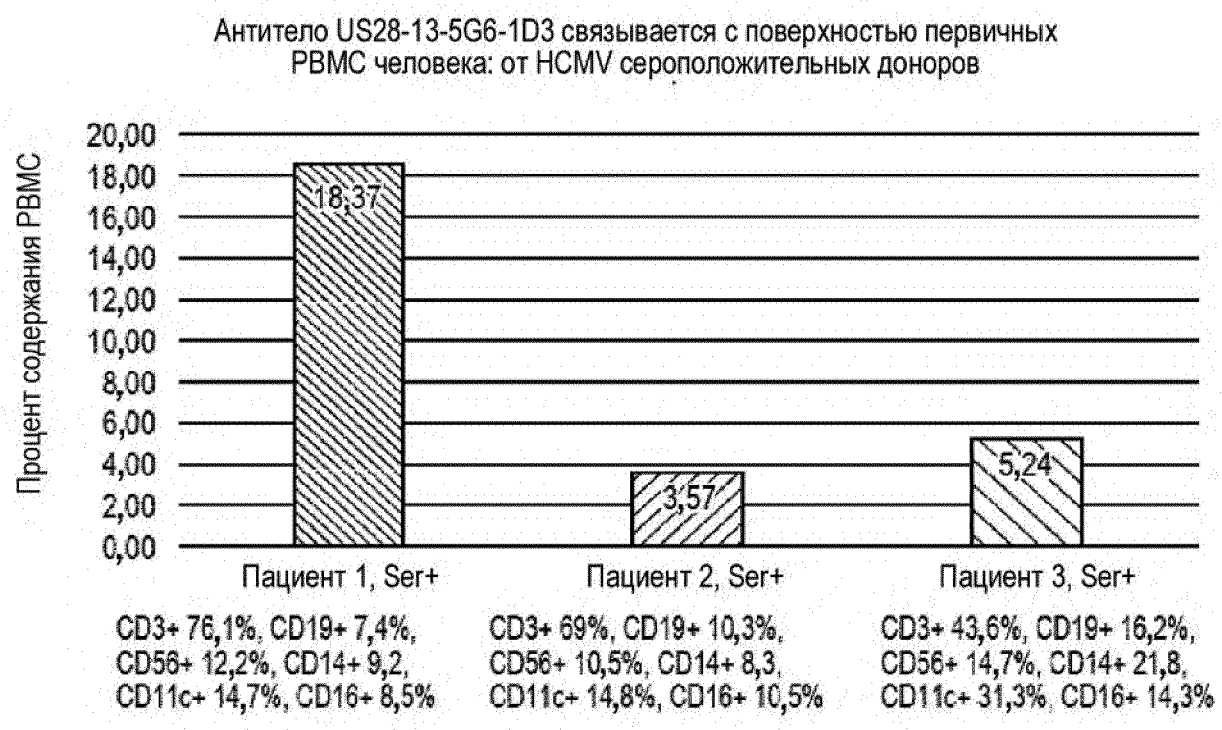

Поверхностное связывание rAb US28-13-5G6-1D3 на CHO-US28-A1 по отношению к контрольным клеткам CHO
21,5x
CHO-US28-A1
CHO
Процент от общего содержания клеток
18,00
16,00
14,00
12,00
10,00
8,00
6,00
4,00
2,00
0,00
Холостой контроль
Вторичное антитело
US28-13-5G6-1D3 rAb 1:10
US28-13-5G6-1D3 rAb 1:50
US28-13-5G5-1D3 rAb 1:100

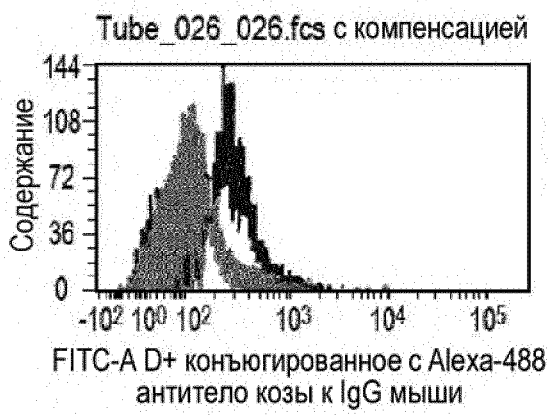

ИМИТАЦИОННЫЙ КОНТРОЛЬ MRC-5
Инфицированные HCMV Ad169 клетки MRC-5
A.
US28-13-5G6-1D3 rAb
Уч. 12: Имитац. контроль E03 D 96 ч
Гейтир.
[гейтир. отсутствует]
FL1-A
P1
0,0%
0 5 000 000 16 777 215
10 000 000
SSC-A
Уч. 13: Имитац. контроль E03 D 96 ч
Гейтир.
P1
Содержание
FL1-A
Участок 12: E04 CMV D 96 ч
Гейтир.
[гейтир. отсутствует]
FL1-A
P1
5,4%
0 5 000 000 16 777 215
10 000 000
SSC-A
Участок 13: E04 CMV D 96 ч
Гейтир.
P1
Содержание
FL1-A
B.
IE-MAB810X
Уч. 8: Имитац. контроль F01 810 96 ч
Гейтир.
[гейтир. отсутствует]
FL4A
P1
2,1%
0 5 000 000 16 777 215
10 000 000
FSC-A
Уч. 10: Имитац. контроль F01 810 96 ч
Гейтир.
P1
Содержание
FL4-A
Участок 8: F02 CMV 810 96 ч
Гейтир.
[гейтир. отсутствует]
FL4A
P1
8,4%
0 5 000 000 16 777 215
10 000 000
FSC-A
Участок 10: F02 CMV 810 96 ч
Гейтир.
P1
Содержание
FL4-A

Фиг. 8

Фиг. 9


Поверхностное связывание rAb US28-13-56-1D3 в соотношении 1:50 с неинфицированными (имитационным контролем) и инфицированными HCMV клетками MRC-5
16x
FL1-A
1200
1000
800
600
400
200
0
Имитационный контроль*
HCMV*
*Сигнал из изотипического контроля вычитается

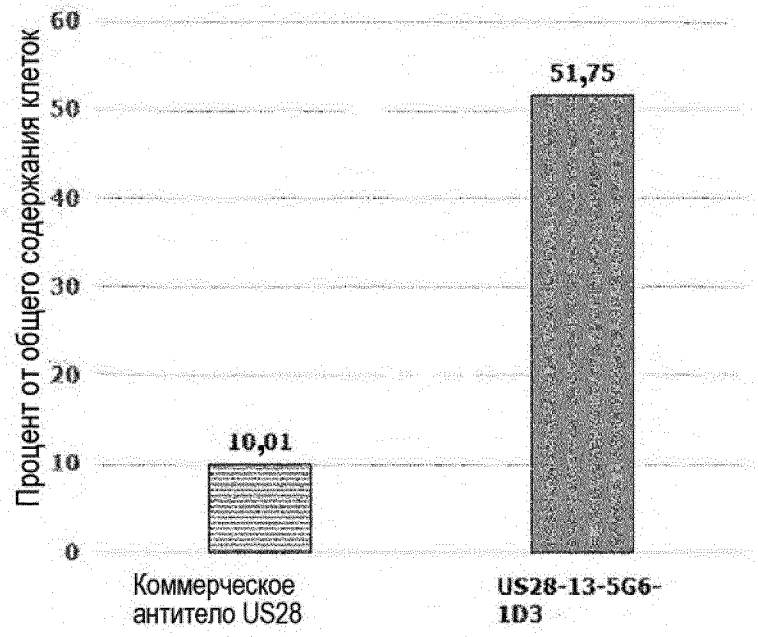

Антитело US28-13-5G6-1D3 связывается с поверхностью первичных PBMC человека: от HCMV сероположительных доноров
Процент содержания PBMC
20,00
18,00
16,00
14,00
12,00
10,00
8,00
6,00
4,00
2,00
0,00
18,37
3,57
5,24
Пациент 1, Ser+
Пациент 2, Ser+
Пациент 3, Ser+
CD3+ 76,1%, CD19+ 7,4%, CD56+ 12,2%, CD14+ 9,2, CD11c+ 14,7%, CD16+ 8,5%
CD3+ 69%, CD19+ 10,3%, CD56+ 10,5%, CD14+ 8,3, CD11c+ 14,8%, CD16+ 10,5%
CD3+ 43,6%, CD19+ 16,2%, CD56+ 14,7%, CD14+ 21,8, CD11c+ 31,3%, CD16+ 14,3%


Tube_026_026.fcs с компенсацией
Содержание
144
108
72
36
0
-10² 10⁰ 10² 10³ 10⁴ 10⁵
FITC-A D+ конъюгированное с Alexa-488 антитело козы к IgG мыши

