РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 770 001** (13) **C2**

(51) МПК
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C07K 14/5443 *(2022.02);* ***C07K 14/55*** *(2022.02);* ***C07K 16/244*** *(2022.02);* ***C07K 16/2803*** *(2022.02);* ***C07K 16/2809*** *(2022.02);* ***C07K 16/283*** *(2022.02);* ***C07K 16/30*** *(2022.02);* ***A61P 35/00*** *(2022.02);* ***A61K 38/00*** *(2022.02);* ***C07K 2317/22*** *(2022.02);* ***C07K 2317/622*** *(2022.02);* ***C07K 2319/33*** *(2022.02)*

(21)(22) Заявка: **2018116565, 06.10.2016**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.10.2016

Дата регистрации:
14.04.2022

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
06.10.2015 US 62/237,835

(43) Дата публикации заявки: **07.11.2019** Бюл. № 31

(45) Опубликовано: **14.04.2022** Бюл. № 11

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **07.05.2018**

(86) Заявка PCT:
US 2016/055722 (06.10.2016)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2017/062604 (13.04.2017)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры"

(72) Автор(ы):
ВОЛЛЕРА Дениэл Аттилио (US),
МИЛЛЕР Джеффри С. (US)

(73) Патентообладатель(и):
РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ МИННЕСОТА (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 2014138306 A1, 12.09.2014. WO 2014138306 A1, 12.09.2014. MILLER J.S. Therapeutic applications: natural killer cells in the clinic. Hematology, 2013(1), p. 247-253. doi:10.1182/asheducation-2013.1.247. GLEASON M.K. et al., Bispecific and trispecific killer cell engagers directly activate human NK cells through CD16 signaling and induce** (см. прод.)

(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к конструированию и использованию молекул триспецифических привлекающих киллеры средств. Предложено соединение для лечения злокачественной опухоли, которая экспрессирует опухолевый антиген, которое содержит привлекающий NK домен, содержащий аминокислотные остатки 1-240 SEQ ID No.1 или аминокислотные остатки 19-140 SEQ ID No.14; активирующий NK домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID No.15 или аминокислотную последовательность SEQ ID No.15, содержащую аминокислотную замену N72D или аминокислотную замену N72A; первый фланкирующий полипептид, связывающий привлекающий NK домен и активирующий NK домен; направляющий домен, который специфично связывается с указанным опухолевым антигеном; и второй фланкирующий полипептид, связывающий активирующий NK

RU 2770001 C2
RU 2770001 C2

домен и направляющий домен. В частности, предложено соединение, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID No.1 или SEQ ID No.14. Триспецифические привлекающие киллеры средства индуцируют пролиферацию NK-клеток и их пролонгированную выживаемость и могут служить в качестве медиатора ADCC и позволяют растить NK-клетки без необходимости экстракорпоральной генетической модификации и генной терапии. 6 н. и 18 з.п. ф-лы, 22 ил., 3 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):
cytotoxicity and cytokine production. Molecular cancer therapeutics, 2012, v. 11,12, p. 2674-2684. doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0692. RU 2014100350 A, 27.07.2015.

RU 2770001 C2

RU 2770001 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 770 001** (13) **C2**

(51) Int. Cl.
C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C07K 14/5443 *(2022.02);* ***C07K 14/55*** *(2022.02);* ***C07K 16/244*** *(2022.02);* ***C07K 16/2803*** *(2022.02);* ***C07K 16/2809*** *(2022.02);* ***C07K 16/283*** *(2022.02);* ***C07K 16/30*** *(2022.02);* ***A61P 35/00*** *(2022.02);* ***A61K 38/00*** *(2022.02);* ***C07K 2317/22*** *(2022.02);* ***C07K 2317/622*** *(2022.02);* ***C07K 2319/33*** *(2022.02)*

(21)(22) Application: **2018116565, 06.10.2016**

(24) Effective date for property rights:
06.10.2016

Registration date:
14.04.2022

Priority:
(30) Convention priority:
06.10.2015 US 62/237,835

(43) Application published: **07.11.2019** Bull. № **31**

(45) Date of publication: **14.04.2022** Bull. № **11**

(85) Commencement of national phase: **07.05.2018**

(86) PCT application:
US 2016/055722 (06.10.2016)

(87) PCT publication:
WO 2017/062604 (13.04.2017)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3, OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):
VOLLERA Deniel Attilio (US),
MILLER Dzheffri S. (US)

(73) Proprietor(s):
RIDZHENTS OF DZE YUNIVERSITI OF MINNESOTA (US)

RU 2770001 C2

(54) THERAPEUTIC COMPOUNDS AND METHODS

(57) Abstract:

FIELD: pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions relates to construction and use of molecules of trispecific killer-attracting agents. Proposed is a compound for treating a malignant tumour expressing a tumour antigen, containing an NK-attracting domain containing amino acid residues 1-240 SEQ ID No.1 or amino acid residues 19-140 SEQ ID No.14; an NK-activating domain containing an amino acid sequence SEQ ID No.15 or amino acid sequence SEQ ID No.15 containing an amino acid substitution N72D or an amino acid substitution N72A; a first flanking polypeptide binding the NK-attracting domain and the NK-activating domain; a guiding domain, binding specifically to said tumour antigen; and a second flanking polypeptide binding the NK-activating domain and the guiding domain. In particular, proposed is a compound containing an amino acid sequence SEQ ID No.1 or SEQ ID No. 14.

EFFECT: trispecific killer-attracting agents induce NK cell proliferation and prolonged survival thereof, can serve as an ADCC mediator, and allow NK cells

RU 2770001 C2

to be grown without the need for extracorporeal genetic modification and gene therapy.

24 cl, 22 dwg, 3 tbl, 4 ex

RU 2770001 C2

RU 2770001 C2

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СВЯЗАННУЮ ЗАЯВКУ

По данной заявке испрашивают приоритет предварительной патентной заявки США № 62/237,835, поданной 6 октября 2015 года, которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

ПРАВИТЕЛЬСТВЕННОЕ ФИНАНСИРОВАНИЕ

Это изобретение выполнено при правительственной поддержке по CA111412 и CA65493, выданным National Institutes of Health, и по CA36725, CA72669 и CA197292, выданным National Cancer Institute. Правительство имеет определенные права на изобретение.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Данная заявка содержит список последовательностей, поданный в электронной форме через EFS-Web в United States Patent and Trademark Office в виде ASCII текстового файла, озаглавленного «2016-10-06-SequenceListing_ST25.txt», который имеет размер 85 килобайтов и создан 6 октября 2016 года. Информация, содержащаяся в списке последовательностей, включена в настоящее описание посредством ссылки.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ

Это раскрытие относится к разработке, конструированию и использованию молекул триспецифических привлекающих киллеры средств (TriKE).

В одном из аспектов в этом раскрытии описана молекула, сконструированная так, чтобы содержать привлекающий NK домен, активирующий NK домен, функционально связанный с привлекающим NK доменом, и направляющий домен, который избирательно связывается с клеткой-мишенью и функционально связан с активирующим NK доменом и привлекающим NK доменом.

В некоторых вариантах осуществления активирующий NK домен может содержать по меньшей мере часть цитокина.

В некоторых вариантах осуществления привлекающий NK домен может содержать фрагмент, который избирательно связывается с NK клеткой. Фрагмент, который избирательно связывается с NK клеткой, может активировать NK клетки и/или блокировать ингибирование NK клеток. В некоторых вариантах осуществления привлекающий NK домен может содержать антитело или его фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень может представлять собой опухолевую клетку или клетку, инфицированную вирусом. В некоторых вариантах осуществления направляющий домен может содержать антитело или его фрагмент. В других вариантах осуществления направляющий домен может содержать лиганд или низкомолекулярное соединение, которое избирательно связывается с клеткой-мишенью.

В некоторых вариантах осуществления молекулу можно разрабатывать для того, чтобы включать второй направляющий домен, второй активирующий NK домен или второй привлекающий NK домен.

В другом аспекте этого раскрытия описана молекула, сконструированная для того, чтобы содержать привлекающий Т-клетки домен, активирующий Т-клетки домен, функционально связанный с привлекающим Т-клетки доменом, и направляющий домен, который избирательно связывается с клеткой-мишенью и функционально связан с активирующим Т-клетки домен и привлекающим Т-клетки доменом.

В некоторых вариантах осуществления активирующий Т-клетки домен может содержать по меньшей мере часть цитокина.

В некоторых вариантах осуществления привлекающий Т-клетки домен может содержать фрагмент, который избирательно связывается с Т-клеткой. Фрагмент, который избирательно связывается с Т-клеткой, может активировать Т-клетки и/или

блокировать ингибирование Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления привлекающий Т-клетки домен может содержать антитело или его фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень может представлять собой опухолевую клетку или клетку, инфицированную вирусом. В некоторых вариантах осуществления направляющий домен может содержать антитело или его фрагмент. В других вариантах осуществления направляющий домен может содержать лиганд или низкомолекулярное соединение, которое избирательно связывается с клеткой-мишенью.

В некоторых вариантах осуществления молекулу можно разрабатывать для того, чтобы включать второй направляющий домен, второй активирующий Т-клетки домен или второй привлекающий Т-клетки домен.

В некоторых вариантах осуществления любого аспекта молекула может содержать фланкирующую последовательность между любыми двумя из доменов, приведенных непосредственно выше. В некоторых случаях, молекула может иметь больше чем одну фланкирующую последовательность.

В другом аспекте этого раскрытия описан способ, который включает введение любого варианта осуществления сконструированной молекулы, приведенного выше, субъекту в количестве, эффективном для того, чтобы индуцировать NK-опосредованное уничтожение клетки-мишени или опосредованное Т-клетками уничтожение клетки-мишени, как может подходить для конкретной молекулы, которую вводят.

Приведенное выше краткое изложение настоящего изобретения не предназначено для того, чтобы описывать каждый раскрытый вариант осуществления или каждую реализацию настоящего изобретения. Описание, которое следует далее, более конкретно поясняет иллюстративные варианты осуществления. В нескольких местах на всем протяжении заявки в списках примеров приведены указания о том, какие примеры можно использовать в различных комбинациях. В каждом случае перечисленный список служит только в качестве репрезентативной группы, и его не следует интерпретировать в качестве исключительного списка.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фиг. 1. Триспецифическое привлекающее киллеры средство (TriKE) 161533 (SEQ ID № 1) проявляет превосходящие свойства очистки относительно биспецифического привлекающего киллеры средства (BiKE) 1633 (SEQ ID № 2). (A) Схема размещения кодирующих областей для доменов BiKE (слева) и TriKE (справа) в экспрессирующем векторе pET. (B) Кривая поглощения для 1633 BiKE (слева), элюированного из ионообменной колонки в качестве первой фазы при очистке лекарственного средства с использованием протокола трехступенчатого элюирования. Первый пик, элюированный из колонки, представляет продукт. В случае 161533 TriKE (справа), поглощение пика 1 почти удвоено, что указывает на превосходящий выход. Схожее количество телец включения повторно укладывали и очищали. Весь белок удаляли из колонки. (C) Гель SDS-PAGE и окрашивание кумаси синим после второй стадии очистки на эксклюзионной колонке. Денситометрический анализ указывает на то, что продукт имеет чистоту более 95%.

Фиг. 2. 161533 TriKE вызывает превосходящую функцию NK клеток против мишеней. Высвобождение изотопа хрома-51 (^{51}Cr) часто используют для того, чтобы измерять функцию NK клеток (уничтожение). (A) Свежие выделенные PBMC культивировали с нагруженными хромом клетками HL-60 в течение 4 ч при соотношениях E:T 20:1, 6,6:1 и 2:1. Указанные реактивы добавляли в начале совместной культуры в концентрации 20 нМ. Данные представлены в виде % цитолитической активности NK клеток. С учетом многих условий, значимость отмечена только между молекулами 1633 и 161533. n=3.

(B) Для того чтобы оценивать специфичность 161533 TriKE, анализ высвобождения ^{51}Cr осуществляли против мишеней CD33-EpCAM+ HT29. EpCAM1533 TriKE использовали в качестве положительного контроля. n=2. (C) Обогащали NK клетки из PBMC нормального донора с использованием магнитных бус, и помещали их в культуру с мишенями HL-60 (10:1) отдельно или в присутствии 1633 BiKE или 161533 TriKE в течение 24 часов. В конце инкубации супернатанты брали из каждой из культур и замораживали для дальнейшей оценки секретируемых IFNγ, TNFα, GM-CSF и MIP1a через мультиплексный анализ Luminex (n=5). Точки и столбцы представляют среднее±SEM.

Фиг. 3. 161533 TriKE опосредует пролиферацию и размножение NK клеток. PBMC пациента после трансплантации нагружали пролиферативным красителем CELLTRACE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) и совместно культивировали с мишенями HL-60 при соотношении (E:T) 5:1 в течение 7 суток в присутствии 50 нМ 1633 BiKE или 161533 TriKE. В конце инкубации CD56+CD3- NK клетки оценивали на жизнеспособность посредством окрашивания Live/Dead Near IR. (A) Индивидуальная гистограмма и (B) объединенный анализ жизнеспособности в популяции NK клеток, которую обрабатывали с использованием 1633 BiKE (серый) или 161533 TriKE (черный). (C) Затем пролиферацию оценивали посредством разведения CELLTRACE в живых CD56-CD3+ T-клетках (серый) и CD56+CD3- NK клетках (черный) в пределах группы TriKE. (D) Объединенный анализ показывает % делившихся клеток (вверху) и показатель размножения (внизу), который представляет собой вычисление кратности размножения в популяции, принимая во внимание количество разведения CELLTRACE. Индивидуальные точки представляют отдельные образцы после трансплантации (n=8).

Фиг. 4. 161533 TriKE мощно восстанавливает функцию NK клеток в образцах после трансплантации. PBMC пациента после трансплантации оттаивали и оставляли в покое в течение ночи. В следующую ночь их инкубировали без лекарственного средства, с 1633 BiKE (50 нМ) или 161533 TriKE (50 нМ). На следующее утро их промывали и проводили ту же обработку, что и ночью ранее (чтобы гарантировать, что имеют место проблемы с интернализацией молекул). (A) PBMC с указанными группами обработки инкубировали с нагруженными хромом HL-60 в течение 4 ч и вычисляли % цитолитической активности. Точки и столбцы обозначают среднее±SEM (n=9). (B) Репрезентативные гистограммы и (C) объединенные данные об экспрессии CD107a (левая часть), IFNγ (центральная часть) и TNFα (правая часть) в CD56+CD3- NK клетках после 4 ч инкубации с мишенями HL-60. Точки обозначают индивидуальные образцы пациентов (n=10).

Фиг. 5. 161533 TriKE усиливает функцию NK клеток против первичных AML бластов по сравнению с BiKE. PBMC пациента после трансплантации оттаивали и оставляли в покое в течение ночи. В следующую ночь их инкубировали с 1633 BiKE (50 нМ) или 161533 TriKE (50 нМ). На следующее утро их промывали и осуществляли ту же обработку, что и ночью ранее (чтобы гарантировать, что отсутствуют проблемы с интернализацией молекул). Первичные AML бласты из продуктов афереза двух отдельных пациентов оттаивали и оставляли в покое в течение ночи. Обработанные PBMC пациента после трансплантации (n=6) инкубировали с двумя различными первичными AML бластами (в сумме n=12) в течение 4 ч, и оценивали функцию NK клеток посредством проточной цитометрии. Функцию NK можно оценивать посредством измерения литической дегрануляции в форме CD107a. (A) Репрезентативные гистограммы, представляющие экспрессию CD107a (слева), IFNγ (середина) и TNFα (справа) на NK клетках пациента после трансплантации, которые обрабатывали с использованием 1633 BiKE (серый) или 161533 TriKE (черный) после 4 ч инкубации с

первичными AML бластами. (B) Объединенные данные для экспрессии CD107a (слева), IFNγ (середина) и TNFα (справа) на NK клетках пациента после трансплантации, которые обрабатывали с использованием 1633 BiKE и 161533 TriKE и инкубировали с первичными AML бластами. Каждый прямоугольник представляет отдельный образец пациента после трансплантации, который инкубировали с двумя отдельными AML бластами-мишенями пациента, которые обозначены закрашенными и не закрашенными прямоугольниками (всего n=12).