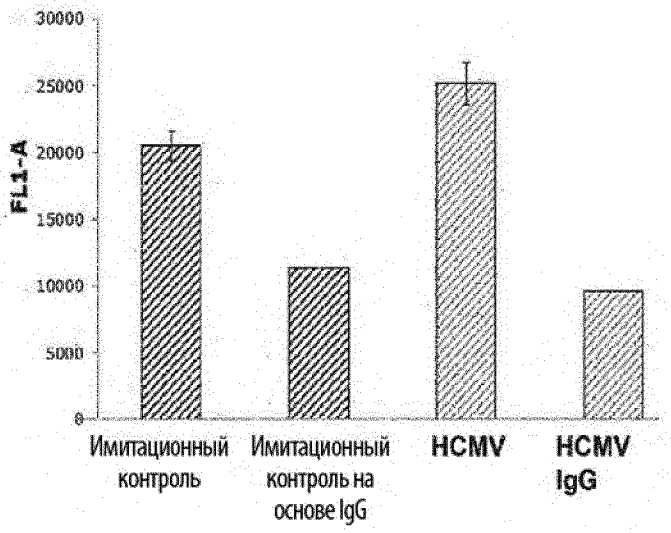
Фиг. 10

Фиг. 11

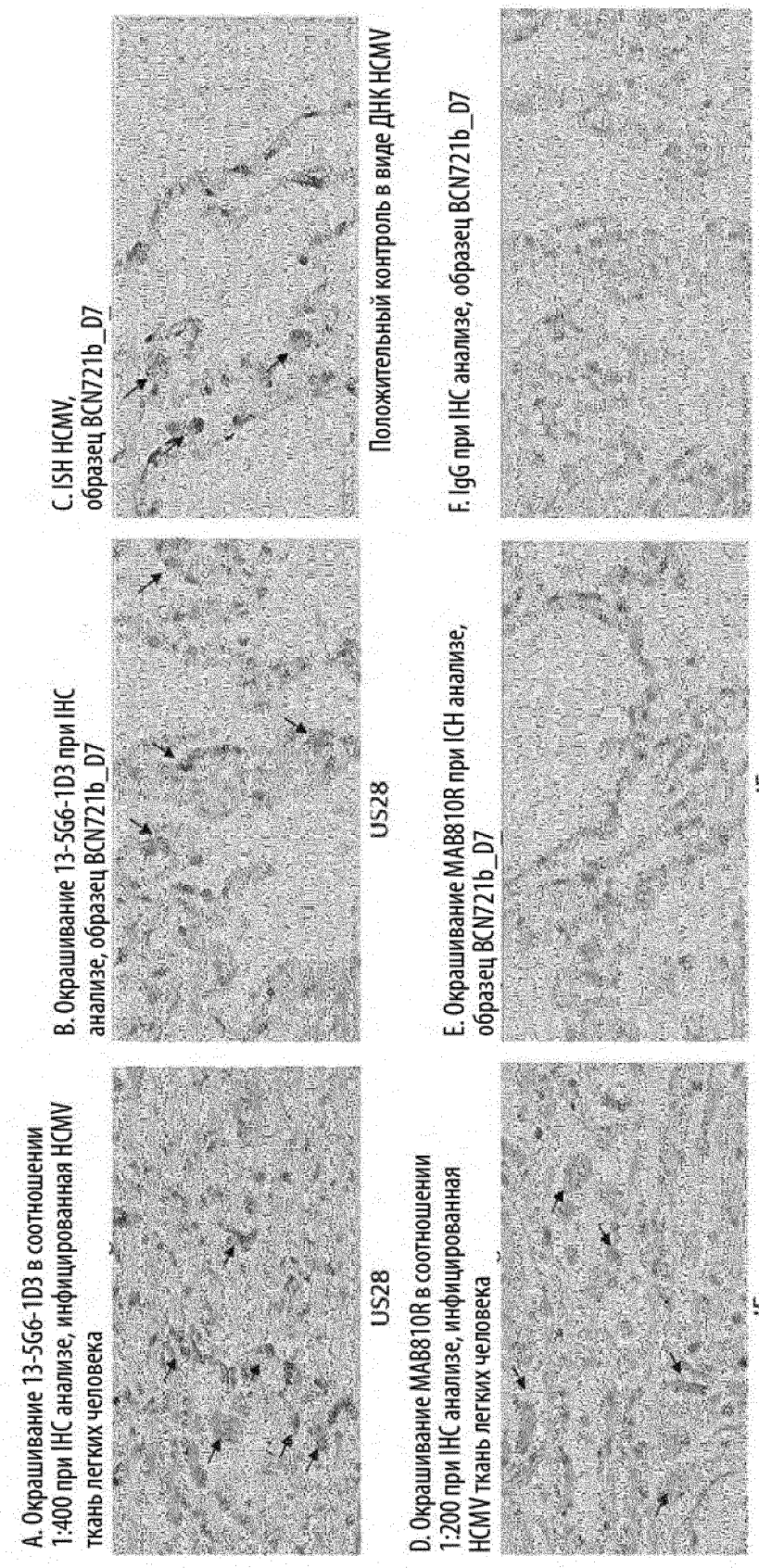
A. Поверхностное связывание с клетками CHO-US28-A1



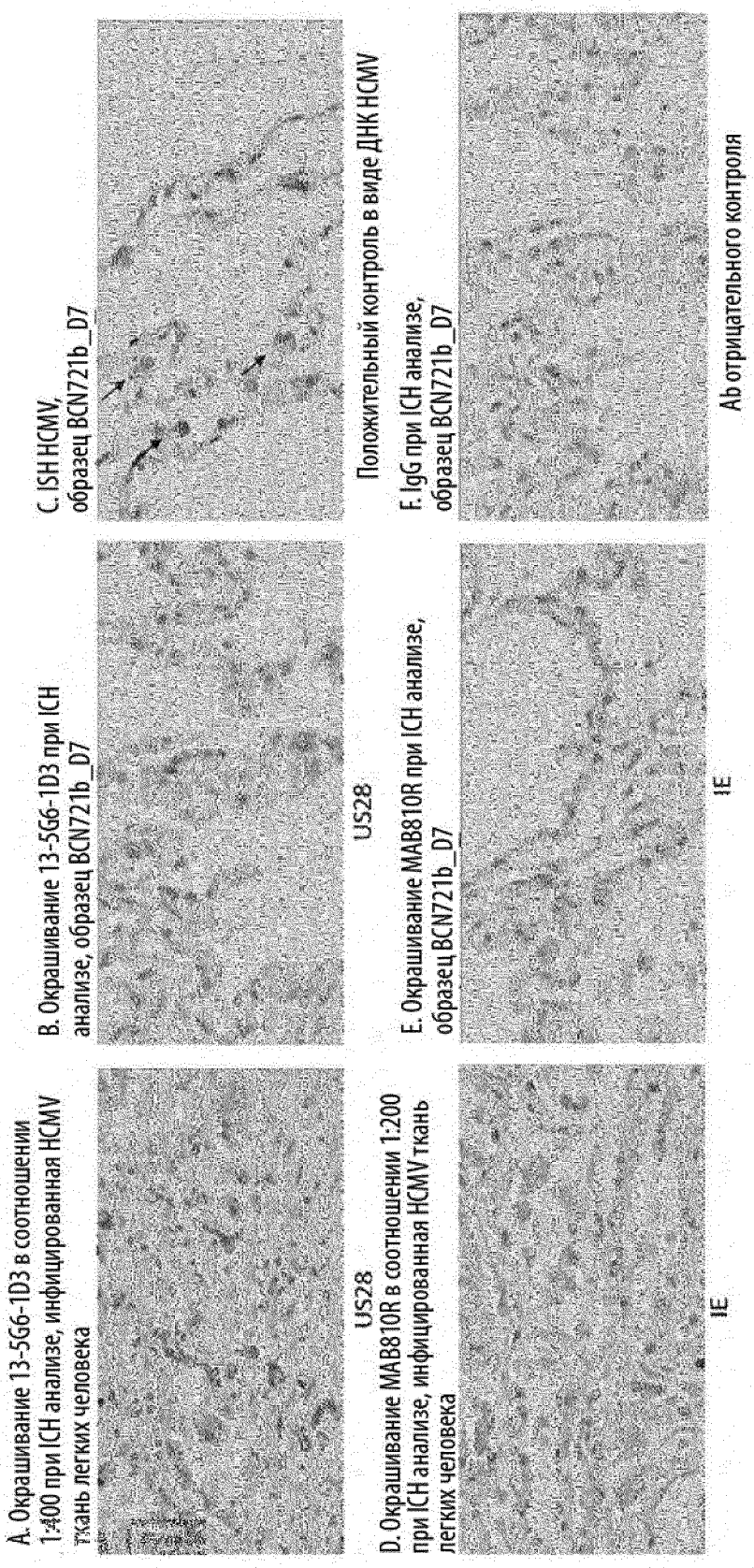
B. Поверхностное связывание коммерческого антитела US28 с клетками MRC-5, инфицированными HCMV Ad169



Фиг. 12


A. Окрашивание 13-5G6-1D3 в соотношении 1:400 при IHC анализе, инфицированная HCMV ткань легких человека
US28
B. Окрашивание 13-5G6-1D3 при IHC анализе, образец BCN721b_D7
US28
C. ISH HCMV, образец BCN721b_D7
Положительный контроль в виде ДНК HCMV
D. Окрашивание MAB810R в соотношении 1:200 при IHC анализе, инфицированная HCMV ткань легких человека
IE
E. Окрашивание MAB810R при ICH анализе, образец BCN721b_D7
IE
F. IgG при IHC анализе, образец BCN721b_D7
Ab отрицательного контроля