Фиг. 6. 161533 TriKE ограничивает опухолевый рост HL-60 in vivo лучше, чем 1633 BiKE. Клетки HL-60-luc инъецировали iv ($7{,}5\times10^5$ клеток/мышь) NSG мышам и через 3 суток инфузировали один миллион NK клеток человека, активированных в течение ночи с использованием IL-15. Группы 1633 BiKE и 161533 TriKE получали HL-60-luc и NK клетки, тогда как контрольная группа получала только клетки HL-60-luc. Лекарственное средство (50 мкг/кг) вводили MWF на всем протяжении исследования. (A) Индивидуальная фотолюминесценция мышей в сутки 14 (вверху) и сутки 21 (внизу) исследования при экспозиции 2 минуты (n=5 на одну обработку (до гибели мышей), репрезентативно для двух отдельных экспериментов). (B) Количественное определение люминесценции у мышей из трех групп обработки в сутки 14 (слева) и сутки 21 (справа). Каждая точка представляет отдельную мышь и столбцы обозначают среднее±SEM (n= 5, репрезентативно для двух отдельных экспериментов). (C) Кровь у мышей брали в сутки 20 в каждой из экспериментальных групп обработки. С помощью проточной цитометрии количественно определяли циркулирующие CD56+CD3- NK клетки человека. События регистрировали в течение 60 с и вычисляли число событий с NK клетками человека. Представлены репрезентативные точечные диаграммы, показывающие число событий с NK (CD56+.CD3-) клетками в пределах CD45+ субпопуляции. (D) Агрегированные данные, демонстрирующие число событий с NK клетками человека в каждой группе обработки в сутки 20. Индивидуальные точки представляют различных мышей и столбцы обозначают среднее±SEM (n=3 для группы HL-60-luc [2 мыши погибли], n=5 для групп 1633 BiKE и 161533 TriKE).

Фиг. 7. Как фланкирующие последовательности, так и ориентация молекулы TriKE влияют на ее функцию. Для того чтобы тестировать влияние фланкирующих последовательностей, конструировали вариант 161533 (161533NL, SEQ ID № 5), который не содержал фланкирующие последовательности (PSGQAGAAASESLFVSNHAY, SEQ ID № 3; и EASGGPE, SEQ ID № 4) по любую сторону от домена IL-15 в конструкции 161533. Свежие выделенные PBMC (содержащие 3,5% NK клеток для этого примера) от двух независимых доноров (PB1 и PB2) культивировали с нагруженными хромом клетками HL-60 в течение 4 ч при соотношении E:T 20:1. Указанные реактивы добавляли в начале совместной культуры в концентрации 20 нМ. Данные представлены в виде % цитолитической активности NK клеток. 161533 отражает конструкцию, которая содержит модифицированный активирующий NK домен IL-15 с интактными фланкирующими последовательностями. Данные показывают, что активирующий NK домен IL-15 с фланкирующими последовательностями усиливает функцию TriKE. Для того чтобы исследовать эффект ориентации, синтезировали конструкцию с IL-15 или на N-конце (151633; SEQ ID № 6) или на C-конце (163315; SEQ ID № 7) и сравнивали с 161533 дикого типа с IL-15 в качестве сшивателя. Сгенерированные данные IL-15 в центре молекулы оптимизирует NK цитолитическую активность.

Фиг. 8. 1615EpCAM TriKE (SEQ ID № 8) обеспечивает превосходящие свойства очистки относительно EpCAM16 BiKE. (A) Схема размещения кодирующих областей для доменов TriKE (1615EpCAM) в экспрессирующем векторе pET. (B) Схема размещения кодирующих

областей для доменов BiKE (16EpCAM) в экспрессирующем векторе pET. (C) Кривая поглощения для TriKE (1615EpCAM), элюированного из ионообменной колонки в виде первой фазы при очистке лекарственного средства с использованием протокола трехступенчатого элюирования. Первый пик, элюированный из колонки, представляет продукт. (D) Кривая поглощения BiKE (16EpCAM), элюированного из ионообменной колонки в виде первой фазы при очистке лекарственного средства с использованием протокола трехступенчатого элюирования. Первый пик, элюированный из колонки, представляет продукт, полученный с более низким выходом, чем TriKE. (F) Гель SDS-PAGE и окрашивание кумаси синим после второй стадии очистки (E) на эксклюзионной колонке. Денситометрический анализ указывает на то, что продукт имеет чистоту более 95%.

Фиг. 9. Оценка активности 1615EpCAM TriKE (SEQ ID № 8) в анализах высвобождения хрома. Свежие выделенные естественные киллерные (NK) клетки добавляли к клеткам HT-29 (клеточная линия карциномы толстой кишки человека) с соответствующими соотношениями эффектор:мишень, как указано. Выбирали доноров с различными от природы уровнями циркулирующих NK клеток (A) мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) с 3,8% NK клеток, (B) PBMC с 6,4% NK клеток, (C) 15% и (D) > 80% NK клеток, обогащенных из PBMC. (E) Более высокие уровни уничтожения с 1615EpCAM коррелировали с донорами с более высокими от природы уровнями NK уничтожения. В (E) только кривые для 1615EpCAM сравнивали для четырех доноров, что подчеркивает прямую корреляцию между присутствием NK и цитолитической активностью, индуцированной лекарственным средством. (F) Показано, что в случае 16EpCAM такая корреляция отсутствует.

Фиг. 10. Литическая дегрануляция в различных экспрессирующих EpCAM клеточных линиях злокачественных опухолей-мишеней. Как отмечено, функцию NK можно измерять посредством количественного определения экспрессии CD107a в качестве меры литической дегрануляции. Экспрессирующие CD107a клетки оценивали в CD56+CD3- субпопуляции NK клеток. Эффекторные PBMC инкубировали с различными несущими EpCAM клеточными линиями-мишенями, включая (A) BT-474, (B) SK-BR-3, (C) PC-3, (D) DU145, (E) UMSCC-11B, (F) NA и (G) SKOV-1. TriKE, добавленный к эффекторам и клеткам-мишеням, индуцировал более высокие процентные доли CD107a-экспрессирующих клеток по сравнению с контролями, а также по сравнению с биспецифическим 16EpCAM. P-значения оценивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа и представляли вместе с SD. *оценка в сравнении с контролями; #оценка 1615EpCAM в сравнении с EpCAM16.

Фиг. 11. Пролиферационные возможности 1615EpCAM TriKE. (A) Для того чтобы оценивать размножение NK клеток, мононуклеарные клетки периферической крови обрабатывали с использованием 1615EpCAM TriKE или EpCAM16 BiKE. Дискретные пики в гистограммах обозначают последовательные поколения NK клеток после клеточного деления, которое ведет к повторяющемуся легкому снижению интенсивности флуоресценции. Тогда как NK клетки демонстрируют типичный паттерн пролиферации, T-клетки не демонстрируют его. Приведены репрезентативные данные пяти независимых экспериментов. (B) PBMC клетки совместно культивировали с TriKE и BiKE и оценивали пролиферацию NK клеток. Приведены репрезентативные данные пяти независимых экспериментов. (C) PBMC клетки совместно культивировали с TriKE, BiKE, scFv против CD16 [CD16], интерлейкином (IL)-15, scFv против EpCAM [EpCAM] и DT2219, направленным токсином, состоящим из энтеротоксина дифтерии, связанным с scFv против CD22 и против CD19. Оценка показателя размножения NK клеток

демонстрировала значительно (p<0,001) повышенный показатель в конструкции 1615EpCAM и с IL-15 отдельно, который обозначен *, (n=5). (D) Очищенные NK клетки экспонировали для TriKE и BiKE. После 7 суток реакционноспособный краситель использовали для того, чтобы дифференцировать живые и погибшие клетки. Реакционноспособный краситель проникает через ослабленные мембраны погибших клеток, что ведет к более интенсивному окрашиванию (правый пик), но не способен проникать через мембраны живых клеток, что ведет к более слабому окрашиванию (левый пик).

Фиг. 12. Литическая дегрануляция и экспрессия IFN-γ в клетках HT-29. Для того чтобы исследовать активность NK клеток, CD107a-экспрессирующие клетки оценивали в CD56+/CD3- субпопуляции NK клеток. (A) Клетки, которые обрабатывали с использованием 1615EpCAM TriKE (SEQ ID № 8), демонстрировали резко повышенную дегрануляцию EpCAM-экспрессирующих клеток-мишеней HT-29, тогда как контроли не демонстрировали этого. E:T отдельно, E:T+scFv против EpCAM без 1615, E:T+против CD16 отдельно и E:T+комбинация IL-12 и IL-18 (которая не увеличивает литическую дегрануляцию) не оказывают какого-либо эффекта. (B) Анализировали продуцирование IFN-γ той же CD56+/CD3- популяцией NK клеток. Только 1615EpCAM демонстрировала повышенную процентную долю экспрессирующих IFN-γ клеток. Значения не приближались к значениям, которые наблюдали при использовании комбинации IL12+IL18, которая, как известно, стимулирует продуцирование цитокинов на сверхфизиологических уровнях. (C) Не наблюдали экспрессирующих CD107a клеток, когда исследовали NK клетки, которые инкубировали с EpCAM- клетками-мишенями миелолейкоза HL-60. (D) Только E:T контроли, которые обрабатывали с использованием IL12+IL18, демонстрировали высокую экспрессию IFN-γ.

Фиг. 13. Схема размещения полинуклеотида, кодирующего домены 1615EpCAM133 (SEQ ID № 9), в экспрессирующем векторе pET. Синтез и сборку гибридного полинуклеотида, кодирующего 1615EpCAM133, осуществляли с использованием способов перетасовки ДНК и лигирования ДНК. Полностью собранная кодирующая область имеет, от 5'-конца к 3'-концу, участок рестрикции NcoI; инициирующий кодон ATG; кодирующие области, которые кодируют области V_H и V_L CD16 человека (NM3E2), полученные из библиотеки фагового дисплея, сегмент в 20 аминокислот (PSGQAGAAASESLFVSNHAY; SEQ ID № 3), модифицированный IL-15, сегмент в 7 аминокислот (EASGGPE; SEQ ID № 4), гуманизированный scFv против EpCAM из антитела MOC-31, мутантную шарнирную область IgG1 человека в 15 аминокислот и scFv против CD133 из клона 7; и, наконец, участок рестрикции NotI. Получаемый полинуклеотид фрагмента NcoI/NotI 2715 п. о. сплайсировали в экспрессирующий вектор pET28c под управлением индуцибельного изопропил-βD-тиогалактопиранозидом (IPTG) (FischerBiotech, Fair Lawn, NJ) промотора T7. Анализ секвенирования ДНК (Biomedical Genomics Center, University of Minnesota, MN, USA) использовали для того, чтобы верифицировать, что полинуклеотид имел правильную последовательность и его клонировали с сохранением рамки считывания.

Фиг. 14. Активность 1615EpCAM133. Дополнительный scFv, распознающий CD133, экспрессируемый на злокачественных стволовых клетках, добавляли в 1615EpCAM для получения 1615EpCAM133 TetraKE. (A) и (B) показана активность 1615EpCAM133, которую оценивали с использованием анализов высвобождения ^{51}Cr. Свежие выделенные NK клетки от двух доноров (PT1 и PT2) добавляли в клеточную линию карциномы толстой кишки человека Caco-2 (CD133+, EpCAM+). Клетки совместно культивировали с мишенями при указанных соотношениях эффекторов и мишеней (E:T) в течение 4 ч

и затем оценивали высвобождение ^{51}Cr. B (C) и (D) NK клетки от двух доноров экспонировали для клеточной линии карциномы толстой кишки человека HT-29 (EpCAM+, CD133-) и высвобождение ^{51}Cr измеряли аналогичным образом, как описано выше.

Фиг. 15. Подобно 1615EpCAM, 1615EpCAM133 демонстрирует усиленное размножение из-за присутствия IL-15. (A) Анализы связывания с клетками HT-29 и (B) клетками Caco-2 осуществляли с использованием FITC-меченного 1615EpCAM133 TetraKE (200 нМ), конкурирующего с избытком немеченных указанных scFv (1000 нМ). Эксперименты повторяли с 200 нМ 1615EpCAM133, и более низкий блок с 500 нМ scFv. Результаты были воспроизводимыми. (C) Очищенные NK клетки окрашивали с использованием CELLTRACE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) для того, чтобы измерять пролиферацию, и совместно культивировали с scFv против CD16 [CD16], scFv против CD133 [CD133], 1615EpCAM133 TetraKE, DT2219 (мутантным дифтерийным токсином, связанным с scFv против CD22 и против CD19), scFv против EpCAM [EpCAM], EpCAM16 BiKE или IL-15 [IL15] в течение 7 суток (n=5). На графике представлены объединенные данные показателя размножения для каждой из групп. (D) Репрезентативная гистограмма PBMC, окрашенных красителем CELLTRACE и совместно культивированных с 30 нМ 1615EpCAM133 TetraKE или EpCAM16 BiKE в течение 7 суток. (E) Репрезентативная гистограмма со сравнением пролиферации CD56+CD3- NK клеток с CD56-CD3+ T-клетками. (F) Репрезентативная гистограмма, иллюстрирующая выживаемость (по исключению красителя Live/Dead) очищенных NK клеток, которые экспонировали для 1615EpCAM133 TetraKE или EpCAM16 BiKE в течение 7 суток. Погибшие клетки демонстрируют включение красителя (высокий пик), тогда как живые клетки исключают его (низкий пик). P-значения оценивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа и представляли со стандартным отклонением.

Фиг. 16. Схема размещения кодирующих областей для 1615133 (SEQ ID № 10) в экспрессирующем векторе pET. Гибридный полинуклеотид, кодирующий 1615133, синтезировали с использованием способов перетасовки ДНК и лигирования ДНК. Полностью собранный полинуклеотид имеет, от 5'-конца к 3'-концу, участок рестрикции NcoI; инициирующий кодон ATG; кодирующие области, кодирующие scFv против CD16 человека, сегмент в 20 аминокислот (PSGQAGAAASESLFVSNHAY; SEQ ID № 3), мутантный IL-15 человека, линкер в 7 аминокислот (EASGGPE; SEQ ID № 4) и scFv против CD133; и участок рестрикции NotI. Получаемый полинуклеотид фрагмента NcoI/NotI в 1884 пар оснований сплайсировали в экспрессирующий вектор pET28c под управлением индуцибельного изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (IPTG) T7 промотора.

Фиг. 17. Высвобождение ^{51}Cr и связывание 1615133 TriKE. (A, B) Для оценки активности осуществляли анализы высвобождения ^{51}Cr с использованием двух доноров. 1615133 TriKE, 16133 BiKE, scFv против CD16 [CD16] или scFv против CD133 [CD133] совместно культивировали с CD133+ клетками Caco-2 и PBMC при помеченных соотношениях E:T. (C) PBMC и клетки Caco-2 экспонировали для различных концентраций TriKE (1 нМ, 5 нМ, 10 нМ) и титровали при их соотношении E:T (20:1, 6,6:1, 2,2:1, 0,75:1, 0,23:1, 0,08:1). (D) FITC-меченный 1615133 TriKE инкубировали при помеченных концентрациях с клетками Caco-2. В том же эксперименте то же количество FITC-меченного 1615133 добавляли в 200 нМ мономерных CD133 scFv для блокирования.

Фиг. 18. Размножение и выживаемость. (A) Очищенные NK клетки экспонировали для scFv против CD16 (CD16), scFv против CD133 (CD133), 16133 BiKE, 1615133 TriKE,

DT2219 (направленного токсина, состоящего из scFv против CD22 и против CD19, связанных с дифтерийным токсином) или полученным из NCI IL-15. Только TriKE и IL-15 значительно увеличивали пролиферацию (n=5). На графике представлены объединенные данные показателя размножения, вычисленного в программном обеспечении Flowjo, для каждой из групп. (B) Очищенные NK клетки экспонировали для 1615133 TriKE и 16133 BiKE и инкубировали в течение 7 суток. Репрезентативная гистограмма иллюстрирует более высокое количество живых клеток с использованием конструкции TriKE по сравнению с BiKE без фрагмента IL-15. Значимость оценивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа и представляли со стандартным отклонением.

Фиг. 19. Анализы высвобождения ^{51}Cr осуществляли с использованием нескольких различных новых TriKE, чтобы показывать, что любой scFv, который направлен на клетки злокачественной опухоли, можно превращать в функциональные TriKE. (A) EpCAM+CD133+NG2+ клетки немелкоклеточной злокачественной опухоли легких NCI-H460+NK клетки инкубировали с 1615EPCAM133 TriKE или 1615NG2 TriKE (глиальный антиген нейронов 2 или CSPG4). Как 1615NG2, так и 1615EpCAM133 имел активность при нескольких различных соотношениях E:T (20:1, 10:1 и 5:1). (B) Мезотелин+EpCAM-CD133-NG2 клетки меланомы MDA-435A инкубировали с 1615EPCAM TriKE (SEQ ID № 8) или 1615Meso TriKE (SEQ ID № 11) TriKE. Только 1615Meso имел активность. (C) Мезотелин+NG2+ клетки злокачественной опухоли яичника (клетки Ovcar3) инкубировали с 1615NG2 TriKE или 1615SS1 TriKE. 1615Meso и 1615NG2 имели активность. (D) Клетки Raji культивировали с NK клетками и исследовали в анализах высвобождения ^{51}Cr. TriKE 16152219 (SEQ ID № 12) одновременно направлен на B-клеточные маркеры CD19 и CD22. Только 16152219, 162219 и ритуксимаб уничтожали CD22+CD19+ мишени. Контроли - нет.