Фиг. 12 (продолжение); в цвете



Трижды негативный рак молочной железы: образец BR1008b_D5

A. Окрашивание 13-5G6-1D3 при ICH анализе

US28

B. Окрашивание MAB810R при ICH анализе

IE

C. ISH HCMV

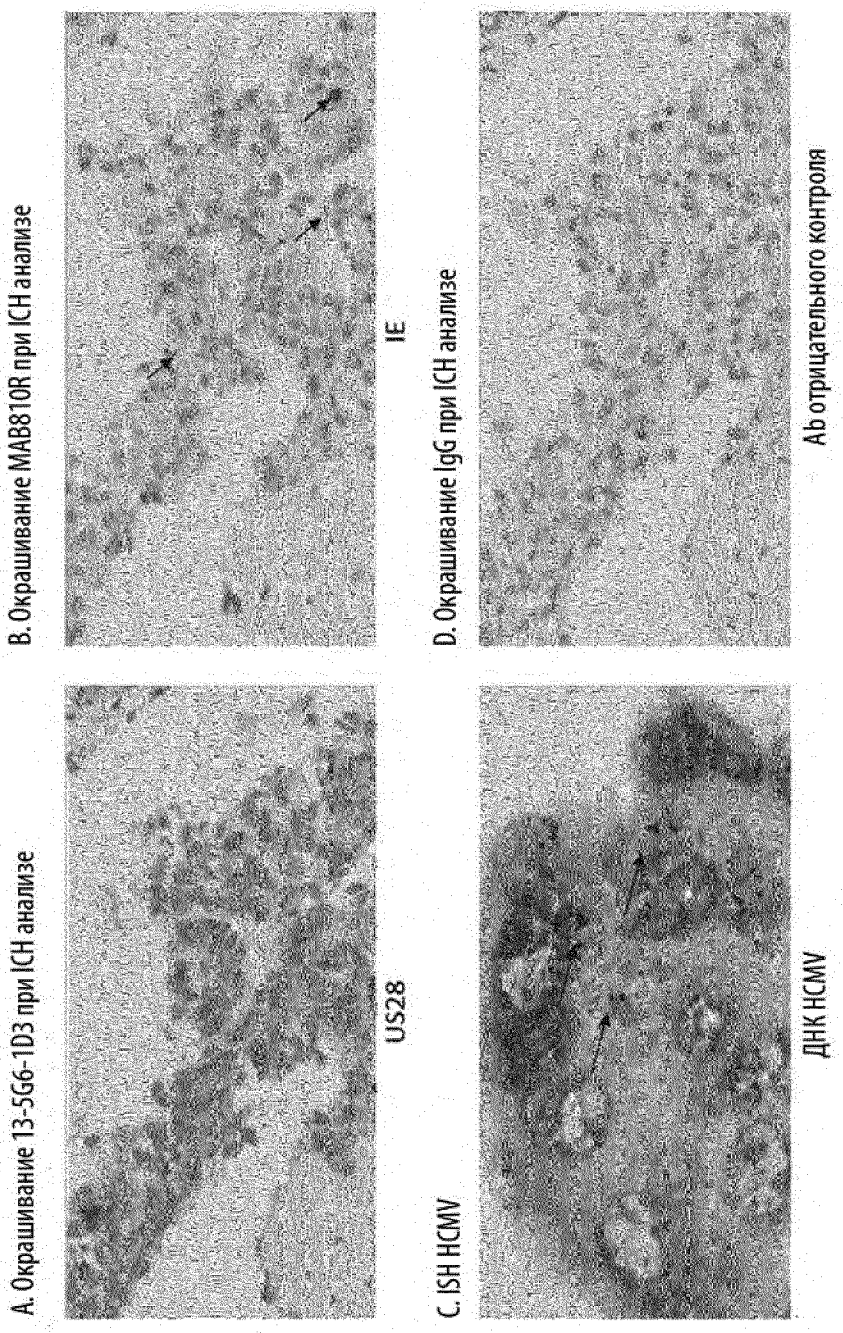
ДНК HCMV

D. Окрашивание IgG при ICH анализе

Ab отрицательного контроля

Фиг. 13

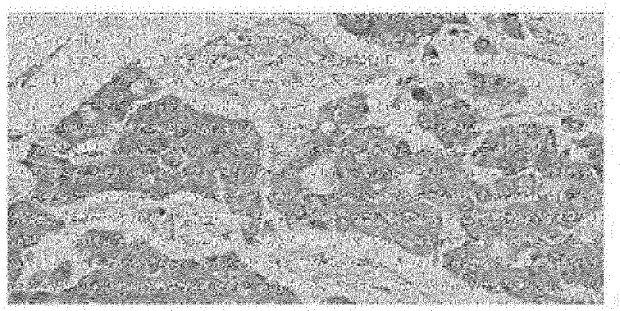
Фиг. 13 (продолжение); в цвете



Трижды негативный рак молочной железы: образец BR1008b_D5

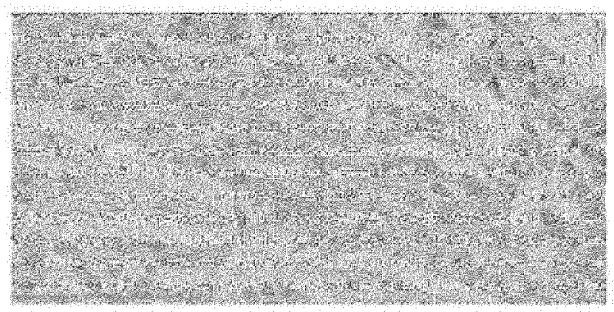
Метастаз HER2-положительного рака молочной железы: образец BR1008b_H6

A. Окрашивание 1D3 при ICH анализе



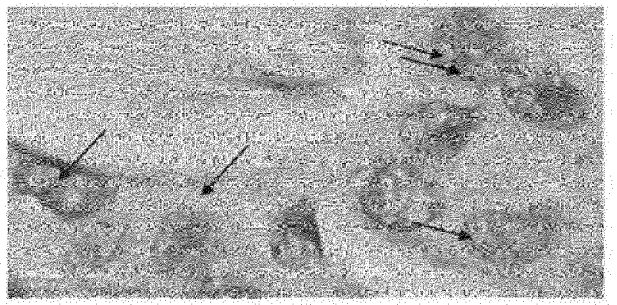
US28

B. Окрашивание MAB810R при ICH анализе



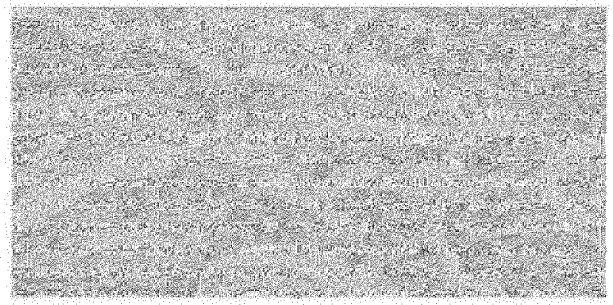
IE

C. ISH HCMV



ДНК HCMV

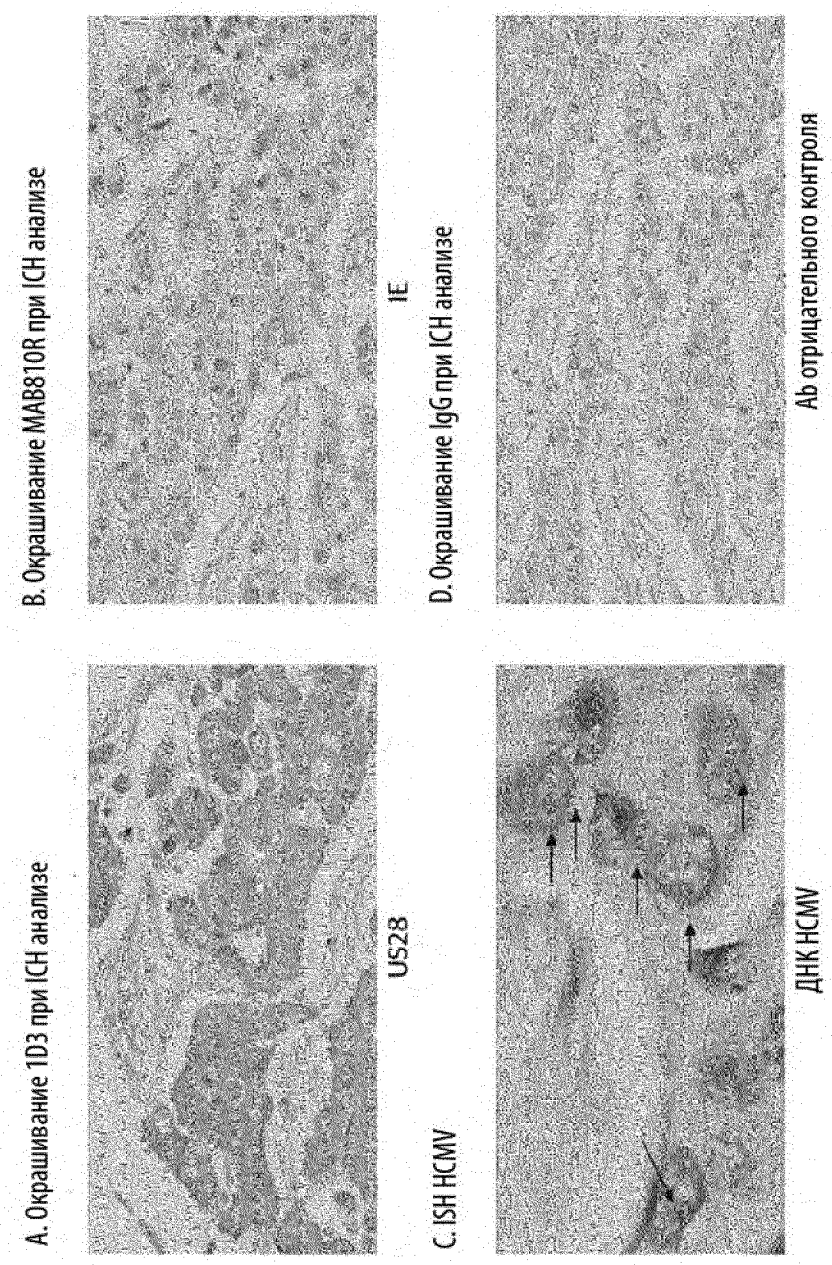
D. Окрашивание IgG при ICH анализе



Ab отрицательного контроля

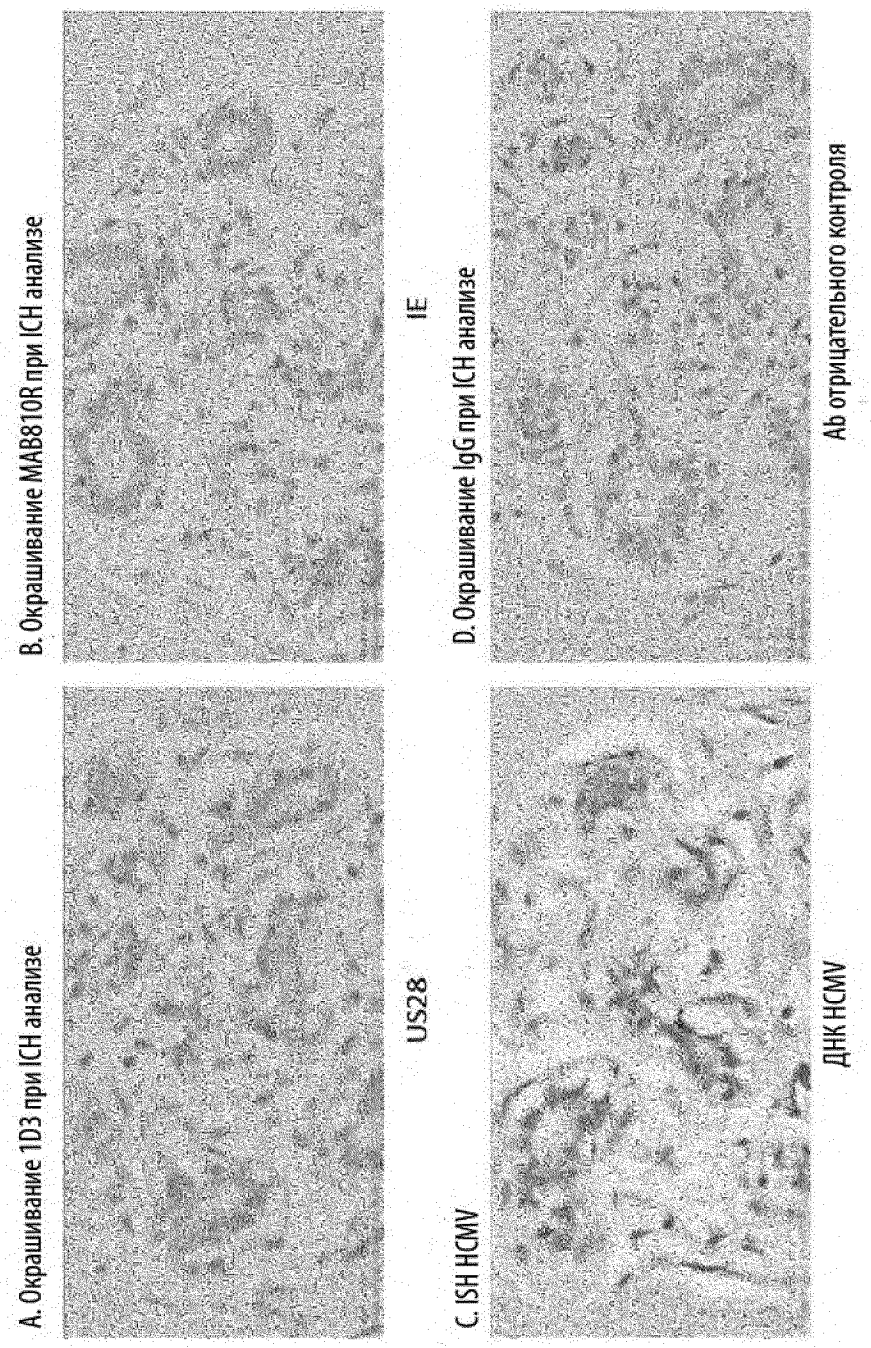
Фиг. 14

Фиг. 14 (продолжение); в цвете

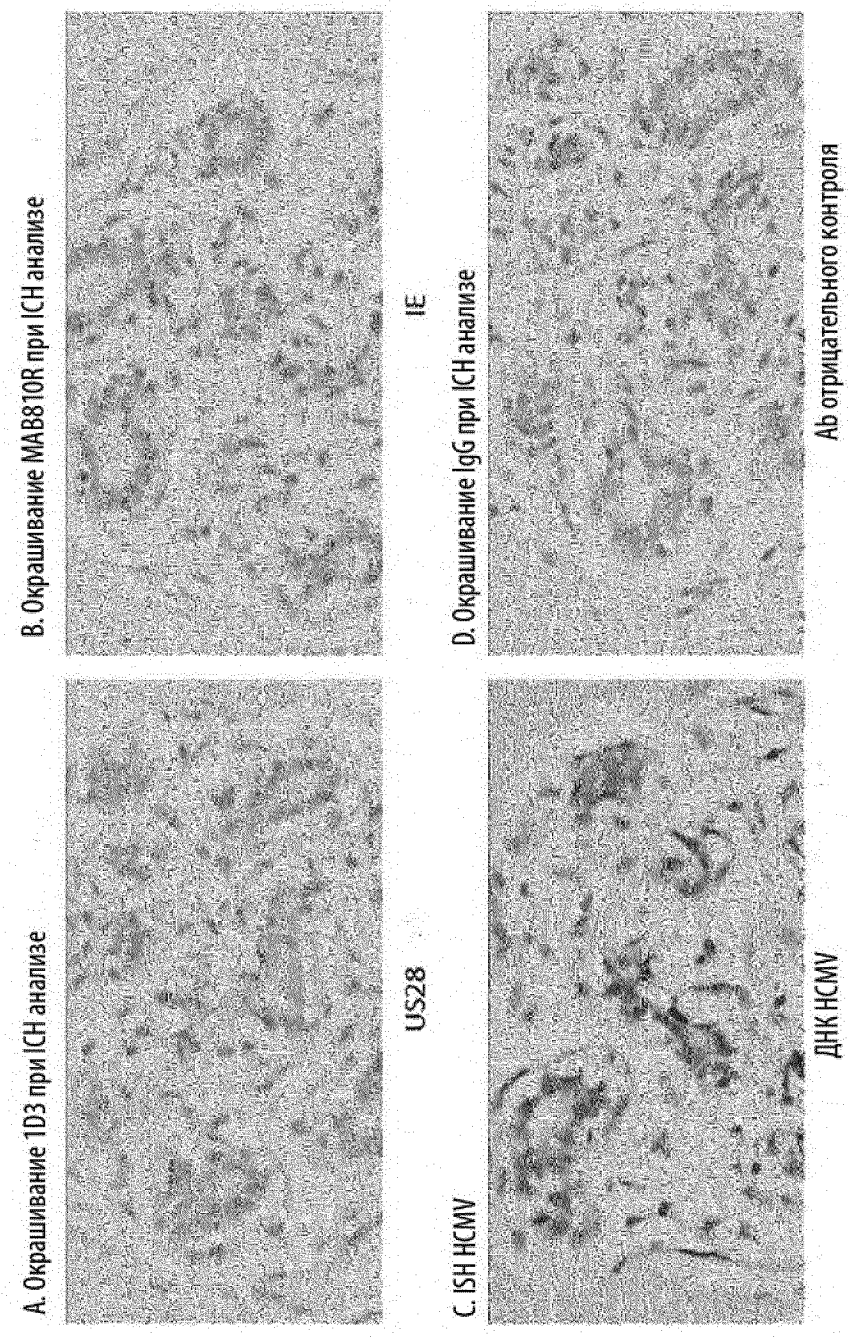


Метастаз HER2-положительного рака молочной железы: образец BR1008b_H6

Фиг. 15

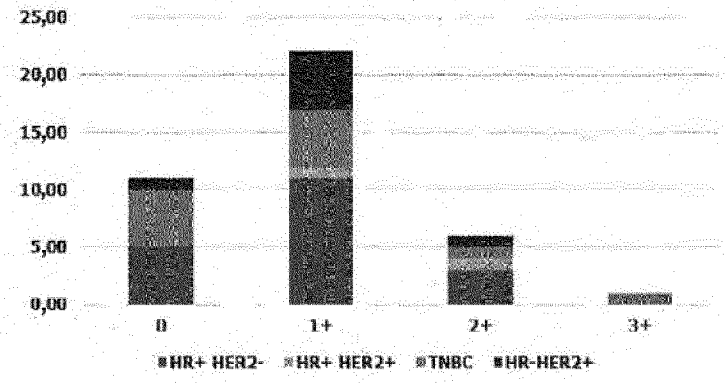

NAT молочной железы:
образец BR1008b_J6
A. Окрашивание 1D3 при ICH анализе
US28
B. Окрашивание MAB810R при ICH анализе
IE
C. ISH HCMV
ДНК HCMV
D. Окрашивание IgG при ICH анализе
Ab отрицательного контроля

Фиг. 15 (продолжение); в цвете



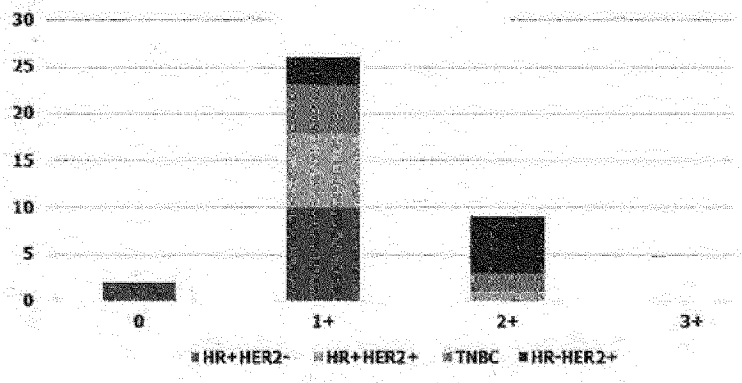
Фиг. 16

A. Интенсивность окрашивания US28-13-56-1D3 в опухолях молочной железы, n = 40



US28	0	1+	2+	3+
HR+ HER2	5,00	11,00	3,00	0,00
HR+ HER2+	0,00	1,00	1,00	0,00
TNBC	5,00	5,00	1,00	1,00
HR-HER2+	1,00	5,00	1,00	0,00

B. Интенсивность окрашивания US28-13-5G6-1D3 в метастазах при BC, n = 37



US28	0	1+	2+	3+
HR+HER2-	2	10	0	0
HR+HER2+	0	8	1	0
TNBC	0	5	2	0
HR-HER2+	0	3	6	0

Фиг. 16 (продолжение)

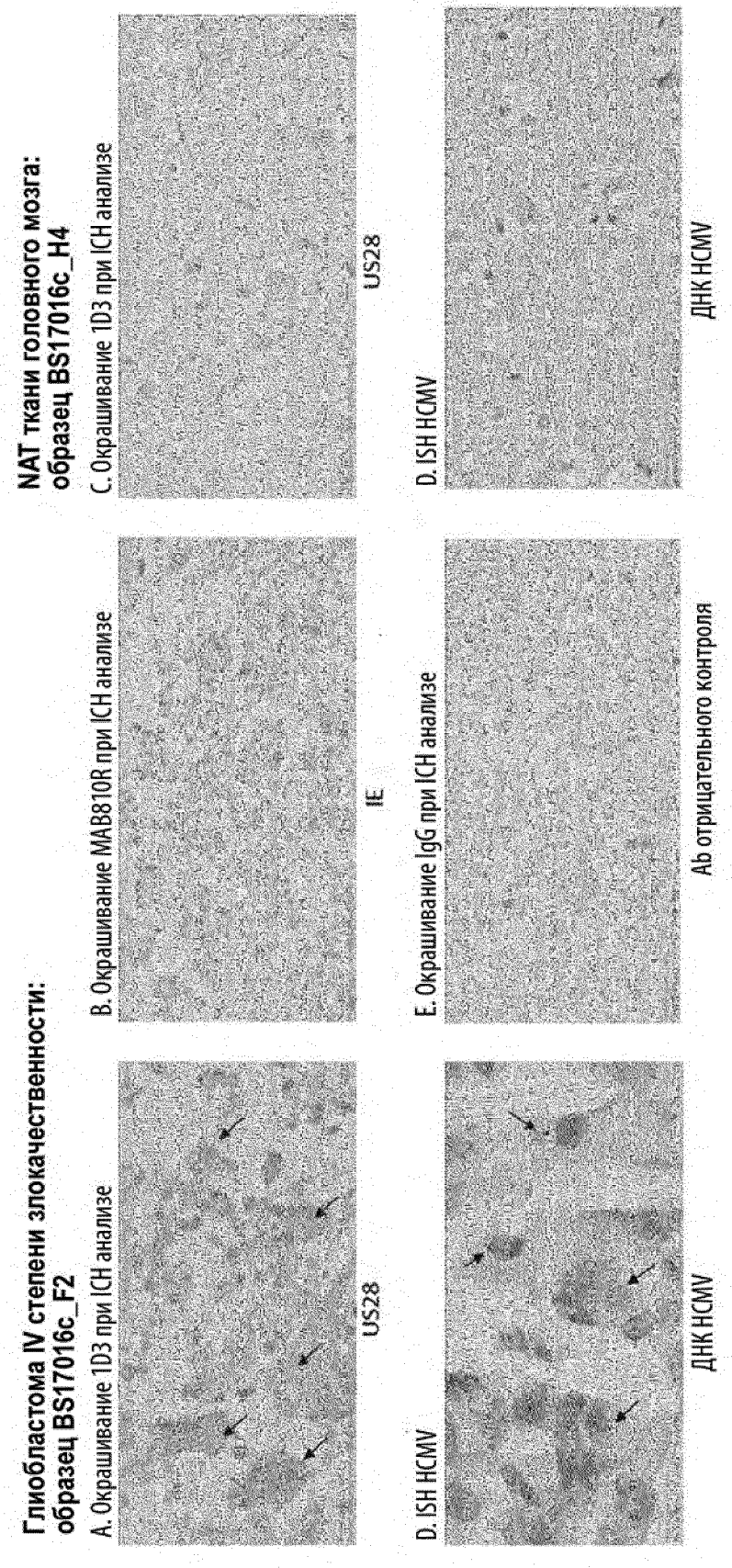
A.