Фиг. 20. Синтезировали TriKE, которые работают с IL-2 и стимулируют размножение T-клеток вместо NK клеток. Для того чтобы определять, работают ли другие цитокины вместо IL-15, CD3-IL-2-EpCAM (SEQ ID № 13) конструировали с использованием тех же фланкирующих последовательностей по обе стороны от IL-2, которые использовали по обе стороны от домена IL-15 в NK-активирующих конструкциях TriKE. PBMC метили CELLTRACE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) и помещали в культуру без обработки (отрицательный контроль), с 1615EpCAM TriKE (положительный контроль), CD3EpCAM BiTE, CD3-IL-2-EpCAM TriKE, 10 нг/мл IL-2 или 100 нг/мл IL-2. CD3-IL2-EpCAM TriKE стимулировали CD3+ T-клетки значительно сильнее, чем 1615EpCAM TriKE, CD3EpCAM BiTE или IL-2 при 10 нг/мл или 100 нг/мл.

Фиг. 21. Тестировали интактную часть CD3 из CD3-IL2-EpCAM. (A) и (B): тот же scFv против CD3 сплайсировали в дифтерийный токсин и инкубировали с CD3+ клетками-мишенями HPBMLT. CD3-IL2-EpCAM добавляли, чтобы видеть, блокировал ли он способность DT3 (CD3-направленного токсина) уничтожать клетки HPB-MLT. Блокирующая активность CD3-IL-2-EpCAM зависела от дозы в присутствии 0,1 нМ DT3 (A) и 1,0 нМ DT3 (B), что указывает на то, что фрагмент CD3 из CD3-IL2-EpCAM был интактным. (C) и (D): способность CD3-IL2-EpCAM блокировать уничтожение CD3- клеток Raji отрицательного контроля с помощью DT2219 (направленный токсин против CD22 и CD19).

Фиг. 22. Из опубликованного нанотела ламы (последовательность GeneBank EF561291) получали нанотело к CD16. Нанотело к CD16 сплайсировали в CD19 для того, чтобы тестировать способность этого CD16 привлекающего средства управлять уничтожением NK клетками. (A) Нанотело к CD16 демонстрировало цитолитическую

NK активность подобно опосредованному ритуксимабом уничтожению в анализе высвобождения хрома с CD19+Raji мишенями. (B) CD16 CDR клонировали в гуманизированный каркас камелид для того, чтобы создавать HuEF91, гуманизированное CD16 привлекающее средство. Связывание HuEF91 было эквивалентно связыванию CD16scFv, что указывает на то, что гуманизированный HuEF91 не имеет более высокой специфичности к указанной молекуле. (C) llama161533 TriKE (SEQ ID № 14) способен к росту NK клеток.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Естественные киллерные (NK) клетки представляют собой цитотоксические лимфоциты врожденной иммунной системы, способные к иммунному надзору. Подобно цитотоксическим Т-клеткам, NK клетки доставляют запас гранул гранзимов и перфоринов, которые проникают через мембрану и индуцируют апоптоз. В отличие от Т-клеток, NK клеткам не требуется примирование антигеном, они распознают мишени посредством привлечения активирующих рецепторов в отсутствие MHC распознавания.

NK клетки экспрессируют CD16, рецептор активации, который связывается с Fc частью антител IgG и вовлечен в антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). NK клетки регулирует IL-15, который может индуцировать повышенную антигензависимую цитотоксичность, активированную лимфокинами киллерную активность и/или опосредовать ответы, связанные с интерферонами (IFN), фактором некроза опухоли (TNF) и/или гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF). Все эти IL-15-активированные функции вносят вклад в усовершенствованную защиту от злокачественных опухолей.

Терапевтически адоптивный перенос NK клеток может индуцировать, например, ремиссию у пациентов с рефракторным острым миелолейкозом (AML), когда его комбинируют с лимфоистощающей химиотерапией и IL-2 для того, чтобы стимулировать выживаемость и размножение NK клеток in vivo. Эту терапию может ограничивать отсутствие антигенной специфичности и IL-2-опосредованной индукции регуляторных Т (Treg) клеток, которое подавляет пролиферацию и функцию NK клеток. Создание реактива, который управляет антигенной специфичностью, размножением и/или персистенцией NK клеток, при этом обходя негативные эффекты ингибирования Treg, может усиливать иммунотерапию на основе NK-клеток.

В этом раскрытии описано создание триспецифической молекулы, которая содержит два домена, способные управлять опосредованным NK-клетками уничтожением опухолевых клеток (например, CD33+ опухолевых клеток и/или EpCAM+ опухолевых клеток), и внутримолекулярный активирующий NK домен, способный создавать самоподдерживающийся сигнал NK клеток. Триспецифическая молекула может управлять пролиферацией NK клеток и/или усиливать NK-клеточную цитотоксичность, например, против мишеней HL-60, клеток злокачественных опухолей или клеточных линий, полученных из клеток злокачественных опухолей.

Создавали биспецифические слитые конструкции, которые содержат scFv против CD16 человека, полученный по технологии библиотеки фагового дисплея человека (McCall et al., 1999. Mol Immunol. 36:433-445). NK клетки опосредуют антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) через рецептор CD16 (FcγRIII). Передача сигнала через рецептор CD16 индуцирует кальциевые токи и фосфорилирование ITAM, запуская высвобождение литических гранул и цитокинов, таких как интерферон (IFNγ) и фактор некроза опухоли (TNFα). Биспецифическая молекула разработана для того, чтобы запускать рецептор CD16 в сочетании с другими направленными молекулами (Gleason

et al. Blood. 2014 (19):3016-26), так называемое биспецифическое привлекающее киллеры средство (BiKE). Используя один scFv, распознающий NK клетки, и второй scFv, распознающий опухолевый антиген, BiKE могут заметно усиливать цитотоксическое уничтожение в различных злокачественных опухолях человека. Один образцовый BiKE направлен на CD33 и усиливает ответы NK клеток на острый миелолейкоз (AML) и миелодиспластический синдром (MDS). MDS представляет собой клональное гетерогенное нарушение стволовых клеток, которое отличается нормальным или гиперцеллюлярным костным мозгом (BM) с цитопениями периферической крови (PB) и повышенным риском прогрессирования в AML.

NK клетки отвечают на различные цитокины, в том числе, например, IL-15, который вовлечен в гомеостаз, пролиферацию, выживаемость, активацию и/или развитие NK клеток. IL-15 и IL-2 имеют несколько общих компонентов передачи сигналов, в том числе IL-2/IL-15Rβ (CD122) и общую γ-цепь (CD132). В отличие от IL-2, IL-15 не стимулирует Treg, допуская активацию NK клеток, при этом обходя Treg ингибирование иммунного ответа. Помимо содействия гомеостазу и пролиферации NK клеток, IL-15 может восстанавливать функциональные дефекты NK клеток, которые могут возникать в условиях после трансплантации. IL-15 также может стимулировать функцию CD8+ Т-клеток, что дополнительно усиливает иммунотерапевтический потенциал. Кроме того, на основании доклинических исследований, профили токсичности IL-15 могут быть значительно более благоприятными, чем у IL-2 при низких дозах.

IL-15 играет роль в развитии, гомеостазе, пролиферации, выживаемости и активации NK клеток. IL-15 и IL-2 имеют несколько общих компонентов передачи сигналов, включая IL-2/IL-15Rβ (CD122) и общую γ-цепь (CD132). IL-15 также активирует NK клетки и может восстанавливать функциональные дефекты при пересадке NK клеток после трансплантации гематопоэтических стволовых клеток (HSCT).

В этом раскрытии описаны, в одном из аспектов, молекулы триспецифических привлекающих киллеры средств (TriKE), которые в целом содержат один или более доменов привлекающего NK клетки средства (например, CD16, CD16+CD2, CD16+ DNAM, CD16+NKp46), один или более направляющих доменов (которые направлены, например, на опухолевую клетку или инфицированную вирусом клетку) и один или более активирующих NK доменов цитокинов (например, IL-15, IL-12, IL-18, IL-21 или другой усиливающий NK клетки цитокин, хемокин и/или активирующая молекула), где каждый домен функционально связан с другими доменами. Как используют в настоящем описании, термин «функционально связан» относится к непосредственной или опосредованной ковалентной связи. Таким образом, два домена, которые функционально связаны, могут быть ковалентно связаны непосредственно друг с другом. Наоборот, два функционально связанных домена можно соединять посредством совместного ковалентного связывания с промежуточным фрагментом (например, и фланкирующей последовательностью). Два домена можно считать функционально связанными, например, если их разделяет третий домен, с одной или более промежуточными фланкирующими последовательностями или без них.

Привлекающий NK домен может содержать любой фрагмент, который связывается с NK клеткой и/или активирует ее, и/или любой фрагмент, который блокирует ингибирование NK клетки. В некоторых вариантах осуществления привлекающий NK домен может содержать антитело, которое избирательно связывается с компонентом поверхности NK клетки. В других вариантах осуществления привлекающий NK домен может содержать лиганд или низкомолекулярное соединение, которое избирательно связывается с компонентом поверхности NK клетки. Как используют в настоящем

описании, термин «избирательно связывает» относится к способности различать две или больше альтернатив, например, такой как наличие дифференциальной аффинности, до любой степени, к конкретной мишени. Как используют в настоящем описании, «антитело» относится в целом к иммуноглобулину или его фрагменту и, таким образом, охватывает моноклональное антитело, его фрагмент (например, scFv, Fab, F(ab')2, Fv или другие модифицированные формы), комбинацию моноклональных антител и/или их фрагментов и/или комбинацию поликлональных антител. Таким образом, для краткости, упоминание об антителе, которое избирательно связывается с компонентом поверхности NK клетки, включает любой фрагмент антитела, который проявляет описанный характер связывания. Аналогичным образом, упоминание о лиганде, который избирательно связывается с компонентом поверхности NK клетки, включает любой фрагмент лиганда, который проявляет описанный характер связывания.

В некоторых вариантах осуществления привлекающий NK домен может избирательно связываться с рецептором, по меньшей мере частично расположенным на поверхности NK клетки. В определенных вариантах осуществления привлекающий NK домен может выполнять функцию связывания NK клетки и, тем самым, приводить NK в пространственную близость с мишенью, с которой направляющий домен, описанный более подробно далее, избирательно связывается. Однако в определенных вариантах осуществления привлекающий NK домен может избирательно связываться с рецептором, который активирует NK клетку и, следовательно, также обладает активирующей функцией. Как описано выше, активация рецептора CD16 может вызывать антителозависимую клеточную цитотоксичность. Таким образом, в определенных вариантах осуществления привлекающий NK домен может содержать по меньшей мере часть антитела против рецептора CD16, эффективную для избирательного связывания с рецептором CD16. В других вариантах осуществления домен привлекающего NK клетки средства может нарушать механизмы, которые ингибируют NK клетки. В таких вариантах осуществления NK домен привлекающего средства может содержать, например, домен против PD1/PDL1, против NKG2A, против TIGIT, против иммуноглобулинового рецептора киллеров (KIR) и/или любой другой блокирующий ингибирование домен.

Можно разрабатывать привлекающий NK домен, который обладает желаемой степенью NK избирательности и, следовательно, желаемым характером иммунного привлечения. Например, CD16 идентифицирован как Fc-рецепторы FcγRIIIa (CD16a) и FcγRIIIb (CD16b). Эти рецепторы связываются с Fc-частью антител IgG, которая затем активирует NK клетки на антителозависимую клеточную цитотоксичность. Антитела против CD16 избирательно связываются с NK клетками, но также могут связываться с нейтрофилами. Антитела против CD16a избирательно связываются с NK клетками, но не связываются с нейтрофилами. Вариант осуществления TriKE, содержащий привлекающий NK домен, включающий антитело против CD16a, может связываться с NK клетками, но не связывается с нейтрофилами. Таким образом, в условиях, когда желательно привлекать NK клетки, но не привлекать нейтрофилы, можно разрабатывать привлекающий NK домен TriKE, который содержит антитело против CD16a.

Хотя в настоящем описании описан в контексте различных вариантов осуществления, в которых привлекающий NK домен содержит scFv против рецептора CD16, привлекающий NK домен может содержать любое антитело или другой лиганд, который избирательно связывается с рецептором CD16. Кроме того, привлекающий NK домен может содержать антитело или лиганд, которые избирательно связываются с любым рецептором NK клеток, например, таким как рецептор клеточной цитотоксичности

2B4, низкоаффинный Fc-рецептор CD16, иммуноглобулиноподобные рецепторы киллеров (KIR), CD2, NKG2A, TIGIT, NKG2C, LIR-1 и/или DNAM-1.

Направляющий домен может содержать любой фрагмент, который избирательно связывается с планируемой мишенью, например, такой как опухолевая клетка, мишень в строме злокачественной опухоли, мишень на ингибирующих клетках, таких как супрессорные клетки миелоидного происхождения, которые являются CD33+, или мишень на инфицированной вирусом клетке. Таким образом, направляющий домен может содержать, например, противоопухолевое антитело, такое как ритуксимаб (против CD20), афутузумаб (против CD20), трастузумаб (против HER2/neu), пертузумаб (против HER2/neu), лабетузумаб (против CEA), адекатумумаб (против EpCAM), цитатузумаб богатокс (против EpCAM), эдреколомаб (против EpCAM), аркитумомаб (против CEA), бевацизумаб (против VEGF-A), цетуксимаб (против EGFR), нимотузумаб (против EGFR), панитумумаб (против EGFR), залутумумаб (против EGFR), гемтузумаб озогамицин (против CD33), линтузумаб (против CD33), этарацизумаб (против интегрина $\alpha v\beta 3$), интетумумаб (против CD51), ипилимумаб (против CD152), ореговомаб (против CA-125), вотумумаб (против опухолевого антигена CTAA16.88) или пемтумумаб (против MUC1), против CD19, против CD22, против CD133, против CD38, против мезотелина, против ROR1, CSPG4, SS1 или IGFR1.

В других вариантах осуществления направляющий домен может избирательно связываться с мишенью на клетке, инфицированной вирусом, например, таким как аденовирус, HIV, CMV и/или HPV.

В некоторых конкретных вариантах осуществления направляющий домен может содержать антитело против CD33. В других конкретных вариантах осуществления направляющий домен может содержать антитело против молекулы адгезии эпителиальных клеток (EpCAM).

Активирующий NK домен может содержать аминокислотную последовательность, которая активирует NK клетки, содействует поддержанию NK клеток или иным образом содействует активности NK клеток. Активирующий NK домен может представлять собой или может быть получен из одного или более цитокинов, которые могут активировать и/или поддерживать NK клетки. Как используют в настоящем описании, термин «полученный из» относится к аминокислотному фрагменту цитокина (например, IL-15), которого достаточно для обеспечения активности по поддержанию и/или активации NK клеток. В вариантах осуществления, которые содержат больше чем один активирующий NK домен, активирующие NK домены можно предоставлять последовательно или в любой другой комбинации. Дополнительно, каждый активирующий NK домен на основе цитокина может содержать или полную аминокислотную последовательность цитокина или может представлять собой аминокислотный фрагмент, независимо от свойств других активирующих NK доменов, включенных в молекулу TriKE. Образцовые цитокины, на которых может быть основан активирующий NK домен, включают, например, IL-15, IL-18, IL-12 и IL-21. Таким образом, хотя в настоящем описании описано подробно в контексте образцового модельного варианта осуществления, в котором активирующий NK домен получают из IL-15, TriKE можно разрабатывать с использованием активирующего NK домена, который представляет собой любой подходящий цитокин или который получают из него.

Для краткости этого описания, упоминание об активирующем NK домене посредством идентификации цитокина, на котором он основан, включает полную аминокислотную последовательность цитокина, любой подходящий аминокислотный фрагмент цитокина

и/или модифицированную версию цитокина, которая содержит одну или более замен аминокислот. Таким образом, упоминание об активирующем NK домене «IL-15» включает активирующий NK домен, который содержит полную аминокислотную последовательность IL-15, активирующий NK домен, который содержит фрагмент IL-15, или активирующий NK домен, например, такой как IL-15N72D или IL-15N72A, который содержит замену аминокислоты по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-15 дикого типа.

Использование активирующего NK домена IL-15 в TriKE может обеспечивать длительную активность NK клеток, как свидетельствует модель на мышах, которая показывает значительно повышенные NK клетки человека и уменьшенную злокачественную опухоль, даже после трех недель. У мышей происходит активация NK клеток для продуцирования ряда факторов против злокачественных опухолей и цитокинов. Кроме того, на фиг. 1 представлено, что активирующий NK домен IL-15 как-либо изменяет химические свойства этих молекул с тем, чтобы они повторно укладывались более легко и/или их можно извлекать с более высоким выходом, таким образом делая молекулы TriKE более подходящими для клинического масштабирования.