US28	0	1+	2+	3+
HR+HER2-	5	13	3	
HER2+	1	6	2	
TNBC	4	5	1	1

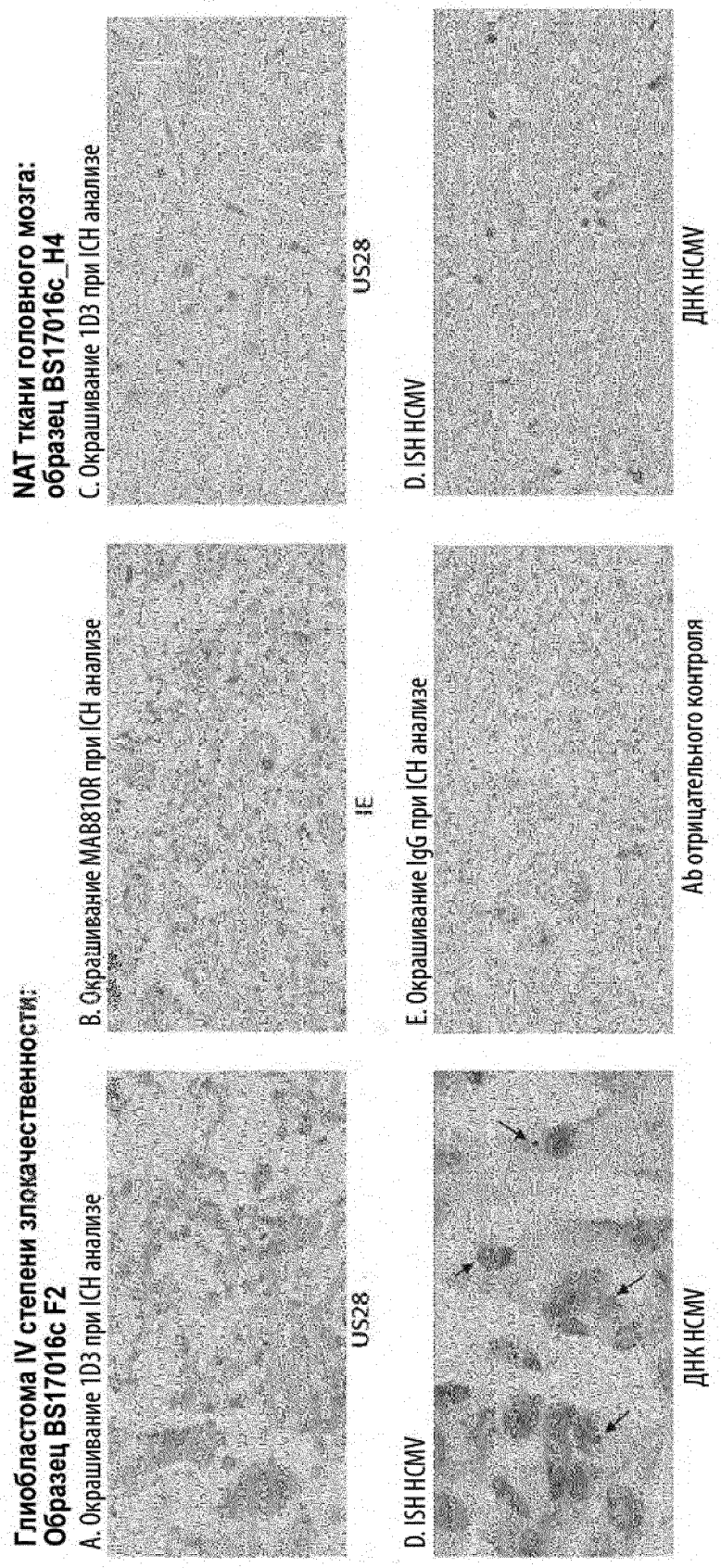
B.

US28	0	1+	2+
HR+HER2-	2	8	1
HER2+	0	5	6
TNBC	0	6	2

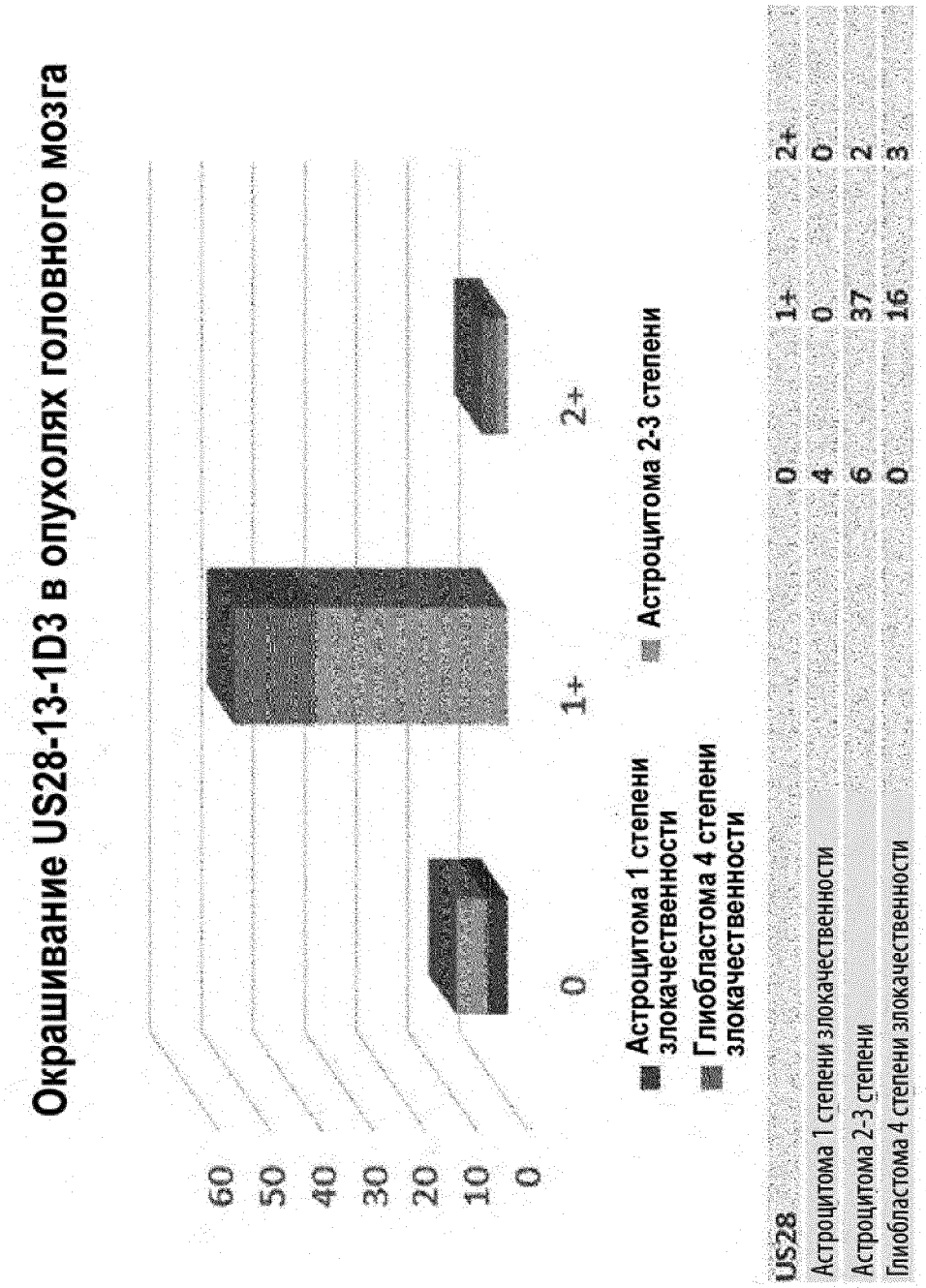
Фиг. 17


Глиобластома IV степени злокачественности:
образец BS17016c_F2
A. Окрашивание 1D3 при ICH анализе
US28
B. Окрашивание MAB810R при ICH анализе
IE
NAT ткани головного мозга:
образец BS17016c_H4
C. Окрашивание 1D3 при ICH анализе
US28
D. ISH HCMV
ДНК HCMV
E. Окрашивание IgG при ICH анализе
Ab отрицательного контроля
D. ISH HCMV
ДНК HCMV