В некоторых вариантах осуществления молекула дополнительно может содержать фланкирующую последовательность, которая может связывать два из описанных выше доменов. В некоторых вариантах осуществления присутствие фланкирующей последовательности может дополнительно увеличивать активацию NK клеток. Одна образцовая фланкирующая последовательность содержит 20 аминокислот из SEQ ID № 3. Другая образцовая фланкирующая последовательность содержит 7 аминокислот из SEQ ID № 4. Определенные варианты осуществления (например, 161533 TriKE, SEQ ID № 1) могут содержать больше чем одну фланкирующую последовательность. В качестве одного из примеров, SEQ ID № 1 содержит фланкирующую последовательность SEQ ID № 3 для того, чтобы связывать привлекающий NK домен (например, scFv против рецептора CD16) с активирующим NK доменом (например, IL-15). SEQ ID № 1 также содержит фланкирующую последовательность SEQ ID № 4 для того, чтобы связывать активирующий NK домен с направляющим доменом (например, scFv против CD33). На фиг. 7 представлены данные, которые демонстрируют, что конструкции, в которых отсутствует фланкирующая последовательность, проявляют сниженную активность по сравнению с конструкциями, которые содержат фланкирующую последовательность.

Синтез и чистота 161533 TriKE

Для того чтобы создавать образцовый модельный терапевтический TriKE, который является антиген-специфическим и поддерживает ответ NK клеток на лейкоз, сшиватель из модифицированного IL-15 человека вводили в 1633 BiKE, создавая 161533 TriKE (фиг. 1A). FPLC профиль TriKE показывал высокий выход продукта из бактериальной экспрессирующей системы, который требовал повторной укладки (фиг. 1B). Активирующий NK домен IL-15 снижал изоэлектрическую точку на две единицы pH, создавая более благоприятные условия для очистки и увеличения выхода. Несмотря на то, что очистку начинали с идентичными количествами телец включения, конечный выход 161533 TriKE был в два раза выше выхода сравнимого BiKE (1633, без активирующего NK домена IL-15), что указывает на более благоприятную динамику очистки. Продукты имели чистоту >95% в анализе на геле SDS-PAGE с окрашиванием кумаси синим (фиг. 1C). Для того чтобы верифицировать, что связывание и специфичность оставались интактными в новой молекуле TriKE, избирательность измеряли посредством проточных цитометрических анализов с прямым связыванием и блокированием на CD33+ EpCAM- клетках HL-60 и CD33- EpCAM+ клетках HT-29

(таблица 1 и таблица 2).

Таблица 1. Связывание BiKE и TriKE, измеренное с помощью проточной цитометрии

Реактив	Клеточная линия	Количество лекарственного средства (мкг)	% Положительных клеток
Без окрашивания	HL-60	-	0,1
161533-FITC	HL-60	10	63
161533-FITC	HL-60	20	75
161533-FITC	HL-60	40	78
161533-FITC	HT-29	10	4
EpCAM-FITC	HL-60	20	1,4
EpCAM-FITC	HT-29	2	100
1633-FITC	HT-29	4	1
1633-FITC	HL-60	4	62
1633-FITC	HL-60	15	74
16-FITC	HL-60	20	0,1
33-FITC	HL-60	20	98

Таблица 2. Специфичность, которую определяли посредством блокирования антигена

Реактив	Клеточная линия	Блокирующее средство	% Положительных клеток
1633-FITC	HL-60	нет	52
1633-FITC	HL-60	против CD33	1
161533-FITC	HL-60	Нет	85
161533-FITC	HL-60	против CD33	4
161533-FITC	HL-60	против CD45	73

161533 TriKE повышает функцию NK клеток

Для того чтобы определять, сохранялась ли при включении IL-15 способность биоинженерного 1633 опосредовать ADCC, 1633 и 161533 сравнивали в 4 ч анализе высвобождения хрома, где PBMC от здоровых доноров тестировали на их способность уничтожать CD33+ мишени HL-60 (фиг. 2A). 161533 TriKE индуцировал более выраженное опосредованное NK клетками уничтожение, чем BiKE, в частности в соотношении 20:1 (58,3±2,3% против 33±4%, P=0,0184). Контрольные образцы средств против CD16 и против CD33 не усиливают ответ по сравнению с необработанными контролями, что указывает на отсутствие активности отдельно у этих компонентов. Для того чтобы тестировать специфичность в цитотоксическом анализе, 161533 TriKE инкубировали с NK клетками и CD33- клетками-мишенями HT-29 (фиг. 2B). 161533 TriKE не показывал значительного увеличения уничтожения клеток HT-29 по сравнению с необработанным контролем. Чтобы гарантировать, что клетки-мишени HT-29 не являются просто более устойчивыми, в качестве объяснения специфичности, клетки HT-29 инкубировали с новым IL-15 TriKE, содержащим scFv против EpCAM, а не против CD33. TriKE устойчиво уничтожал EpCAM+ клетки HT-29, что подчеркивает универсальность платформы TriKE с активирующим NK доменом IL-15 как против гематологических злокачественных новообразований, так и против злокачественных новообразований солидных опухолей.

Помимо перенаправленной цитотоксичности, другая функция NK клеток состоит в продуцировании цитокинов и хемокинов при распознавании клетки-мишени. Для того чтобы тестировать, усиливает ли TriKE этот процесс, NK клетки и мишени HL-60 инкубировали без молекул, с 1633 BiKE или с 161533 TriKE, и супернатанты собирали после 24 ч и анализировали на воспалительные цитокины и хемокины (фиг. 2C). По сравнению с отсутствием лекарственного средства или с BiKE, TriKE значительно индуцировал секрецию IFNγ, TNFα, GM-CSF и MIP-1α. Эти данные показывают, что молекула IL-15 в TriKE может индуцировать секрецию провоспалительных цитокинов

и хемокинов, которые могут увеличивать противоопухолевую активность NK клеток.

161533 TriKE индуцирует выживаемость и размножение NK клеток после трансплантации

Одно терапевтическое преимущество IL-15 состоит в том, что он участвует в гомеостазе и размножении NK клеток. Таким образом, 161533 TriKE тестировали для того, чтобы оценивать, остаются ли эти биологические функции активными в молекуле TriKE. Для того чтобы тестировать это в физиологически релевантном контексте, использовали ранние образцы пациентов после трансплантации. Эти образцы обеспечивают ситуацию, в которой восстановление NK клеток необходимо для того, чтобы опосредовать реакции противоопухолевого трансплантата против лейкоза (GvL). Оценка моментов времени вскоре после трансплантации представляет особый интерес из-за дефектов в опосредованном NK-клетками индуцированном клетками-мишенями продуцировании цитокинов в те же самые моменты времени, которые могут объяснять ранний рецидив (Foley et al., 2014. Immunol Rev 258(1):45-63). PBMC пациента после трансплантации (или сутки 100 [n=5] или более ранние 20-44 [n=5] после трансплантации) метили красителем CELLTRACE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) для того, чтобы измерять пролиферацию, инкубировали с мишенями HL-60 и 1633 BiKE или 161533 TriKE в течение 7 суток и затем метили красителем Live/Dead для того, чтобы измерять выживаемость NK клеток. В PBMC, которые инкубировали с 1633 BiKE, большинство NK клеток встраивало краситель Live/Dead, что указывает на низкую выживаемость. В отличие от этого, PBMC пациентов, которые инкубировали с 161533 TriKE, подтверждали превосходную выживаемость NK клеток (фиг. 3A и 3B; 96,9±0,5% против 21±5,4%; $P < 0,0001$). Чтобы понять, управляет ли фрагмент IL-15 в 161533 TriKE также пролиферацией, оценивали разведение красителя CELLTRACE в жизнеспособной популяции NK клеток. Неожиданно 161533 TriKE индуцировал устойчивую и специфическую пролиферацию NK клеток в образцах пациентов после трансплантации, при минимальной пролиферации T-клеток (фиг. 3C и 3D) в том же образце (делилось 79,1±2,5% NK клеток против 2,3±1,1% T-клеток, $P < 0,0001$). NK клетки также имели значительно более высокий показатель размножения, чем цельные T-клетки (7,2±0,8% против 1,1±0,1%, $P < 0,0001$), который представляет общую кратность размножения. Это подсказывает, что активность IL-15 в 161533 TriKE может быть более специфичной к NK клеткам в результате фланкирующих молекул scFv в конструкции. Кроме того, инкубация NK клеток с 161533 TriKE вела к устойчивой пролиферации, которая отражала размножение, опосредованное насыщающей концентрацией IL-15. Таким образом, активирующий NK домен IL-15 в TriKE является функционально активным и способным доставлять сигнал самоподдержания в NK клетки здоровых доноров и/или может управлять выживаемостью и пролиферацией NK клеток пациента после трансплантации, условий, при которых восстановление NK клеток является дефектным.

161533 TriKE восстанавливает дефектную функцию NK клеток вскоре после трансплантации

После аллогенной трансплантации гематопоэтических стволовых клеток, возрастало число NK клеток, а также их ответ на стимуляцию IL-12 и IL-18, но проявлялась гипореактивность в течение больше чем 6 месяцев при экспозиции клеточным линиям злокачественных опухолей-мишеней. В этой ситуации кратковременная экспозиция инкубацией в течение ночи с IL-15 может восстанавливать функцию NK клеток против мишеней K562 (Foley et al., 2011, Blood 118(10):2784-2792). Принимая во внимание возможную клиническую разработку образцовой молекулы 161533 TriKE в качестве посттрансплантационной иммунотерапии, молекулы TriKE и сравнимые BiKE (1633)

тестировали на PBMC после трансплантации от реципиентов трансплантата аллогенных сибсовых гематопоэтических стволовых клеток (фиг. 4). 1633 BiKE или 161533 TriKE инкубировали с NK клетками в течение ночи для того, чтобы сделать возможным функциональное восстановление, и на следующее утро клетки инкубировали с мишенями HL-60 и анализировали функцию. Несмотря на то, что инкубация с 1633 BiKE вела к удвоению уничтожения мишеней HL-60 по сравнению с просто NK клетками против мишеней HL-60 (18,9±2,1% против 9±1,5%, P < 0,0001), инкубация с 161533 TriKE мощно восстанавливала опосредованную NK клетками цитотоксическую функцию в значительно более высокой степени (52,1±3,5%), чем с использованием BiKE (фиг. 4A). Увеличение цитотоксичности хорошо коррелировало с повышенной дегрануляцией, измеряемой по экспрессии CD107a (фиг. 4B и 4C, левая часть). По сравнению с BiKE, TriKE мощно восстанавливал продуцирование IFNγ (BiKE=2,6±0,5% против TriKE= 21,7±4,4%, P=0,0012) и TNFα (BiKE=6,1±1% против TriKE=29,9±3,8%, P < 0,0001) (фиг. 4B и 4C, центральные и правые части). Во всех анализах, TriKE индуцировал повышенную функциональность по сравнению с BiKE. Величина этих изменений ясно иллюстрирует иммунотерапевтический потенциал 161533 TriKE в ситуации сразу после трансплантации.

161533 TriKE увеличивает функцию NK клеток против первичных AML бластов

Для того чтобы сравнивать активность 1633 BiKE и 161533 TriKE против первичных AML бластов, PBMC от пациентов после трансплантации инкубировали с первичными AML бластами от двух различных пациентов (AML1 и AML2). Индуцирование CD107a, IFNγ и TNFα снижалось в случае первичных бластов по сравнению с мишенями HL-60 (фиг. 5 и фиг. 4). Снижение функции можно отчасти объяснять сниженной экспрессией CD33 на первичных бластах, но экспрессия ингибирующих лигандов или отсутствие лигандов активирующих рецепторов также может вносить вклад в сниженную функцию. Хотя не наблюдали значимые различия в активации NK клеток между AML1 и AML2 в одних и тех же условиях, PBMC из образцов пациентов после трансплантации, которые инкубировали с 161533 TriKE, значительно ($p<0,05$) индуцировали повышенную дегрануляцию (CD107a) и продуцирование цитокинов (IFNγ и TNFα) относительно PBMC, которые инкубировали с 1633 BiKE (фиг. 5A и фиг. 5B), что подсказывает, что комбинация активации, комбинированной с IL-15, эффективна против первичных AML мишеней. Взятые вместе, эти данные in vitro показывают, что 161533 TriKE может делать NK клетки антиген-специфическими против первичных опухолевых клеток.

161533 TriKE индуцирует усиленную выживаемость и функцию NK клеток in vivo

Сравнение активности BiKE и TriKE in vivo требовало создания модели мышиного ксенотрансплантата, которая одновременно приспособлена к прогрессированию CD33+ лейкоза и NK клеток человека. Клетки HL-60, содержащие репортер люциферазы, инъецировали внутривенно ($7,5\times10^5$ клеток/мышь) и затем через 3 суток инфузировали 1 миллион NK клеток человека, активированных в течение ночи с IL-15. На фиг. 6 представлены данные визуализации, которые изображают опухолевый груз HL-60-luc в каждой из групп лечения. Тогда как контрольная группа получала только клетки HL-60-luc, но не лекарственное средство или NK клетки, группы 1633 BiKE и 161533 TriKE получали клетки HL-60-luc и NK клетки. Лекарственное средство (50 мкг/кг) вводили MTWThF на всем протяжении исследования. В сутки 14 (фиг. 6B) группы BiKE и TriKE значительно ($p<0,05$) отличались от контрольной группы, но не друг от друга, что указывает на то, что в ранние моменты времени как BiKE, так и TriKE влияет на прогрессирование опухоли аналогичным образом. Однако в сутки 21 не удавалось найти значимых различий в выживании между группой без лекарственного средства и

группой BiKE, несмотря на то, что две мыши в группе без лекарственного средства погибли к этому моменту. С другой стороны, группа TriKE значительно ($p<0,05$) отличалась от контрольной группы и также в этот момент времени отличалась от группы BiKE, что указывает на превосходящий контроль опухолевой нагрузки HL-60 на более поздних стадиях с использованием терапии 161533 TriKE.

Принимая во внимание результаты выживаемости и пролиферации NK клеток, отмеченные в экспериментах in vitro на фиг. 3, увеличенный контроль опухоли HL-60-luc, создаваемый с помощью TriKE in vivo, может быть опосредован, по меньшей мере отчасти, увеличенным сохранением и размножением перенесенной популяции NK клеток через фрагмент IL-15 в молекуле 161533 TriKE. Таким образом, у мышей брали кровь (20 мкл) в сутки 20 и оценивали число событий с NK клетками (CD56+CD3-), полученных в течение фиксированного времени регистрации (60 с). Ни контроль, ни животные, которых лечили 1633 BiKE, не демонстрировали значимых свидетельств циркулирующих CD56+CD3- NK клеток человека, что указывает на слабую выживаемость и размножение при этих условиях (фиг. 6C и 6D). В отличие от этого, все животные, которых лечили 161533 TriKE, показывали высокие уровни NK клеток человека (4261±410,6 события). Мыши, которых лечили с использованием 161533 TriKE, имели уровни NK клеток, которые почти в 200 раз превышали BiKE NK уровни, что указывает на устойчивый биологический вклад молекулы IL-15 в качестве активирующего NK домена в молекулу TriKE. Таким образом, использование активирующего NK домена IL-15 в TriKE может снижать необходимость терапии, чтобы включать предоставление экзогенного IL-15 для поддержания числа NK клеток.

Влияние фланкирующих последовательностей и ориентации на активность TriKE

Разрабатывали вариант конструкции 161533 без фланкирующих последовательностей по обе стороны от IL-15 для того, чтобы тестировать влияние фланкирующих последовательностей на функциональность молекулы. Новый вариант, идентифицированный в настоящем описании как 161533NL (SEQ ID № 5), сравнивали с конструкцией 161533 (SEQ ID № 1) в анализах уничтожения с высвобождением хрома. На фиг. 7 показано, у двух независимых доноров (PB1 и PB2), что фланкирующие последовательности влияют на активность TriKE. Также конструировали ориентационные варианты с IL-15 в положениях N-конца (151633; SEQ ID № 6) и C-конца (163315; SEQ ID № 7). На фиг. 7 также показано, что конструкция 161533, которая содержит IL-15 в центральном положении в качестве сшивателя и имеет фланкирующие последовательности, ведет к более высокой цитолитической активности NK клеток. Без фланкирующих последовательностей 161533NL демонстрировал цитотоксичность при соотношении E:T 20:1 25% по сравнению с исходным 161533 дикого типа (57%), что подтверждает, что фланкирующие последовательности в целом увеличивают цитолитическую активность NK клеток, индуцированную конструкциями TriKE.