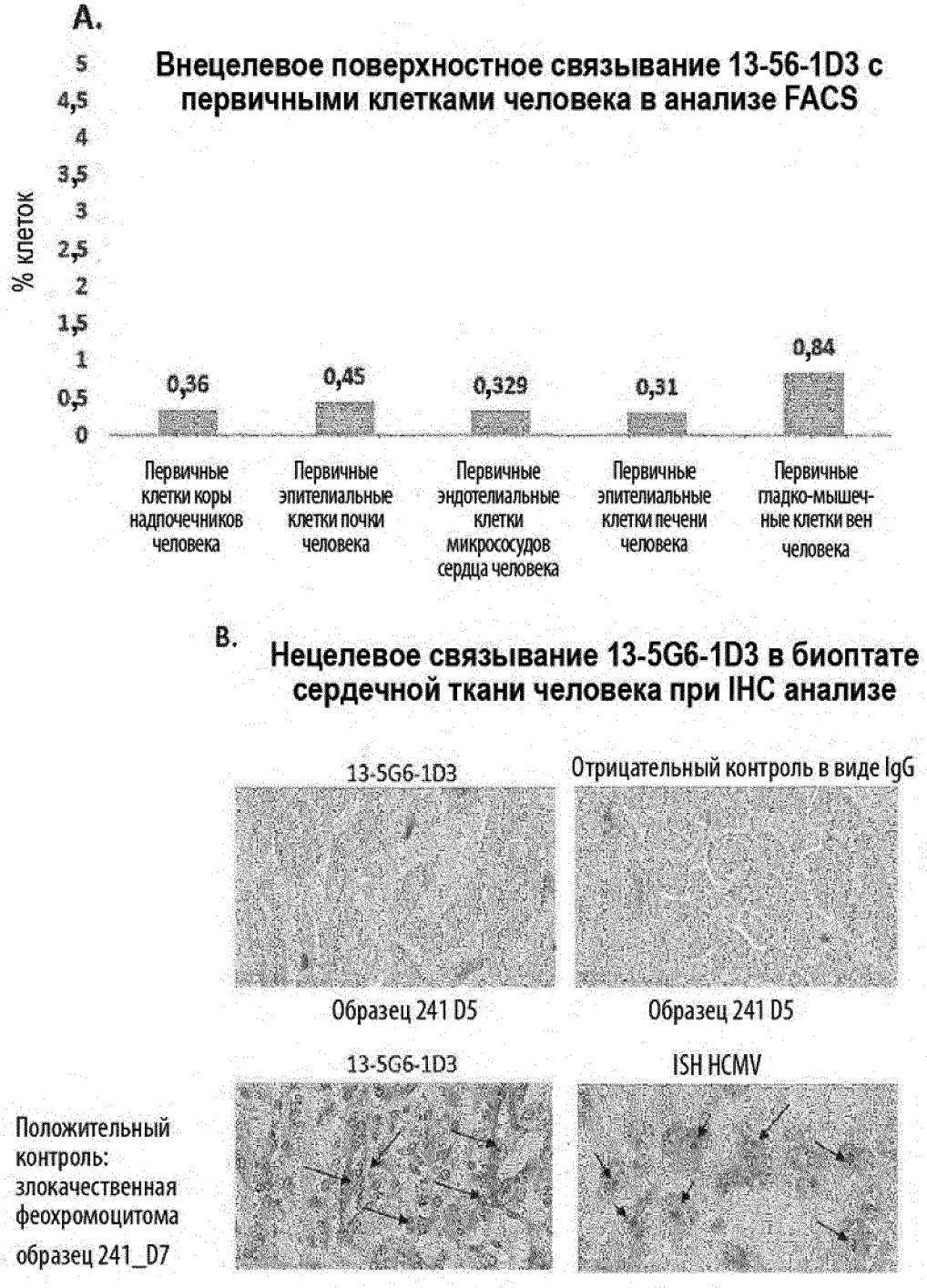
Фиг. 17 (продолжение); в цвете



Фиг. 18


Окрашивание US28-13-1D3 в опухолях головного мозга
60
50
40
30
20
10
0
0
1+
2+
Астроцитома 1 степени злокачественности
Глиобластома 4 степени злокачественности
Астроцитома 2-3 степени
US28 0 1+ 2+
Астроцитома 1 степени злокачественности 4 0 0
Астроцитома 2-3 степени 6 37 2
Глиобластома 4 степени злокачественности 0 16 3

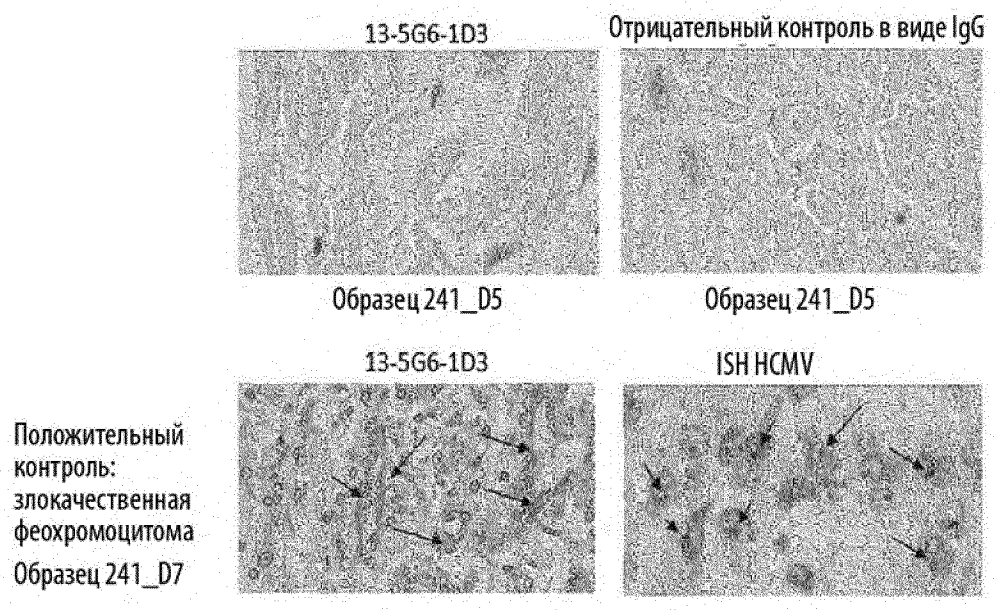
Фиг. 19


A.
Внецелевое поверхностное связывание 13-56-1D3 с первичными клетками человека в анализе FACS
% клеток
5
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0,36
0,45
0,329
0,31
0,84
Первичные клетки коры надпочечников человека
Первичные эпителиальные клетки почки человека
Первичные эндотелиальные клетки микрососудов сердца человека
Первичные эпителиальные клетки печени человека
Первичные гладко-мышечные клетки вен человека
B.
Нецелевое связывание 13-5G6-1D3 в биоптате сердечной ткани человека при IHC анализе
13-5G6-1D3
Отрицательный контроль в виде IgG
Образец 241 D5
Образец 241 D5
Положительный контроль: злокачественная феохромоцитома образец 241_D7
13-5G6-1D3
ISH HCMV

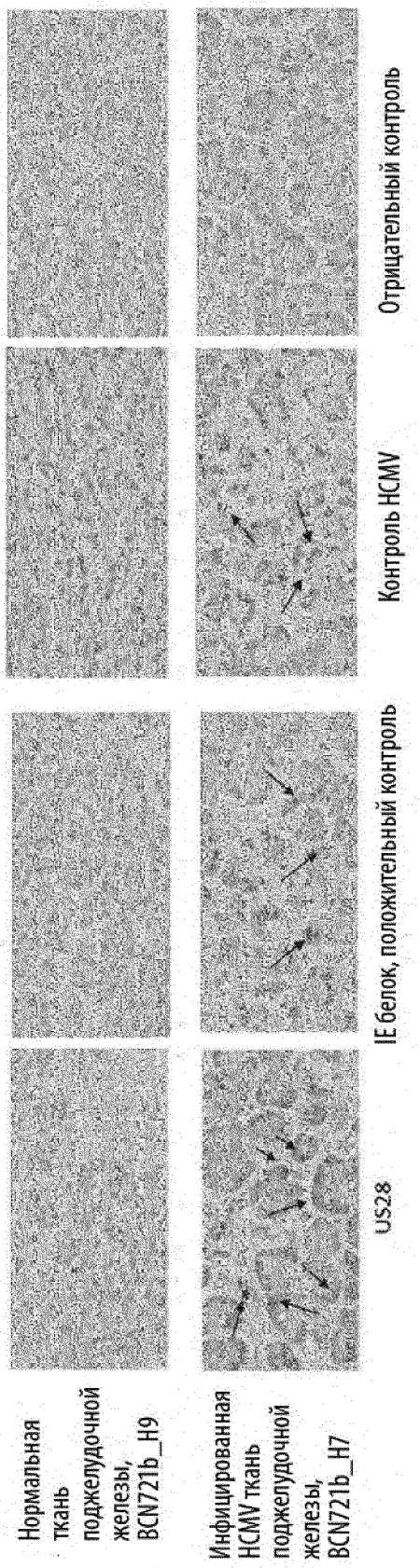
Фиг. 19 (продолжение); в цвете

B.

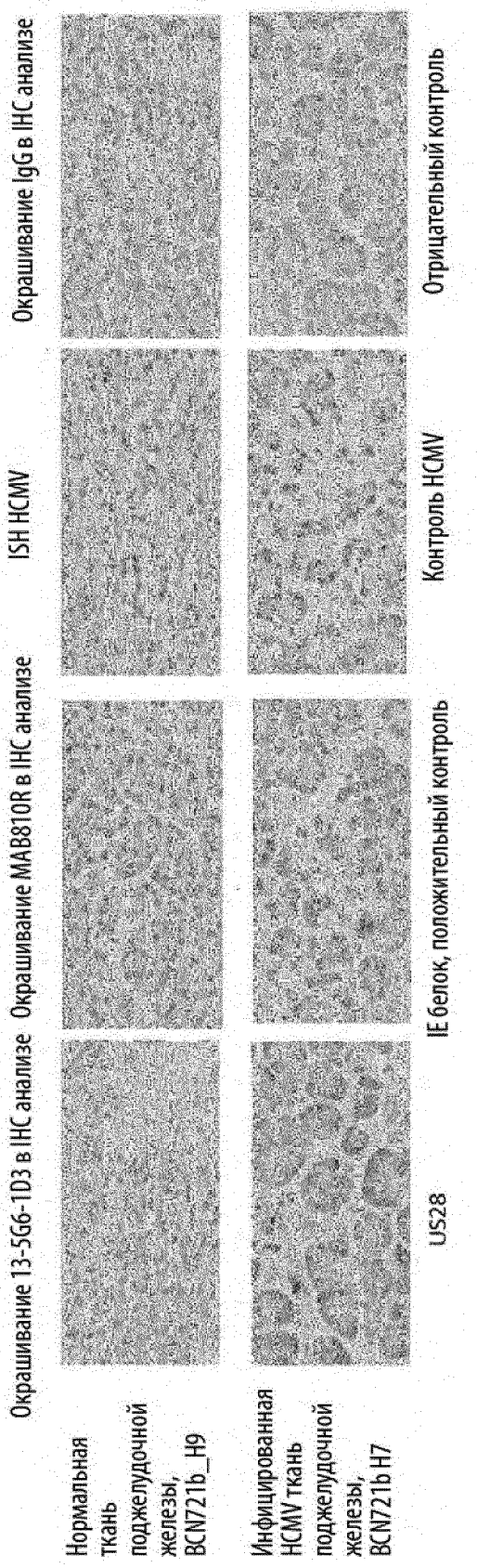
Нецелевое связывание 13-5G6-1D3 в биоптате сердечной ткани человека при IHC анализе