1615EpCAM TriKE

Для того чтобы конструировать самоподдерживающееся гибридное иммунное привлекающее средство, 1615EpCAM TriKE (фиг. 8A, SEQ ID № 8) собирали посредством встраивания IL-15 человека в EpCAM16 BiKE (фиг. 8B). Конструкция TriKE содержит фрагменты ДНК, кодирующие области V_H и V_L из scFv против CD16, сплайсированные с IL-15 и затем с областями V_H и V_L из scFv против EpCAM. Фрагмент ДНК IL-15 фланкирован с любой стороны сегментом в 20 аминокислот (а. о.) (SEQ ID № 3) и EASGGPE (SEQ ID № 4). Кривая поглощения для 1615EpCAM TriKE и EpCAM16 BiKE, элюированных из ионообменной колонки FFQ в виде первой фазы при очистке лекарственного средства с использованием протокола трехступенчатого элюирования,

представлена на фиг. 8C и 8D, соответственно. Первый пик, элюированный из колонки, представляет продукт, представляющий интерес. Когда осуществляли повторную укладку и очистку схожего количества телец включения, выход неожиданно улучшался при добавлении сшивателя IL-15. По сравнению с EpCAM16 BiKE, в 1615EpCAM TriKE поглощение возрастало почти втрое, что указывает на превосходящий выход. Гель SDS-PAGE и окрашивание кумаси синим показывают чистоту после очисток как на ионообменной, так и на эксклюзионной колонке (фиг. 8E и 8F), которые вели к продукту с чистотой более 90% при размере приблизительно 68860 кДа. Таким образом, точно как наблюдали при использовании 161533 TriKE (SEQ ID № 1), встраивание IL-15 непосредственно в гибрид TriKE дает превосходящие свойства очистки в сравнении с соответствующим BiKE, в этом случае EpCAM16, который не содержит IL-15.

1615EpCAM TriKE индуцирует высвобождение хрома-51

Для того чтобы определять функциональную активность 1615EpCAM, его способность к уничтожению измеряли в стандартных анализах высвобождения хрома-51 (фиг. 9). Для того чтобы определять эффект встраивания IL-15 в каркас EpCAM16, опосредованную NK клетками цитотоксичность оценивали у широкого спектра доноров, имеющих различные содержания NK клеток. Свежие выделенные PBMC добавляли в клетки HT-29 при соотношениях эффектор(E):мишень(T) 20:1, 6,6:1 и 2,2:1 и создавали цитолитические кривые. Сконструированные реактивы добавляли в концентрации 30 нМ (максимальная эффективная доза после экспериментов по титрованию). Доноры с 3,8%, 6,4%, 15% и обогащенными NK клетками >80% (как определяют с помощью проточной цитометрии) показывали, что компонент IL-15 в целом усовершенствует способности NK клеток к уничтожению (фиг. 9A, 9B, 9C и 9D, соответственно). На фиг. 9E приведены только кривые доноров для 1615EpCAM, подчеркивающие прямую корреляцию между увеличением присутствия NK и цитолитической активностью. На фиг. 9F показано, что для EpCAM16 такой корреляции не существует. Из-за вариаций базового уровня воспроизводимость обеспечивали посредством повторения с использованием различных доноров. Вместе данные показывают, что чем выше число NK клеток в анализе, тем выше наблюдаемая цитолитическая активность NK.

1615EpCAM TriKE индуцирует литическую дегрануляцию и экспрессию IFN-γ в различных клеточных линиях

Для того чтобы определять, индуцировали ли другие экспрессирующие EpCAM клеточные линии-мишени схожую опосредованную 1615EpCAM TriKE активацию NK клеток, как линия-мишень HT-29, функцию NK клеток тестировали на различных мишенях в сочетании с обработкой различными лекарственными средствами. Исследовали клеточные линии злокачественной опухоли молочной железы (фиг. 10A и 10B), злокачественной опухоли предстательной железы (фиг. 1C и 10D), злокачественной опухоли головы и шеи (фиг. 10E и 10F) и злокачественной опухоли яичников (фиг. 10G). Все линии EpCAM+ карцином, которые обрабатывали с использованием 1615EpCAM (SEQ ID № 8), индуцировали значительно повышенную дегрануляцию NK клеток ($p<0,001$) по сравнению с различными контролями, включая отдельно E:T, E:T+IL-15, E:T+CD16CD133 (нерелевантный BiKE), и E+IL-12/IL-18. E:T+EpCAM16 BiKE также демонстрировали заметные процентные доли клеток, экспрессирующих CD107a и цитотоксическую активность, поскольку BiKE обладает цитотоксической активностью, но не обладает способностью к росту. Таким образом, во всех случаях значения, наблюдаемые с использованием EpCAM16 BiKE, значительно меньше значений, наблюдаемых для 1615EpCAM ($p<0,001$).

1615EpCAM TriKE индуцирует пролиферацию NK клеток

Способность 1615EpCAM TriKE (SEQ ID № 8) индуцировать пролиферацию NK клеток показана на фиг. 11. Когда PBMC доноров экспонировали для TriKE, NK клетки, но не Т-клетки, демонстрировали специфический паттерн пролиферации, как измеряли посредством проточной цитометрии (фиг. 11A). Результаты идентичны у трех из четырех доноров. Когда экспонировали для TriKE, NK клетки подвергались более устойчивой пролиферации, чем Т-клетки. На фиг. 11B представлено непосредственное сравнение NK-пролиферации, индуцированной с использованием EpCAM16 BiKE и 1615EpCAM TriKE. TriKE индуцирует пролиферацию и размножение, а BiKE - нет. Для того чтобы исключать возможность других факторов, которые могут индуцировать пролиферацию NK клеток, PBMC экспонировали для TriKE, BiKE, отдельно scFv против CD16, отдельно IL-15, отдельно scFv против EpCAM или DT2219 (направленного токсина, содержащего дифтерийный токсин, связанный с scFv против CD22 и scFv против CD19). Только обработанные TriKE группы и обработанные IL-15 группы демонстрировали значительную пролиферацию NK клеток, как показывали изменения показателя размножения (фиг. 11C), который отражает кратность размножения клеток. Группа, стимулированная с использованием TriKE, демонстрировала более высокую выживаемость NK клеток, тогда как группа, которую экспонировали для BiKE, содержала преимущественно погибшие клетки, как подтверждали проточной цитометрией прямого/бокового рассеяния (фиг. 11D) и окрашиванием трипановым синим. Эти данные показывают, что помимо увеличения примирования клеток, фрагмент IL-15 в 1615EpCAM TriKE также индуцирует размножение и поддержание NK клеток.

1615EpCAM TriKE индуцирует литическую дегрануляцию и экспрессию IFN-γ против клеток-мишеней HT-29

Для того чтобы исследовать литическую дегрануляцию в качестве параметра активности NK клеток, экспрессию CD107a измеряли в CD56+/CD3- популяции NK клеток, которую инкубировали с экспрессирующими EpCAM мишенями HT-29. Клетки, которые инкубировали с EpCAM16 BiKE, демонстрировали повышенную экспрессию CD107a по сравнению с отдельно эффекторами, эффекторами+мишенями без лекарственного средства или эффекторами+мишенями с scFv против EpCAM. 1615EpCAM TriKE индуцировал значительно большую экспрессию CD107a, чем BiKE (фиг. 12A). 1615EpCAM также индуцировал значительно повышенную дегрануляцию по сравнению с исчерпывающей панелью контролей (в том числе отдельно E:T, E:T плюс scFv против EpCAM, свободный от 1615, отдельно E:T плюс scFv против CD16, CD2219 и E:T плюс комбинация IL-12 и IL-18), которые не оказывали какого-либо эффекта. Два различных источника обособленного IL-15, когда его комбинировали с E:T, также не смогли усиливать литическую дегрануляцию (сам IL-15, линкерный белок; IL-15 NCI, полученный из NCI). Продуцирование IFN-γ также усиливали в обработанных 1615EpCAM TriKE NK клетках по сравнению с NK клетками, которые обрабатывали с использованием BiKE отдельно или BiKE плюс IL-15, что указывает на биологическую способность фрагмента IL-15 внутри TriKE индуцировать примирование для секреции цитокинов (фиг. 12B). Как и ранее, TriKE тестировали против исчерпывающей панели контролей, в которой только сверхфизиологическая стимуляция IL-12/IL-18 превосходила TriKE.

На фиг. 12C не наблюдали экспрессию CD107a, когда NK клетки инкубировали с контрольными EpCAM- клетками миелолейкоза HL-60. Не наблюдали повышения экспрессии IFN-γ, как ожидали, с использованием мишеней HL-60 отрицательного контроля, за исключением контрольных клеток, которые обрабатывали с использованием IL-12/IL-18, что показывает, что анализ IFN-γ работал (фиг. 1D).

1615EpCAM133 индуцирует высвобождение хрома-51

Схема сконструированного тетраспецифического 1615EpCAM133 (SEQ ID № 9) показана на фиг. 13. Активность 1615EpCAM133 оценивали в анализе высвобождения хрома для того, чтобы измерять уничтожение NK клетками. Анализ осуществляли с использованием мишеней Caco-2 (CD133+, EpCAM-) и HT-29 (CD133-, EpCAM+) и свежих выделенных NK клеток двух доноров (PT1 и PT2) для каждой клеточной линии злокачественной опухоли, без антитела (без Ab), с scFv против CD16, scFv против CD133, scFv против EpCAM, IL-15 отдельно и EpCAM16 BiKE в качестве контролей. У всех доноров и в клетках злокачественных опухолей обоих типов 1615EpCAM133 демонстрировал превосходящее уничтожение при увеличении соотношений E:T (фиг. 14A-D). Контроли демонстрировали минимальную активность. Эти данные показывают, что возможно направленное воздействие на два различных фрагмента на опухолевой клетке. В этом случае один представляет собой более широкую мишень эпителиального маркера (EpCAM) и другой представляет собой более специфическую мишень CD133 против злокачественных стволовых клеток.

1615EpCAM133 индуцирует пролиферацию NK клеток

Способность 1615EpCAM133 к избирательному связыванию представлена на фиг. 15A и 15B. Способность фрагмента IL-15 в молекуле индуцировать пролиферацию и выживаемость представлена на фиг. 15C-F. Очищенные NK клетки экспонировали для scFv против CD16, scFv против CD133, 1615EpCAM133, DT2219 (мутантный дифтерийный токсин, связанный с scFv против CD22 и против CD19), scFv против EpCAM, EpCAM16 BiKE или IL-15 отдельно (NCI). Показатель размножения, который определяет общее размножение культуры, показывал значительно усиленное размножение в группах 1615EpCAM133 и IL-15 ($p<0,001$) (фиг. 15C). Для того чтобы сравнивать способность линкера IL-15 индуцировать пролиферацию, PBMC или очищенные NK клетки культивировали после окрашивания реакционноспособным красителем и экспонировали для EpCAM16 BiKE или тетраспецифической молекулы 1615EpCAM133. После инкубации осуществляли проточную цитометрию на CD56+ CD3- субпопуляции клеток для того, чтобы оценивать NK клетки, и на CD56-CD3+ клетках для того, чтобы оценивать T-клетки. На фиг. 15D только NK клетки, которые обрабатывали с использованием 1615EpCAM133, демонстрировали существенную пролиферацию. Обработка с использованием EpCAM16 BiKE - нет. Способность индуцировать специфическую пролиферацию в NK клетку представлена на фиг. 15E; T-клетки не пролиферировали после экспозиции для 1615EpCAM133.

Для того чтобы исследовать способность 1615EpCAM133 усиливать выживаемость NK клеток, очищенные NK клетки совместно культивировали в течение 7 суток и обрабатывали с использованием 1615EpCAM133 или EpCAM16 BiKE. После окрашивания живых-погибших через проточную цитометрию, в группе 1615EpCAM133 наблюдали значительно более высокие процентные доли живых NK клеток (фиг. 15F).

1615133 индуцирует высвобождение хрома-51

Схема сконструированного 1615133 представлена на фиг. 16. Для того чтобы оценивать функциональную активность 1615133 TriKE, осуществляли стандартный анализ высвобождения хрома-51. Для того чтобы определять эффект встраивания IL-15 в каркас 16133, цитотоксичность оценивали с использованием NK клеток двух отдельных доноров и опухолевых мишеней Caco-2 при различных соотношениях E:T (20:1, 10:1 и 5:1) и сравнивали активность между обработкой 1615133 TriKE, 16133 BiKE, scFv против CD16, scFv против CD133 и без обработки лекарственным средством (фиг. 17A и 17B). Уничтожение мишеней Caco-2 было повышено в TriKE по сравнению с контролями. Дозозависимое титрование 1615133 TriKE (1 нМ, 5 нМ и 10 нМ) с более

широким диапазоном соотношений E:T (20:1, 6,6:1, 2,2:1, 0,7:1, 0,23:1 и 0,08:1) демонстрировало наивысшее влияние активности лекарственного средства при наивысших дозах (фиг. 17C). Для того чтобы оценивать специфичность связывания, измеряли интенсивность флуоресценции на основе проточной цитометрии после инкубации клеток Caco-2 с FITC-меченным 1615133 TriKE в различных концентрациях (1 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 200 нМ или 500 нМ). Когда не меченный scFv против CD133 (200 нМ) добавляли наряду с 1615133 TriKE, происходило резкое снижение связывания (фиг. 17D), что указывает на то, что 1615133 TriKE связывается с клетками-мишенями специфически через взаимодействие с CD133. Вместе эти данные показывают, что ADCC, опосредованная TriKE, направлена на антиген.

1615133 индуцирует пролиферацию NK клеток

Пролиферацию, индуцируемую с помощью 1615133 (SEQ ID № 10), измеряли посредством разведения красителя CELLTRACE в популяциях жизнеспособных NK и T-клеток. Когда PBMC донора экспонировали для 1615133 TriKE или 16133 BiKE, только группа TriKE индуцировала пролиферацию (фиг. 18A). Что важно, сравнение с другими контрольными средствами, включая scFv против CD16, scFv против CD133, DT2219 (направленный токсин, состоящий из scFv против CD22 и против CD19, связанных с дифтерийным токсином) и IL-15, полученный из NCI, показывало, что только 1615133 TriKE и NCI IL-15 индуцировали пролиферацию. Чтобы показать потенциал 1615133 TriKE к индуцированию пролонгированной выживаемости, очищенные NK клетки инкубировали в течение 7 суток с 1615133 или 16133 BiKE. Реакционноспособный краситель использовали для того, чтобы количественно определять гибель клеток в различных группах обработки. Группа TriKE показывала более высокое количество живых клеток, в которые реакционноспособный краситель не встраивался, по сравнению с BiKE (фиг. 18B). Вместе результаты показывают, что IL-15, присутствующий в 1615133 TriKE, индуцирует пролиферацию NK клеток и их пролонгированную выживаемость.

TriKE в целом индуцируют высвобождение хрома-51

Анализы высвобождения ^{51}Cr осуществляли с использованием нескольких различных TriKE, чтобы показывать, что любой scFv, который направлен на клетки злокачественной опухоли, можно встраивать в функциональный TriKE. Клетки немелкоклеточной злокачественной опухоли легких (NCI-H460) инкубировали с 1615EPCAM133 TriKE (SEQ ID № 9) или 1615NG2 TriKE. Как 1615NG2, так и 1615EpCAM133 имел активность при нескольких различных соотношениях E:T (20:1, 10:1 и 5:1). На фиг. 19B показаны клетки меланомы, которые инкубировали с 1615EPCAM133 TriKE. Мезотелин+EpCAM-NG2 клетки меланомы MDA-435A инкубировали с 1615EPCAM TriKE или 1615Meso TriKE (SEQ ID № 11). Только 1615Meso имел активность. Клетки злокачественной опухоли яичника (клетки Ovcar3) инкубировали с 1615NG2 TriKE или 1615Meso TriKE. Оба TriKE индуцировали NK цитолитическую активность. Также создавали TriKE против лейкоза, распознающий маркеры лейкоза CD19 и CD22. 16152219 TriKE тестировали на CD22+CD19+ клетках Raji, и он уничтожал их очень хорошо (а также ритуксимаб). Вместе эти данные показывают, что любые scFv можно вставлять в обобщенную структурную платформу TriKE 1615X, и получаемые TriKE могут направлять NK клетки для того, чтобы отвечать на мишень scFv и расти. Дополнительные образцовые молекулы TriKE перечислены в таблице 3.