Фиг. 20

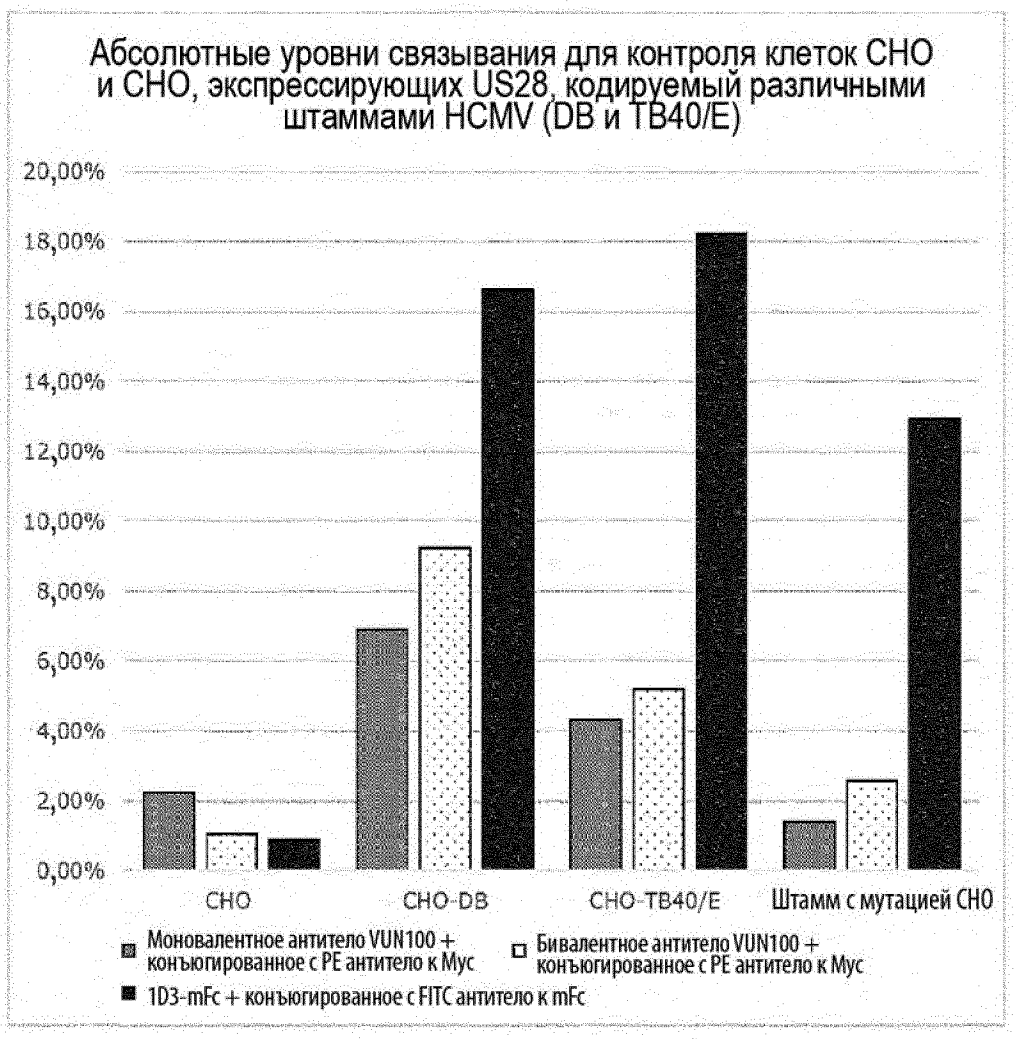

Окрашивание 13-5G6-1D3 в IHC анализе
Окрашивание MAB810R в IHC анализе
ISH HCMV
Окрашивание IgG в IHC анализе
Нормальная ткань поджелудочной железы, BCN721b_H9
Инфицированная HCMV ткань поджелудочной железы, BCN721b_H7
US28
IE белок, положительный контроль
Контроль HCMV
Отрицательный контроль

Фиг. 20 (продолжение); в цвете



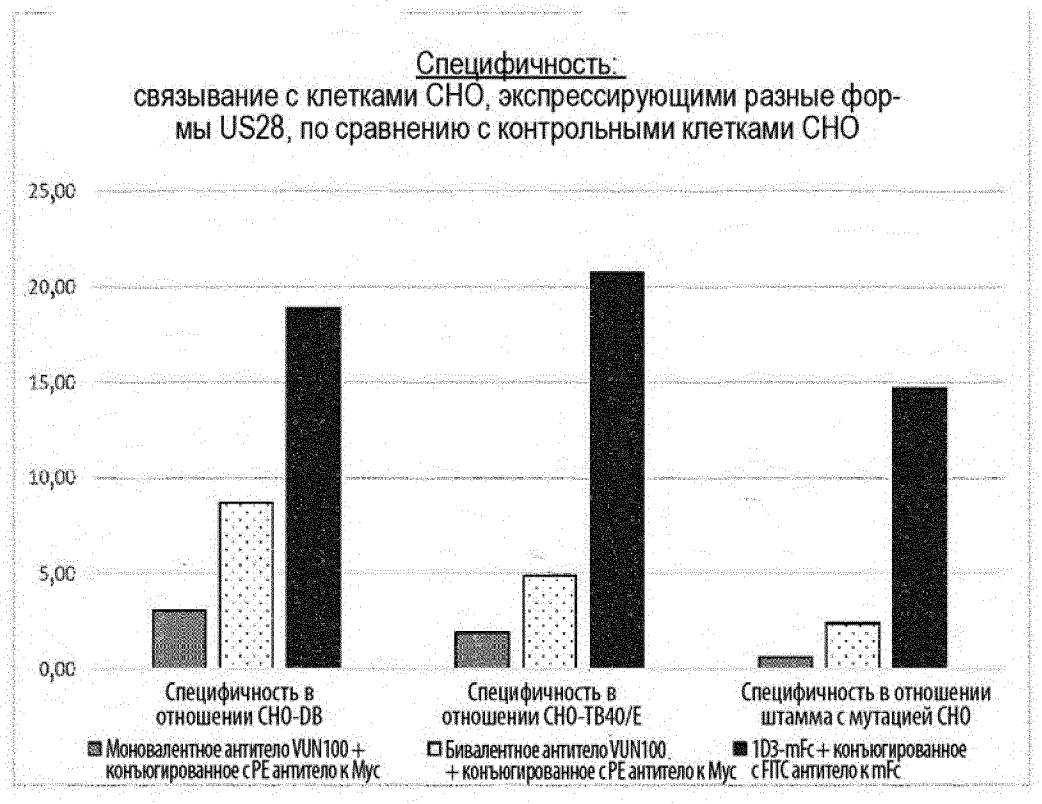
Фиг. 21

A.

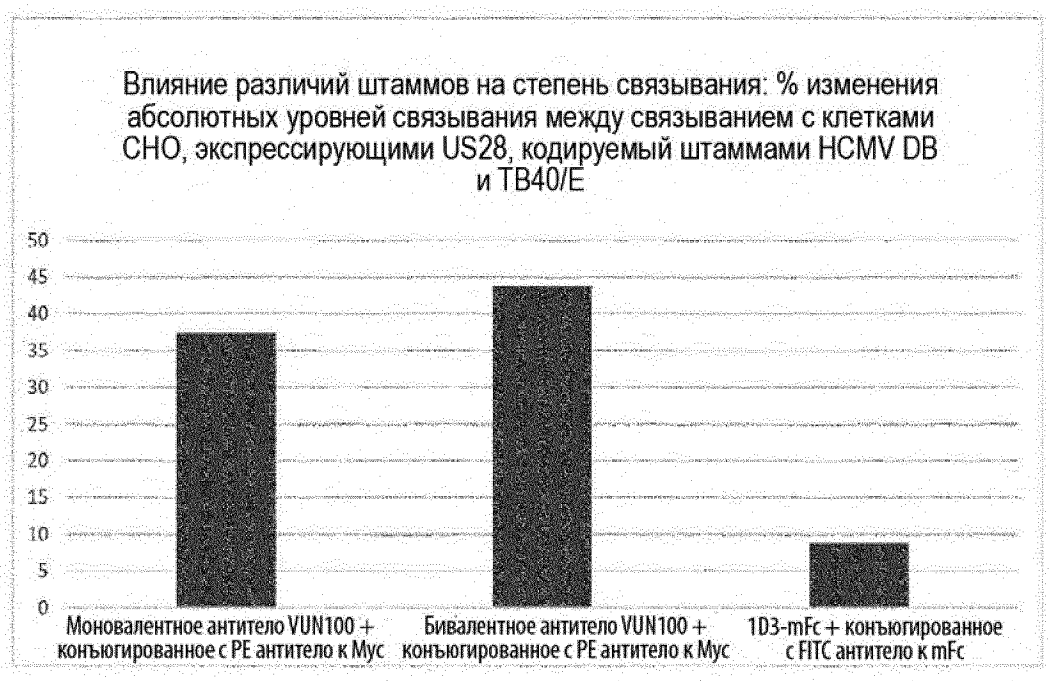

Абсолютные уровни связывания для контроля клеток CHO и CHO, экспрессирующих US28, кодируемый различными штаммами HCMV (DB и TB40/E)
20,00%
18,00%
16,00%
14,00%
12,00%
10,00%
8,00%
6,00%
4,00%
2,00%
0,00%
CHO
CHO-DB
CHO-TB40/E
Штамм с мутацией CHO
Моновалентное антитело VUN100 + конъюгированное с PE антитело к Myc
Бивалентное антитело VUN100 + конъюгированное с PE антитело к Myc
1D3-mFc + конъюгированное с FITC антитело к mFc

Фиг. 21 (продолжение)

B.