Таблица 3. Образцовые молекулы TriKE

Молекула TriKE	Мишень(и)	ADCC*	Размножение**	Активация***

161533	CD33	+	+	+
1615EpCAM	EpCAM	+	+	+
1615EpCAM133	EpCAM/CD133	+/+	+/+	+/+
1615133	CD133	+	+	+
1615NG2	NG2	+	+	+
1615Meso	Мезотелин	+	+	+
1615ROR-1	ROR-1	+	+	+
16a1538	CD38	+	+	+
1615IGF-1	IGF1	+	+	+
1615Her2	Her2/neu	+	+	+
16152219	CD22/CD19	+/+	+/+	+/+
Llama161533	CD33	+	+	+
1615HIV	HIV	+	+	+

*ADCC или цитотоксическую активность усиливали на 30% с помощью платформы TriKE

**Размножение: TriKE усиливает размножение NK клеток, BiKE - нет.

***Активация: TriKE усиливает продуцирование различных цитокинов против злокачественных опухолей, включая INFγ и TNFα.

Идентичным образом получали и тестировали несколько TriKE, направленных на различные маркеры злокачественных опухолей. CD33 или Siglec-3 (иммуноглобулиноподобный лектин 3, связывающий сиаловую кислоту, SIGLEC3, SIGLEC-3, gp67, p67) представляет собой трансмембранный рецептор, экспрессируемый на клетках миелоидной линии дифференцировки. Обычно его считают миелоидоспецифичным. EpCAM, молекула адгезии эпителиальных клеток, представляет собой трансмембранный гликопротеин, опосредующий Ca^{2+}-независимую гомотипическую адгезию между клетками в эпителии. CD133, также известный как проминин-1, представляет собой гликопротеин, который у человека кодируется геном PROM1 и является членом пентаспановых трансмембранных гликопротеинов (5-трансмембранных, 5-TM), которые специфически локализованы в клеточных выпячиваниях. NG2 представляет собой хондроитинсульфатный протеогликан 4, также известный как ассоциированный с меланомой хондроитинсульфатный протеогликан (MCSP) или нейроглиальный антиген 2 (NG2). Он представляет интегрированный мембранный хондроитинсульфатный протеогликан, экспрессируемый клетками злокачественной опухоли меланомы человека. Мезотелин представляет собой белок в 40 кДа, присутствующий на нормальных мезотелиальных клетках и сверхэкспрессированный в нескольких опухолях человека, в том числе мезотелиоме и аденокарциноме яичников и поджелудочной железы. ROR-1 представляет собой рецепторную тирозинкиназу, которая модулирует рост невритов. Она представляет собой мембранный белок I типа, относящийся к подсемейству ROR рецепторов клеточной поверхности, и в настоящее время идут исследования его роли в метастазировании клеток злокачественной опухоли. HER2 является членом семейства рецептора эпидермального фактора роста человека (HER/EGFR/ERBB). CD38 (кластер дифференцировки 38), также известный как гидролаза циклической ADP рибозы, представляет собой гликопротеин, найденный на поверхности многих клеток иммунной системы. IGF-1 представляет собой инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), также называемый соматомедином C. IGF-1 представляет собой белок, который у человека кодируется геном IGF1 и связан со злокачественной опухолью молочной железы. Вирус иммунодефицита человека (HIV) представляет собой лентивирус (подгруппа ретровирусов), который вызывает ВИЧ-инфекцию и с течением времени синдром

приобретенного иммунодефицита (AIDS) и саркому Капоши.

CD3-IL2-EpCAM TriKE избирательно усиливает пролиферацию Т-клеток

Синтезировали TriKE, которые работают с IL-2 вместо IL-15, с теми же фланкирующими последовательностями. Они стимулируют размножение Т-клеток вместо NK клеток. TriKE CD3-IL-2-EpCAM, направленное на Т-клетки (SEQ ID № 13), синтезировали и тестировали на его способность стимулировать Т-клетки вместо NK клеток (фиг. 20). Известно, что IL-2 является более хорошим стимулятором Т-клеточной пролиферации, чем IL-15. PBMC метили CELLTRACE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) и помещали в культуру. Гистограмма показывает, что CD3-IL-2-EpCAM вызывал устойчивую пролиферацию Т-клеток, но не NK клеток. CD3-IL-2-EpCAM демонстрировал более хорошую стимуляцию, чем любое другое средство, которое тестировали, включая 1615EpCAM TriKE (положительный контроль), CD3EpCAM BiTE, CD3-IL-2-EpCAM, IL-2 или отсутствие лечения. Эти данные показывают, что IL-2 работает аналогичным образом, как IL-15, когда его используют в качестве сшивателя на этой платформе.

Таким образом, в этом раскрытии описана разработка и использование триспецифического привлекающего киллеры средства (TriKE), способного создавать иммунологические синапсы между NK клетками и мишенью. CD33+ миелоидную мишень использовали в качестве модельной мишени для модельного TriKE, которое содержало антитело против CD16 в качестве модельного привлекающего NK домена, антитело против CD33 в качестве модельного направляющего домена, который направлен на CD33+ миелоидную мишень, модельный активирующий NK домен на основе IL-15 и фланкирующие последовательности по обе стороны от активирующего NK домена, связывающие активирующий NK домен с остальными доменами. Фланкирующие последовательности представляют собой PSGQAGAAASESLFVSNHAY (SEQ ID № 3) выше активирующего NK домена и EASGGPE (SEQ ID № 4) ниже активирующего NK домена. Фланкирующие последовательности влияют на функциональную активность молекул TriKE и являются полностью неожиданной находкой.

Одно образцовое модельное TriKE (161533, SEQ ID № 1) проявляло повышенную функцию относительно сравнимого биспецифического привлекающего киллеры средства (1633 BiKE, SEQ ID № 2) в анализах цитотоксичности, CD107a дегрануляции и продуцирования цитокинов при опосредованных NK-клетками ответах на мишени HL-60. Активность образцового модельного TriKE в физиологическом контексте оценивали с использованием NK клеток пациентов, собранных вскоре после аллогенной трансплантации стволовых клеток, в контексте, в котором функция NK клеток является дефектной. По сравнению с 1633 BiKE, TriKE, содержащее активирующий NK домен IL-15, индуцировало выживаемость и пролиферацию NK клеток, но не Т-клеток. Образцовая модельная молекула TriKE также индуцировала гипочувствительные NK клетки пациента на опосредование мощных ответов на мишени первичного острого миелолейкоза. Наконец, образцовая модельная молекула TriKE проявляла превосходящую противоопухолевую активность по сравнению со сравнимым BiKE и индуцировала персистенцию и выживаемость NK клеток человека in vivo в течение по меньшей мере 3 недель в ксеногенной модели с использованием HL-60-Luc и NK клеток человека.

Данные, представленные в настоящем описании, подтверждают полезность образцовой молекулы TriKE и предоставляют основание для разработки и конструирования альтернативных молекул TriKE. Как подробно описано выше, молекулу TriKE можно разрабатывать с использованием любого подходящего привлекающего NK домена и/или любого подходящего направляющего домена.

Образцовое 161533 TriKE (SEQ ID № 1) использовали в качестве модели, поскольку CD16 экспрессирован на поверхности NK клеток. Таким образом, scFv, который избирательно связывается с NK клетками, можно использовать в качестве привлекающего домена NK клеток. CD33 экспрессирован на клетках острого миелолейкоза AML (обычная форма лейкоза взрослых), но также встречается на миелодиспластических клетках, что может сигнализировать о предрасположенности к AML. Таким образом, и scFv против CD33 можно использовать в качестве направляющего домена.

Однако в альтернативном варианте осуществления антитело против EpCAM можно использовать в направляющем домене TriKE. EpCAM представляет собой маркер эпителиальных злокачественных опухолей, экспрессируемый на карциномах большинства типов, включая, например, злокачественные опухоли легких, молочной железы, ободочной и прямой кишки, предстательной железы, поджелудочной железы, ЖКТ, почек и яичников. Данные, показывающие, что TriKE (1615EpCAM, SEQ ID № 8), которое содержит scFv против EpCAM, усиливает уничтожение клеток злокачественной опухоли толстой кишки, указывают на то, что любой подходящий направляющий домен (например, любой подходящий scFv) можно включать в TriKE на основании платформы против CD16/IL15 со схожим успехом. 1615EpCAM TriKE содержит scFv против CD16 в качестве привлекающего NK домена и активирующий NK домен IL-15 и scFv против EpCAM в качестве направляющего домена.

В еще одном другом альтернативном варианте осуществления известно, что CD38 экспрессирован на множестве миеломных клеток. Данные, показывающие, что TriKE (16a1538, SEQ ID № 16), который содержит scFv против CD38, усиливает уничтожение множества миеломных клеток in vitro, кроме того, указывают на общую модульность платформы TriKE. 16a1538 TriKE содержит scFv против CD16a в качестве привлекающего NK домена, активирующий NK домен IL-15 и scFv против CD38 в качестве направляющего домена. Наконец, можно создавать TetraKE (тетрамер) посредством разработки молекулы, которая содержит второй направляющий домен. Например, можно разрабатывать TetraKE, которое содержит scFv против CD133 (SEQ ID № 17), например, в 1615EpCAM TriKE (SEQ ID № 8), чтобы формировать образцовое TetraKE (1615EpCAM133, SEQ ID № 9). CD133 является установленным маркером на злокачественных стволовых клетках. Злокачественные стволовые клетки представляют небольшую популяцию стволовых клеток в опухоли, которые отвечают за возникновение, обновление и химиотерапевтическую устойчивость опухоли.

В некоторых вариантах осуществления в этом раскрытии описано иммунное привлекающее средство, которое одновременно опосредует ADCC и обеспечивает сигнал самоподдержания, индуцирующий размножение и поддержание эффекторных NK клеток. Несмотря на то, что BiKE, которое содержит scFv против CD16, сплайсированный с scFv против EpCAM, содействовало формированию иммунного синапса между эффекторными NK клетками и экспрессирующими EpCAM клетками карциномы, что приводило к достижению цитотоксической дегрануляции в ADCC клетках-мишенях, как цитотоксическая активность, так и долговечность NK могут выиграть от добавления костимуляторного сигнала, который усиливает размножение эффекторных клеток непосредственно в месте иммунного привлечения. В некоторых вариантах осуществления этот костимуляторный сигнал обеспечивают посредством добавления средства, хорошо подходящего для роста NK клеток. Например, для того, чтобы содействовать избирательному размножению NK, IL-15 сшивали с EpCAM16 BiKE. Как показано в примере 2, добавление молекулы IL-15 в иммунное привлекающее

средство может опосредовать пролиферацию NK, может вызывать длительную ADCC активность и может усовершенствовать литическую дегрануляцию и секрецию цитокинов посредством иммунного привлекающего средства.

В некоторых вариантах осуществления привлекающее NK клетки средство может включать использование гуманизированного CD16 привлекающего средства, полученного из нанотела животного. Хотя scFv имеет вариабельный компонент тяжелой цепи и вариабельный компонент легкой цепи, соединенные линкером, нанотело состоит из одной мономерной вариабельной цепи, т.е. вариабельной тяжелой цепи или вариабельной легкой цепи, которая способна специфически привлекать мишень. Нанотело можно получать из антитела любого подходящего животного, например, такого как верблюдовое (например, лама или верблюд) или хрящевая рыба. Нанотело может обеспечивать превосходящую физическую стабильность, способность связывать глубокие канавки и увеличенный выход продуцирования по сравнению с более крупными фрагментами антител.

В одном образцовом варианте осуществления молекула привлекающего NK средства на основе нанотела может содержать гуманизированное нанотело к CD16, полученное из опубликованного нанотела ламы (последовательность GeneBank EF561291; Behar et al., 2008. Protein Eng Des Sel. 21(1):1-10), называемого EF91. EF91 ламы изначально встраивали в BiKE, содержащее CD19, чтобы тестировать способность этого CD16 привлекающего средства управлять активацией NK клеток. Оно демонстрировало функциональность, схожую с опосредованным ритуксимабом уничтожением в анализе высвобождения хрома с мишенями Raji (фиг. 22A). После подтверждения функциональности молекулы, CDR клонировали в гуманизированный каркас верблюдовых (Vincke et al., 2009. J Biol Chem. 284(5):3273-3284), чтобы гуманизировать CD16 привлекающее средство, сейчас называемое HuEF91. Связывание HuEF91 представлено на фиг. 22B, и оно эквивалентно связыванию, которое наблюдали с использованием стандартного CD16 scFv, что указывает на то, что встраивание вариабельной тяжелой цепи нанотела ламы в гуманизированный остов не создает пространственного затруднения для специфичности молекулы. Использование HuEF91 в качестве привлекающего NK средства в молекулах TriKE, описанных в настоящем описании, позволяет увеличивать лекарственный выход, повышать стабильность и/или увеличивать опосредованный NK клетками ADCC эффект.

В некоторых вариантах осуществления иммунное привлекающее средство, как раскрыто в настоящем описании, можно использовать для того, чтобы стимулировать собственную иммунную систему пациента для элиминации опухолевых клеток. Несмотря на то, что исследования показывают, что T-клетки, генетически модифицированные для того, чтобы экспрессировать химерные антигенные рецепторы (CAR), являются мощными клиническими медиаторами противоопухолевой активности, производство T-CAR является дорогим и сложным. Другие недостатки включают риск цитокиновой токсичности и долгосрочной персистенции T-CAR, что ведет ко взаимодействию со здоровой тканью или неопластической трансформации. Как раскрыто в настоящем описании, триспецифическое привлекающее киллеры средство может служить в качестве медиатора ADCC и позволяет растить NK клетки без необходимости экстракорпоральной генетической модификации и генной терапии, что дает потенциальное преимущество над системой T-CAR. Поскольку иммунное привлекающее средство быстро выводится, ответ не может поддерживаться неограниченно, что, возможно, снижает риск цитокиновой токсичности иммунных привлекающих средств по сравнению с T-CAR.

В некоторых вариантах осуществления триспецифическое привлекающее киллеры

средство включает цитокин. В некоторых вариантах осуществления триспецифическое привлекающее киллеры средство предпочтительно включает IL-15. IL-15 не индуцирует Treg, и IL-15 является регулятором NK клеток. В дополнение к усовершенствованию активации и цитотоксичности, IL-15 может регулировать и инициировать антиапоптозные и пролиферативные сигналы на NK клетках, что ведет к увеличенным размножению NK клеток и выживаемости. Эти характеристики могут быть полезны во время использования триспецифического привлекающего киллеры средства при лечении злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления включение IL-15 в триспецифическое привлекающее киллеры средство позволяет опосредовать направленную доставку TriKE в синапс NK/клетка-мишень, что потенциально вызывает накопление IL-15 в локализации опухоли более эффективно, чем системный IL-15.

В некоторых вариантах осуществления триспецифическое привлекающее киллеры средство предпочтительно содержит IL-15, scFv против CD16 и scFv против EpCAM (1615EpCAM TriKE). В некоторых вариантах осуществления IL-15 выполняет функцию сшивателя между scFv против CD16 и scFv против EpCAM.

В некоторых вариантах осуществления иммунное привлекающее средство увеличивает секрецию цитокина, опосредованного клеткой иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления секреция цитокинов предпочтительно является антиген-специфической. В некоторых вариантах осуществления этот цитокин может включать IFN-γ, GM-CSF, IL-6, IL-8 и/или TNF-α. В некоторых вариантах осуществления это продуцирование цитокинов предпочтительно находится на физиологических уровнях. В некоторых вариантах осуществления это продуцирование цитокинов находится на уровне, который ниже уровня, наблюдаемого в стимулированной IL-12/IL-18 NK клетке (Papadakis et al., 2004. J Immunol. 172:7002-7007). Как показано в примере 2, измерение отличительных воспалительных цитокинов, включая GM-CSF, IL-6, IL-8, TNF-α, с использованием анализа цитокинов Luminex демонстрирует статистически значимую разницу в секреции GM-CSF между BiKE и TriKE, но не разницу в секреции других цитокинов.

В некоторых вариантах осуществления иммунное привлекающее средство усиливает пролиферацию лимфоцита. Лимфоцит может включать, например, NK клетку, γδ-T-клетку и/или CD8 T-клетку.

Аналогично молекуле 1615EpCAM133 TetraKE, которая содержит больше чем один направляющий домен, можно разрабатывать TetraKE или более крупную молекулу, которая содержит больше чем один домен привлекающего NK клетки средства и/или больше чем один активирующий NK домен.

В другом аспекте этого раскрытия описаны способы уничтожения клетки-мишени у субъекта. В целом, способ включает введение субъекту молекулы TriKE в количестве, эффективном для того, чтобы индуцировать NK-опосредованное уничтожение клеток-мишеней. «Лечить» или его вариации относятся к снижению, ограничению прогрессирования, улучшению или разрешению, в любой мере, симптомов или признаков, связанных с состоянием. Как используют в настоящем описании, «улучшать» относится к любому снижению степени, тяжести, частоты и/или вероятности характеристики симптома или клинического признака конкретного состояния; «симптом» относится к любому субъективному свидетельству заболевания или состояния пациента; и «признак» или «клинический признак» относится к объективной физической находке, связанной с конкретным состоянием, которую может найти некто, отличный от пациента.

«Лечение» может быть терапевтическим или профилактическим. «Терапевтическое»

и его вариации относятся к лечению, которое улучшает один или более существующих симптомов или клинических признаков, связанных с состоянием. «Профилактическое» и его вариации относятся к лечению, которое ограничивает, в любой мере, развитие и/или возникновение симптома или клинического признака состояния. В целом, «терапевтическое» лечение начинают после манифестации состояния у субъекта, тогда как «профилактическое» лечение начинают до манифестации состояния у субъекта. Таким образом, в определенных вариантах осуществления способ может включать профилактическое лечение субъекта с риском развития состояния. «С риском» относится к субъекту, который фактически может или не может иметь описанный риск. Таким образом, например, субъектом «с риском» развития точно определенного состояния является субъект, который имеет один или более признаков повышенного риска наличия или развития точно определенного состояния по сравнению с индивидуумами, которые не имеют один или более признаков, независимо от того, происходит ли у субъекта манифестация любого симптома или клинического признака наличия или развития состояния. Образцовые признаки состояния могут включать, например, генетическую предрасположенность, семейный анамнез, возраст, пол, географическое местоположение, образ жизни или медицинский анамнез. Лечение также можно продолжать после разрешения симптомов, например, для того, чтобы предотвращать или задерживать их рецидив.

В некоторых случаях лечение может включать введение молекулы TriKE субъекту с тем, чтобы молекула TriKE могла стимулировать эндогенные NK клетки in vivo. Использование молекулы TriKE в качестве части in vivo позволяет делать NK клетки антиген-специфическими при одновременной совместной стимуляции, увеличении выживаемости и размножения, которые могут быть антиген-специфическими. В других случаях TriKE можно использовать in vitro в качестве адъюванта для терапии адоптивным переносом NK клеток.

В другом аспекте TriKE можно разрабатывать для того, чтобы активировать Т-клетки вместо NK клеток. В этом аспекте TriKE в целом может содержать один или более привлекающих Т-клетки доменов, один или более активирующих Т-клетки доменов и один или более направляющих доменов (которые направлены, например, на опухолевую клетку или инфицированную вирусом клетку) и один или более активирующих Т-клетки доменов (например, IL-2 или другой усиливающий Т-клетки цитокин, хемокин и/или активирующую молекулу), причем каждый домен функционально связан с другими доменами.

Привлекающий Т-клетки домен может содержать любой фрагмент, который связывается с Т-клеткой и/или активирует ее, и/или любой фрагмент, который блокирует ингибирование Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления привлекающий Т-клетки домен может содержать антитело или его фрагмент, которые избирательно связываются с компонентом поверхности Т-клетки. В других вариантах осуществления привлекающий Т-клетки домен может содержать лиганд или низкомолекулярное соединение, которые избирательно связываются с компонентом поверхности Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления привлекающий Т-клетки домен может избирательно связываться с рецептором, по меньшей мере частично расположенным на поверхности Т-клетки. В определенных вариантах осуществления привлекающий Т-клетки домен может выполнять функцию связывания Т-клетки и, тем самым, приведения Т-клетки в пространственную близость с мишенью, с которой направляющий домен, описанный более подробно далее, избирательно связывается. Однако в определенных вариантах осуществления привлекающий Т-клетки домен может

избирательно связываться с рецептором, который активирует Т-клетку и, следовательно, также обладает активирующей функцией.

Хотя описан в настоящем описании в контексте различных вариантов осуществления, в которых привлекающий Т-клетки домен содержит scFv против рецептора CD3, привлекающий Т-клетки домен может содержать любое антитело или другой лиганд, которые избирательно связываются с рецептором CD3. Кроме того, привлекающий Т-клетки домен может содержать антитело или лиганд, которые избирательно связываются с любым Т-клеточным рецептором, например, такое как антитело против CD4, антитело против CD8, антитело против LFA-1, антитело против LFA-2, антитело против CTLA4, антитело против TCR, антитело против CD28, антитело против CD25, антитело против PD1, PD-1L, B7-1, B7-2, молекулы MHC, CD80, CD86, B7H, антитело против SLAM или антитело против BTLA.

Направляющий домен может содержать любой фрагмент, который избирательно связывается с планируемой мишенью, такой как, например, опухолевая клетка, мишень в строме злокачественной опухоли, мишень на ингибирующей клетке, такой как супрессорные клетки миелоидного происхождения, которые являются CD33+, или мишень на инфицированной вирусом клетке. Таким образом, направляющий домен может содержать, например, любой один из направляющих доменов, описанных выше в контексте NK-активирующих молекул TriKE.

Активирующий Т-клетки домен может содержать аминокислотную последовательность, которая активирует Т-клетки, содействует поддержанию Т-клеток или иным образом содействует активности Т-клеток. Активирующий Т-клетки домен может представлять собой или может быть получен из одного или более цитокинов, которые могут активировать и/или поддерживать Т-клетки. Как используют в настоящем описании, термин «полученный из» относится к аминокислотному фрагменту цитокина (например, IL-2), которого достаточно для того, чтобы обеспечивать активацию и/или поддержание активности Т-клеток. В вариантах осуществления, которые включают больше чем один Т-активирующий домен, Т-активирующие домены можно предоставлять последовательно или в любой другой комбинации. Дополнительно, каждый Т-активирующий домен на основе цитокина может содержать или полную аминокислотную последовательность цитокина или может представлять собой аминокислотный фрагмент, независимо от природы других активирующих Т-клетки доменов, включенных в молекулу TriKE. Образцовые цитокины, на которых может быть основан активирующий Т-клетки домен, включают, например, IL-2 или любой цитокин семейства IL-2, который имеет общую цепь с рецептором IL-2, например, такой как IL-15, IL-4, IL-7, IL-9, IL-21 и IL-13. Таким образом, хотя в настоящем описании описано подробно в контексте образцового модельного варианта осуществления, в котором активирующий Т-клетки домен получают из IL-2, TriKE можно разрабатывать с использованием активирующего Т-клетки домена, который представляет собой любой подходящий цитокин или который получают из него.

Для краткости этого описания, упоминание об активирующем Т-клетки домене посредством идентификации цитокина, на котором он основан, включает как полную аминокислотную последовательность цитокина, так и любой подходящий аминокислотный фрагмент цитокина. Таким образом, упоминание об активирующем Т-клетки домене «IL-2» включает активирующий Т-клетки домен, который содержит полную аминокислотную последовательность IL-2, или активирующий Т-клетки домен, который содержит фрагмент IL-2. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления активирующий Т-клетки домен может содержать аминокислотную последовательность

SEQ ID № 18.

В другом аспекте этого раскрытия описаны способы уничтожения клетки-мишени у субъекта. В целом, способ включает введение субъекту молекулы TriKE в количестве, эффективном для того, чтобы индуцировать опосредованное Т-клетками уничтожение клеток-мишеней. Здесь также лечение может быть терапевтическим или профилактическим, как описано выше в контексте способов, которые включают использование NK-активирующего TriKE.

Соответственно, молекулу TriKE, будь то NK-активирующее TriKE или активирующее Т-клетки TriKE, можно вводить до, во время или после того, как субъект впервые проявит симптом или клинический признак состояния. Лечение, начинаемое до того, как субъект впервые проявит симптом или клинический признак, связанный с состоянием, может вести к снижению вероятности того, что субъект перенесет клиническое свидетельство состояния, по сравнению с субъектом, которому молекулу TriKE не вводят, что снижает тяжесть симптомов и/или клинических признаков состояния и/или полностью разрешает состояние. Лечение, начинаемое после того, как субъект впервые проявит симптом или клинический признак, связанный с состоянием, может вести к снижению тяжести симптомов и/или клинических признаков состояния по сравнению с субъектом, которому композицию не вводят, и/или полному разрешению состояния.

Молекула TriKE может представлять собой любой вариант осуществления молекулы TriKE, описанной выше, которая имеет направляющий домен, который избирательно связывается с популяцией подходящих клеток-мишеней. В некоторых случаях клетка-мишень может включать опухолевую клетку с тем, чтобы способ мог включать лечение злокачественной опухоли, связанной с опухолевыми клетками. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способ может включать улучшение по меньшей мере одного симптома или клинического признака опухоли.

В вариантах осуществления, в которых клетка-мишень включает опухолевую клетку, способ дополнительно может включать хирургическую резекцию опухоли и/или уменьшение размера опухоли с помощью химической (например, химиотерапии) и/или лучевой терапии. Образцовые опухоли, которые можно лечить, включают опухоли, связанные со злокачественной опухолью предстательной железы, злокачественной опухолью легких, злокачественной опухолью ободочной кишки, злокачественной опухолью прямой кишки, злокачественной опухолью мочевого пузыря, меланомой, злокачественной опухолью почки, почечной злокачественной опухолью, злокачественной опухолью ротовой полости, злокачественной опухолью глотки, злокачественной опухолью поджелудочной железы, злокачественной опухолью матки, злокачественной опухолью щитовидной железы, злокачественной опухолью кожи, злокачественной опухолью головы и шеи, злокачественной опухолью шейки матки, злокачественной опухолью яичников и/или гематопоэтической злокачественной опухолью.

В различных вариантах осуществления направляющий домен TriKE может содержать полипептид, который избирательно связывается, например, с EGFR, HER2/neu EpCAM, CSPG4, HSPG2, IGF-1, CD38, CD19, CD20, CD22, CD30, CD52, CD33, ROR-1, UPAR, VEGFR, CD33, LIV-1, SGN-CD70A, CD70, IL-3, IL-4R, CD133, мезотелином, эпителиально-мезенхимальным переходом (EMT), TRAIL, CD38, CD45, CD74, CD23 или вирусными маркерами злокачественных опухолей, такими как HIV.

Как используют в настоящем описании, «субъект» может представлять собой любое животное, например, такое как млекопитающее (например, собака, кошка, лошадь,

корова, овца, коза, обезьяна и т. д.). В определенных вариантах осуществления субъектом может являться человек.

Молекулу TriKE, описанную в настоящем описании, можно формулировать с фармацевтически приемлемым носителем. Как используют в настоящем описании, «носитель» включает любой растворитель, дисперсионную среду, несущую среду, покрытие, разбавитель, антибактериальное и/или противогрибковое средство, изотоническое средство, задерживающее абсорбцию средство, буфер, раствор носителя, суспензию, коллоид и т. п. Использование таких сред и/или средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда любые стандартные среды или средства несовместимы с активным ингредиентом, предусмотрено их использование в терапевтических композициях. Дополнительные активные ингредиенты также включать в композиции. Как используют в настоящем описании, «фармацевтически приемлемый» относится к материалу, который не является биологически или иным образом нежелательным, т. е. материал можно вводить индивидууму наряду с молекулой TriKE, не вызывая каких-либо нежелательных биологических эффектов или взаимодействия вредным образом с любым из других компонентов фармацевтической композиции, в которой он содержится.

Следовательно, молекулу TriKE можно формулировать в фармацевтической композиции. Фармацевтическую композицию можно формулировать в различных формах, адаптированных для предпочтительного пути введения. Таким образом, композицию можно вводить через известные пути, включая, например, оральный, парентеральный (например, внутрикожный, чрескожный, подкожный, внутримышечный, внутривенный, интраперитонеальный и т.д.) или топический (например, интраназальный, внутрилегочный, интрамаммарный, интравагинальный, внутриматочный, внутрикожный, чрескожный, ректальный и т.д.). Фармацевтическую композицию можно вводить на поверхность слизистой, например, посредством введения, например, на слизистую носа или дыхательных путей (например, с помощью спрея или аэрозоля). Композицию также можно вводить через замедленное или отсроченное высвобождение.

Таким образом, молекулу TriKE можно предоставлять в любой подходящей форме, включая в качестве неограничивающих примеров раствор, суспензию, эмульсию, спрей, аэрозоль или любую форму смеси. Композицию можно доставлять в составе с любым фармацевтически приемлемым эксципиентом, носителем или несущей средой. Например, состав можно доставлять в стандартной топической дозированной форме, например, такой как крем, мазь, аэрозольный состав, неаэрозольный спрей, гель, лосьон и т.п. Состав дополнительно может содержать одну или более добавок, включая, например, такие как адъювант, усилитель проникновения через кожу, красящее вещество, ароматизатор, отдушка, увлажнитель, загуститель и т.п.

Состав в целях удобства можно представлять в стандартной дозированной форме, и его можно получать способами, хорошо известными в области фармацевтики. Способы получения композиции с фармацевтически приемлемым носителем включают стадию приведения молекулы TriKE в связь с носителем, который составляет один или более вспомогательных ингредиентов. В целом, состав можно получать посредством единообразного и/или тщательного приведения активной молекулы в связь с жидким носителем, тонкоизмельченным твердым носителем или обоими, и затем, в случае необходимости, придания продукту формы желаемых составов.

Вводимое количество молекулы TriKE может варьировать в зависимости от различных факторов, включая в качестве неограничивающих примеров, конкретную используемую молекулу TriKE, массу, физическое состояние и/или возраст субъекта и/

или путь введения. Таким образом, абсолютная масса молекулы TriKE, входящей в заданную стандартную дозированную форму, может широко варьировать и зависит от таких факторов, как биологический вид, возраст, масса и физическое состояние субъекта и/или способ введения. Соответственно, не практично в целом задавать количество, которое составляет количество молекулы TriKE, эффективное для всех возможных применений. Однако средние специалисты в данной области могут без труда определять подходящее количество с учетом таких факторов.

В некоторых вариантах осуществления способ может включать введение достаточной молекулы TriKE для того, чтобы предоставлять субъекту дозу, например, приблизительно от 100 нг/кг приблизительно до 50 мг/кг, несмотря на то, что в некоторых вариантах осуществления способы можно осуществлять посредством введения молекулы TriKE в дозе за пределами этого диапазона. В некоторых из этих вариантов осуществления способ включает введение достаточной молекулы TriKE, чтобы предоставлять субъекту дозу приблизительно от 10 мкг/кг приблизительно до 5 мг/кг, например, дозу приблизительно от 100 мкг/кг приблизительно до 1 мг/кг.

Альтернативно, дозу можно вычислять с использованием фактической массы тела, получаемой прямо перед началом курса лечения. Для доз, вычисляемых таким образом, площадь поверхности тела ($м^2$) вычисляют перед началом курса лечения с использованием способа Дюбуа: $м^2$=(масса, $кг^{0,425}$ × рос, $см^{0,725}$) × 0,007184.

В некоторых вариантах осуществления способ может включать введение достаточной молекулы TriKE для предоставления дозы, например, приблизительно от 0,01 мг/$м^2$ приблизительно до 10 мг/$м^2$.

В некоторых вариантах осуществления молекулу TriKE можно вводить, например, от однократной дозы до нескольких доз в неделю, хотя в некоторых вариантах осуществления способ можно осуществлять посредством введения молекулы TriKE с частотой вне этого диапазона. В определенных вариантах осуществления молекулу TriKE можно вводить приблизительно от одного раза в месяц приблизительно до пяти раз в неделю.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение одного или более дополнительных терапевтических средств. Одно или более дополнительных терапевтических средств можно вводить до, после и/или совместно со введением молекулы TriKE. Молекулу TriKE и дополнительные терапевтические средства можно вводить совместно. Как используют в настоящем описании, «совместно вводимые» относится к двум или больше компонентам комбинации, вводимой с тем, чтобы терапевтические или профилактические эффекты комбинации могли быть больше терапевтических или профилактических эффектов любого компонента, вводимого отдельно. Два компонента можно вводить совместно одновременно или последовательно. Одновременно совместно вводимые компоненты можно предоставлять в одной или более фармацевтических композициях. Последовательное совместное введение двух или больше компонентов включает случаи, в которых компоненты вводят с тем, чтобы каждый компонент мог присутствовать в месте лечения в одно и то же время. Альтернативно, последовательное совместное введение двух компонентов может включать случаи, в которых по меньшей мере один компонент выведен из места лечения, но по меньшей мере один клеточный эффект от введения компонента (например, продуцирование цитокинов, активация определенной популяции клеток и т.д.) сохраняется в месте лечения до введения одного или более дополнительных компонентов в место лечения. Таким образом, совместно вводимая комбинация, в определенных

обстоятельствах, может содержать компоненты, которые никогда не существуют в химической смеси друг с другом. В других вариантах осуществления молекулу TriKE и дополнительное терапевтическое средство можно вводить в качестве части смеси или коктейля. В некоторых аспектах, введение молекулы TriKE может допускать эффективность более низкой дозы других терапевтических модальностей по сравнению с введением другого терапевтического средства или средств отдельно, тем самым снижая вероятность, тяжесть и/или степень токсичности, наблюдаемой при введении более высокой дозы другого терапевтического средства или средств.

Дополнительные образцовые терапевтические средства включают алтретамин, амсакрин, L-аспарагиназу, коласпазу, блеомицин, бусульфан, капецитабин, карбоплатин, кармустин, хлорамбуцил, цисплатин, кладрибин, циклофосфамид, цитофосфан, цитарабин, дакарбазин, дактиномицин, даунорубицин, доцетаксел, доксорубицин, эпирубицин, этопозид, фторурацил, флударабин, фотемустин, ганцикловир, гемцитабин, гидроксимочевину, идарубицин, ифосфамид, иринотекан, ломустин, мелфалан, меркаптопурин, метотрексат, митоксантрон, митомицин С, нимустин, оксалиплатин, паклитаксел, пеметрексед, прокарбазин, ралтитрексед, темозоломид, тенипозид, тиогуанин, тиотепу, топотекан, винбластин, винкристин, виндезин и винорелбин.

В некоторых вариантах осуществления способ может включать введение достаточной молекулы TriKE, как раскрыто в настоящем описании, и введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, которые демонстрируют терапевтический синергизм. В некоторых аспектах способов по настоящему изобретению, измерение ответа на лечение, наблюдаемого после введения как молекулы TriKE, как раскрыто в настоящем описании, так и дополнительного терапевтического средства, улучшено относительно того же измерения ответа на лечение, наблюдаемого после отдельного введения или молекулы TriKE или дополнительного терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство может включать дополнительное средство, которое направлено на EpCAM, включая, например, EpCAM-специфическое моноклональное антитело, такое как, например, катумаксомаб, моноклональное гибридное антитело, направленное на EpCAM и CD3.