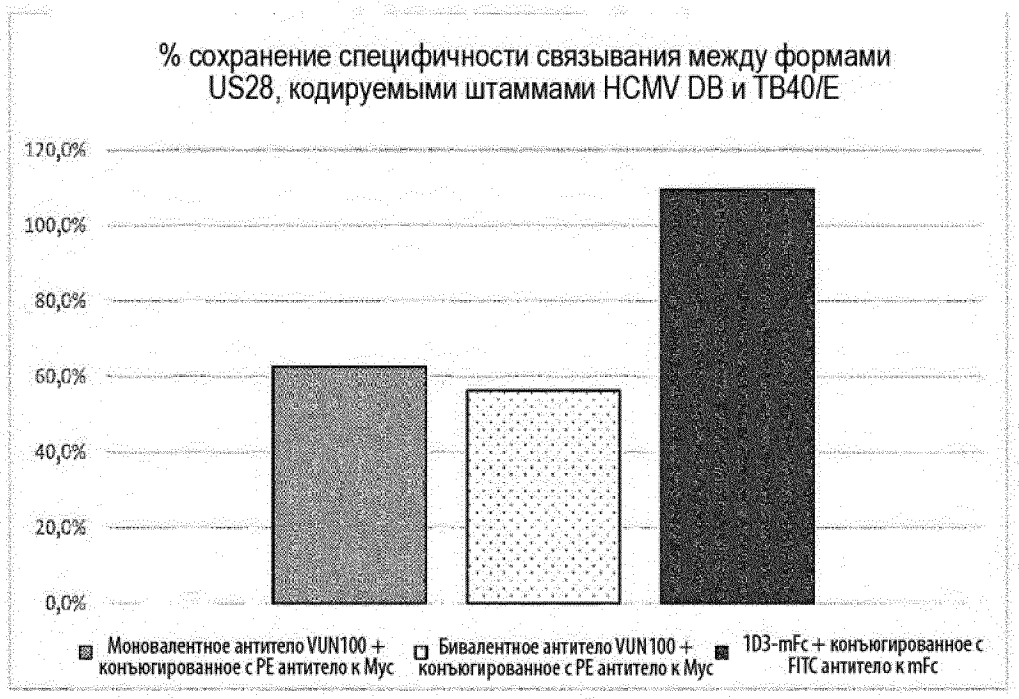


C.

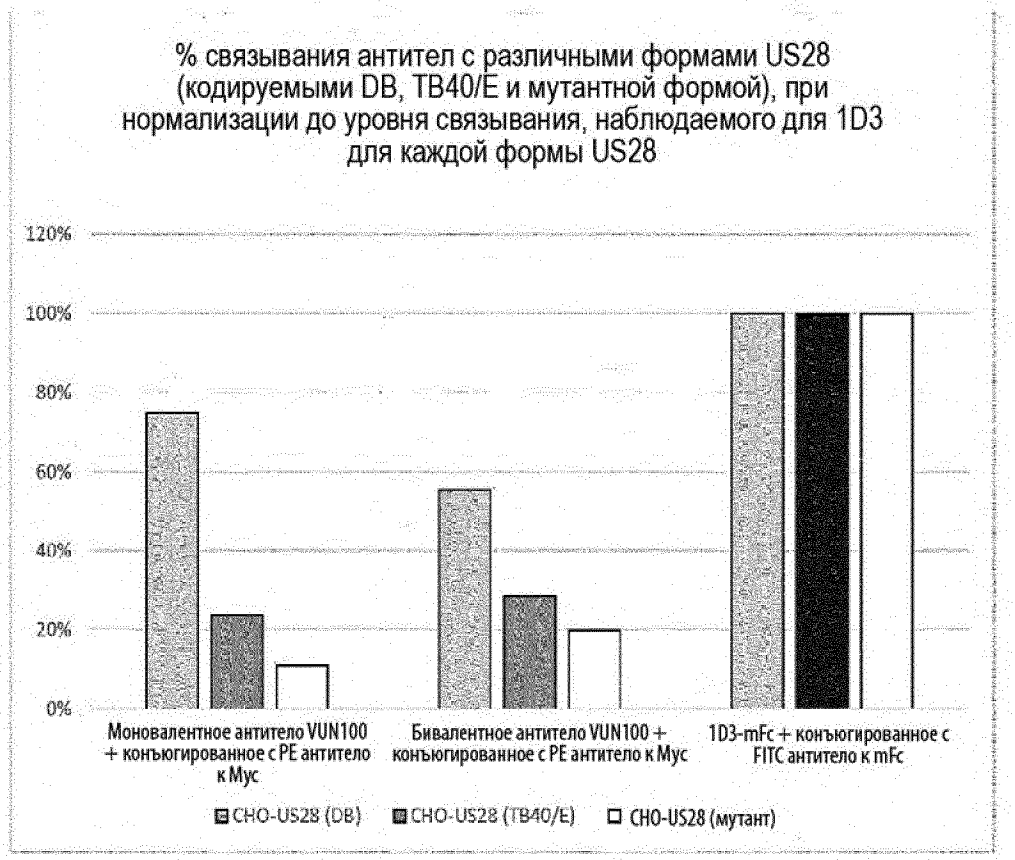


Фиг. 21 (продолжение)

D.



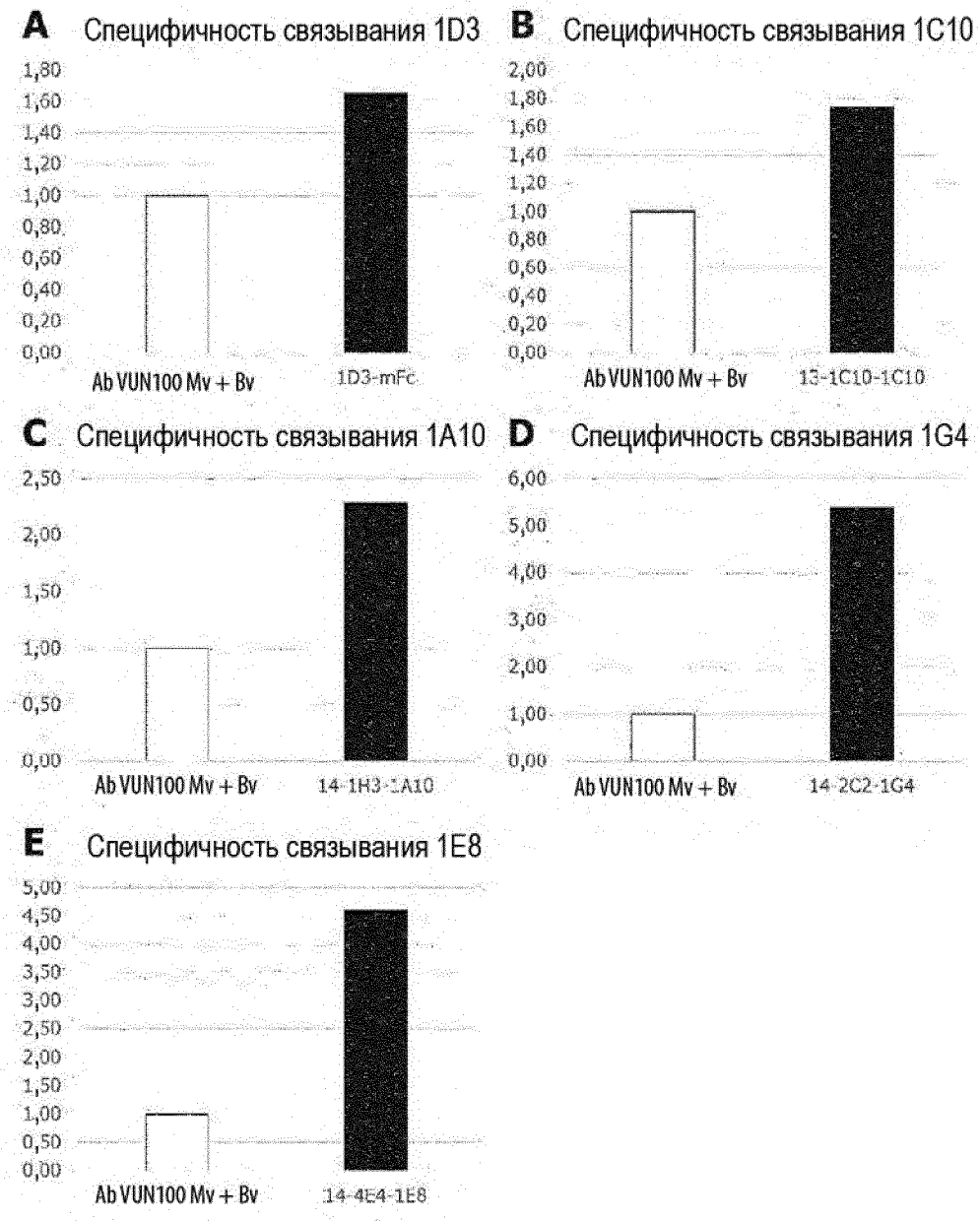
E.



Фиг. 22


Процент нецелевого связывания по отношению к контрольным клеткам CHO
3,00%
2,50%
2,00%
1,50%
1,00%
0,50%
0,00%
1D3-mFc
Ab VUN100 Mv + Bv
13-1C10-1B9
13-1C10-1C10
13-1C10-1G9
14-1H3-1A10
14-1H3-1C10
14-2C2-1G4
14-4E4-1A1
14-4E4-1E8

Фиг. 23


A Специфичность связывания 1D3
1,80
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Ab VUN100 Mv + Bv
1D3-mFc
B Специфичность связывания 1C10
2,00
1,80
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
Ab VUN100 Mv + Bv
13-1C10-1C10
C Специфичность связывания 1A10
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
Ab VUN100 Mv + Bv
14-1H3-1A10
D Специфичность связывания 1G4
6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
Ab VUN100 Mv + Bv
14-2C2-1G4
E Специфичность связывания 1E8
5,00
4,50
4,00
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
Ab VUN100 Mv + Bv
14-4E4-1E8