В предшествующем описании и последующей формуле изобретения термин «и/или» обозначает один или все из перечисленных элементов или комбинацию из любых двух или больше из перечисленных элементов; термины «содержит», «содержащий» и их вариации следует толковать в качестве открытых, т. е. дополнительные элементы или стадии возможны и могут присутствовать или не присутствовать; если не указано иное, взаимозаменяемо используют форму единственного числа и «по меньшей мере один», которые обозначают один или больше чем один; и изложения числовых диапазонов с помощью конечных точек включают все числа, включенные в этот диапазон (например, от 1 до 5 включает 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 5 и т. д.).

В предшествующем описании конкретные варианты осуществления могут быть описаны изолированно для прозрачности. Пока в иных случаях в явной форме не определено точно, что признаки конкретного варианта осуществления несовместимы с признаками другого варианта осуществления, определенные варианты осуществления могут включать комбинацию совместимых признаков, описанных в настоящем описании, в связи с одним или более вариантами осуществления.

Для любого способа, раскрытого в настоящем описании, который включает отдельные стадии, стадии можно осуществлять в любом возможном порядке. И, в зависимости от ситуации, любую комбинацию двух или больше стадий можно

осуществлять одновременно.

Настоящее изобретение проиллюстрировано следующими примерами. Следует понимать, что конкретные примеры, материалы, количества и процедуры следует интерпретировать широко в соответствии с объемом и сущностью изобретения, как указано в настоящем описании.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Выделение клеток, пациенты и образцы

PBMC от нормальных доноров одного возраста выделяли из крови взрослых, полученной из Memorial Blood Center (Minneapolis, MN). посредством центрифугирования с использованием градиента Histopaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) и криосохраняли. Для исследования образца пациента после трансплантации использовали образцы аллогенных гематопоэтических клеточных трансплантатов совпадающих доноров-сибсов из банка тканей для иммуновосстановительной терапии. PBMC реципиентов собирали в сутки 100 [n=5] или раньше (сутки 20-44) [n=5] после трансплантации и криосохраняли для будущего использования. Все образцы получали после информированного согласия, используя руководства, одобренные Committee on the Use of Human Subjects in Research в University of Minnesota в соответствии с Хельсинской декларацией.

Клеточные линии

HL-60, CD33+ клеточную линию острого промиелоцитарного лейкоза человека (ATCC, Manassas, VA), культивировали в среде Искова (Invitrogen, Carlsbad, CA) с добавлением 20% FBS (Gibco-Invitrogen) и 100 Ед/мл пенициллина и 100 Ед/мл стрептомицина (Invitrogen, Carlsbad, CA) при 37°C и 5% CO_2. Контрольную клеточную линию карциномы толстой кишки человека HT-29 (ATCC) культивировали при 37°C с 5% CO_2 в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с высокой глюкозой (Invitrogen, Carlsbad, CA) и добавлением 10% FBS и 100 Ед/мл пенициллина и 100 Ед/мл стрептомицина.

Конструирование, экспрессия и очистка BiKE и TriKE

Гибридный полинуклеотид, кодирующий 161533 (SEQ ID № 1), синтезировали с использованием способов перетасовки ДНК и лигирования ДНК (Vallera et al., 2013 Cancer Biother Radiopharm 4:274-482; Vallera et al., 2009. Leuk Res 33(9):1233-1242). Кодирующие области для V_L и V_H каждого scFv соединяли с помощью фрагмента, кодирующего линкер G4S. В его конечной конфигурации полинуклеотид 161533 NcoI/XhoI имеет инициирующий кодон, за которым сначала следуют кодирующие области для scFv против CD16 человека (McCall et al., 1999. Mol Immunol. 7:433-445), фланкирующий полипептид в 20 аминокислот (PSGQAGAAASESLFVSNHAY; SEQ ID № 3), IL-15N72D человека, фланкирующий полипептид в 7 аминокислот (EASGGPE; SEQ ID № 4) и затем scFv против CD33. Полинуклеотид сплайсировали в экспрессирующий вектор pET28c и экспрессировали тельца включения. Анализ секвенирования ДНК (Biomedical Genomics Center, University of Minnesota) использовали для того, чтобы верифицировать, что полинуклеотид имел правильную последовательность и клонирован с сохранением рамки считывания.

Те же компоненты использовали для конструирования гибридного полинуклеотида, кодирующего 163315 (SEQ ID № 7), за исключением того, что порядок компонентов представлял собой CD16scFv, фланкирующий полипептид PSGQAGAAASESLFVSNHAY (SEQ ID № 3), scFv против CD33, фланкирующий полипептид EASGGPE (SEQ ID № 4),

затем IL-15 человека.

Плазмидой трансформировали штамм BL21(DE3) Escherichia coli (EMD, Madison WI). Бактерии выращивали в 600 мл бульона Лурии с добавлением 100 мкг/мл канамицина в 2 л колбе при 37°C и встряхивании. Экспрессию гибридного полинуклеотида индуцировали посредством добавления изопропил-b-D-тиогалактопиранозида (IPTG, FisherBiotech Fair Lawn, NJ). Через два часа после индукции, бактерии собирали центрифугированием. Клеточные осадки суспендировали и гомогенизировали с использованием гомогенизатора Polytron. После обработки ультразвуком и центрифугирования, осадки экстрагировали с использованием 0,3% дезоксихолата натрия, 5% Triton X-100, 10% глицерина, 50 мМ Tris, 50 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, pH 8,0 и тщательно промывали тельца включения для того, чтобы удалять эндотоксин.

Осуществляли повторную укладку белков с использованием способа окисления N-лауроилсаркозина натрия (SLS) воздухом, модифицированного относительно ранее опубликованной процедуры для выделения scFv (Vallera et al., 2005. Leuk Res 29(3):331-341). Повторно уложенный 161533 очищали посредством FPLC ионообменной хроматографии (Q Sepharose Fast Flow, Sigma, St. Louis, MO) с использованием ступенчатого градиента от 0,2 М до 0,5 М NaCl в 20 мМ Tris-HCl, pH 9,0 в четырех объемах колонки.

Проточная цитометрия

Иммунофенотипирование клеток осуществляли с использованием следующих флуоресцентно-меченных моноклональных антител (mAb) против: PE-Cy7-конъюгированного CD56 (HCD56; BioLegend, Inc., San Diego, CA), ECD/PE-CF594-конъюгированного CD3 (UCHT1; Beckman Coulter, Brea, CA), APC-Cy7-конъюгированного CD16 (3G8; BioLegend, Inc.), Pacific Blue-конъюгированного CD45 (HI30; BioLegend, Inc.), PerCP-Cy5.5/FITC-конъюгированного против CD107a человека (LAMP-1) (H4A3; BioLegend, Inc.), Pacific Blue/BV421-конъюгированного против IFN-γ человека (4S.B3; BioLegend, Inc.), FITC/Alexa Fluor 647-конъюгированного TNF-α (MAb11; BioLegend, Inc.), FITC/PE-конъюгированного CD33 (P67,6; BD Biosciences) и APC-конъюгированного CD45 (HI30; BioLegend, Inc.), FITC-конъюгированного EpCAM; (BioLegend, Inc.). Регистрацию фенотипа клеток осуществляли на LSRII (BD Biosciences) и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR).

Функциональный проточный анализ CD107a и IFNγ/TNFα

PBMC пациента после трансплантации или первичные AML бласты оттаивали и помещали в RPMI-10 в течение ночи. Следующей ночью PBMC инкубировали с 50 нМ 1633 BiKE или 161533 TriKE. На следующее утро промывали клетки и добавляли другой раунд 50 нМ 1633 BiKE или 161533 TriKE, чтобы учесть любые возможные проблемы с интернализацией молекул. Сразу после этого добавляли мишени HL-60 или первичные AML бласты для того, чтобы создавать соотношение эффекторов и мишеней 5:1. PBMC, мишени HL-60 или первичные AML бласты и молекулы BiKE или TriKE совместно культивировали в течение 4 ч и оценивали экспрессию CD107a и внутриклеточное продуцирование IFN-γ и TNF-α, как описано ранее (Vallera et al., 2013 Cancer Biother Radiopharm 4:274-282).

Анализ пролиферации

PBMC от пациентов после трансплантации (сутки 100 или раньше [сутки 20-44]) метили с использованием CELLTRACE Violet Cell Proliferation Dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), по протоколу производителя, помещали в культуральную среду с клетками мишенями HL-60 при соотношении (E:T) 5:1 и обрабатывали с использованием 50 нМ 1633 BiKE или 161533 TriKE. Затем через 7 суток клетки собирали и анализировали

на жизнеспособность, через окрашивание Live/Dead, и пролиферацию, через разведение CELLTRACE, в популяции NK клеток (CD56+CD3-).

Анализ цитотоксичности с высвобождением хрома-51

Цитотоксичность оценивали посредством анализа высвобождения ^{51}Cr в течение 4 ч. В кратком изложении, покоящиеся PBMC от нормальных доноров, которые обрабатывали с использованием 1633 BiKE (10 мкг/мл), контрольного реактива scFvCD16 (10 мкг/мл) или без реактива, совместно культивировали в течение 4 ч с меченными ^{51}Cr или HL-60 мишенями при различных соотношениях E:T. Для исследования после трансплантации, клетки PBMC находились с мишенями HL-60 в соотношении (E:T) 20:1 в присутствии 50 нМ 1633 BiKE или 50 нМ 161533 TriKE. Высвобождение ^{51}Cr измеряли с помощью гамма-сцинтилляционного счетчика (Perkin Elmer, Walthman, MA) и определяли специфический лизис мишеней (Vallera et al., 2013. Cancer Biother Radiopharm 4:274-282).

Исследование и визуализация мышей in vivo

Мышей NSG (n=5/группа) кондиционировали с использованием 275 сГр и инъецировали им IV $0,75\times10^5$ HL-60-luc S4, пересеянных для инвазивности опухоли. Лечение лекарственным средством начинали в сутки 3. Один курс лечения состоял из интраперитонеальной (IP) инъекции 20 мкг лекарственного средства, которую давали каждые сутки в течение недели (MTWThF), и мышей лечили в течение трех недель. Контрольная группа не получала NK клетки, тогда как группы 1633 BiKE и 161533 TriKE получали 1×10^6 NK клеток, подсчитанных в CD3/CD19 магнитно обедненном продукте, через 3 суток после инъекции клеток HL-60-luc. Клетки HL-60-luc содержат репортер люциферазы, который делает возможной визуализацию мышей каждую неделю для того, чтобы определять их биолюминесцентную активность и осуществлять мониторинг прогрессирования злокачественной опухоли лейкоза, как описано ранее (Waldron et al., 2011. Mol Cancer Ther 10(10):1829-1838.). В кратком изложении, мышам инъецировали 100 мкл 30 мг/мл субстрата люциферина за 10 минут до визуализации и затем вводили анестезию через ингаляцию газообразного изофлурана. Затем мышей визуализировали с использованием системы визуализации Xenogen Ivis 100 и анализировали с использованием программного обеспечения Living Image 2.5 (Xenogen Corporation, Hopkington MA). В сутки 20 у всех животных брали кровь и осуществляли двухминутную экспозицию и для областей, представляющих интерес (ROI), выражали в единицах фотоны/с/см^2/ср. Кровь анализировали посредством проточной цитометрии на присутствие CD45+CD56+CD3- NK клеток человека. Второй эксперимент осуществляли для того, чтобы верифицировать воспроизводимость данных.

Статистический анализ

Сгруппированные данные выражали в виде среднего±стандартная ошибка среднего (SEM). Различия между двумя группами анализировали с помощью критерия Стьюдента. Множество сравнений анализировали с помощью парного однофакторного дисперсионного анализа с коррекцией Тьюки. Анализ осуществляли в программном обеспечении Graphpad Prism.

Пример 2

Конструкция 1615EpCAM TriKE

Синтез и сборку гибридного полинуклеотида, кодирующего 1615EpCAM TriKE (SEQ ID № 8), осуществляли с использованием способов перетасовки и лигирования ДНК. Полностью собранный полинуклеотид 1615EpCAM имеет, от 5'-конца к 3'-концу, участок

рестрикции NcoI; инициирующий кодон ATG; кодирующие области, которые кодируют области V_H и V_L из CD16 человека (NM3E2), полученные из библиотеки фагового дисплея, полученной McCall et al. (Mol Immunol., 1999, 36:433-445), сегмент в 20 аминокислот (PSGQAGAAASESLFVSNHAY; SEQ ID № 3), модифицированный IL-15N72D, линкер в 7 аминокислот (EASGGPE; SEQ ID № 4) и гуманизированный scFv против EpCAM из антитела MOC-31; и, наконец, участок рестрикции XhoI. Получаемый NcoI/XhoI полинуклеотид 1914 п. о. сплайсировали в экспрессирующий вектор pET21c под контролем T7 промотора, индуцибельного изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (IPTG). Анализ секвенирования ДНК (Biomedical Genomics Center, University of Minnesota, MN, USA) использовали для того, чтобы верифицировать, что полинуклеотид имел правильную последовательность и клонирован с сохранением рамки считывания. Другие конструкции, использованные в этом исследовании, создавали схожим образом, но они содержали кодирующие области для моноспецифического scFv против CD16 и scFv против EpCAM.

Выделение телец включения

Бактериальную экспрессию белка осуществляли с использованием штамма BL21 (DE3) Escherichia coli (Novagen, Madison, WI, USA) посредством трансформации плазмидой. После культивирования в течение ночи, бактерии выращивали в 800 мл бульона Лурии, содержащего 50 мг/мл канамицина. Индукция экспрессии гена происходила, когда среды для культивирования достигали оптической плотности (OD) 600, равной 0,65, при добавлении IPTG (FischerBiotech, Fair Lawn, NJ, USA). Через 2 часа после индукции бактерии собирали (из 5 л культуральных сред выделяли 43 г бактериального осадка). Затем осадок гомогенизировали в буферном растворе (50 мМ Tris, 50 мМ NaCl и 5 мМ EDTA pH 8,0), обрабатывали звуком и центрифугировали. Осадки экстрагировали с использованием 0,3% дезоксихолата натрия, 5% Triton X-100, 10% глицерина, 50 ммоль/л Tris, 50 ммоль/л NaCl, 5 ммоль/л EDTA (pH 8,0) и промывали (конечная масса осадка: 12,5 г).

Повторная укладка и очистка

Повторную укладку и очистку осуществляли, как описано ранее (Schmohl et al., 2016. Target Oncol. 11(3):353-361). В кратком изложении, для повторной укладки белки из телец включения (IB) растворяли в 20:1 (мг влажной массы/мл) в буфере для солюбилизации (7 М гуанидингидрохлорид, 50 мМ Tris, 50 мМ NaCl, 5 мМ EDTA и 50 мМ DTT, pH 8,0). После 1 ч инкубации при 37°C осадки удаляли посредством центрифугирования. Супернатант разводили (20-кратно) с использованием буфера для повторной укладки (50 мМ Tris-HCl, 50 мМ NaCl, 0,8 мМ L-аргинин, 20% глицерин, 5 мМ EDTA и 1 мМ GSSG, pH 8,0) при 4°C на двое суток. Буфер удаляли посредством 10-кратного диализа против 20 мМ Tris-HCl, pH 9,0 в 20 мМ Tris-HCl, pH 9,0 в четырех объемах колонки. Анализ SDS-PAGE осуществляли для того, чтобы оценивать чистоту. Слитые белки окрашивали с использованием SimplyBlue LifeStain (Invitrogen, Carlsbad, CA). Размер TriKE составлял приблизительно 68860 Да.

Выделение и очистка NK клеток

Градиент Histopaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) и пробирки SEPMATE (Stemcell Technologies, Inc., Vancouver, Canada) использовали для выделения мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) из крови взрослых (Memorial Blood Center, Minneapolis, MN, USA) здоровых добровольцев и для получения обогащенных NK клеток через негативный отбор с использованием магнитных бус по протоколу производителя (Stemcell Technologies, Inc., Vancouver, Canada). Образцы получали после информированного согласия и в соответствии с University of Minnesota human subjects

Institutional Review Board и Хельсинской декларацией.

Тканевая культура

Из American Type Culture Collection получали следующие клеточные линии: клеточные линии злокачественной опухоли молочной железы BT-474, SK-BR-3; клеточные линии злокачественной опухоли предстательной железы PC-3, DU145; клеточные линии злокачественных опухолей головы и шеи UMSCC-11B, NA; клеточная линия злокачественной опухоли яичников SKOV-1; клеточная линия карциномы ободочной кишки HT-29; клеточная линия злокачественной опухоли легких Calu-3; клеточная линия лимфомы Беркитта Daudi; клеточная линия острого миелолейкоза HL-60; клеточная линия глиобластомы человека U87. Клеточные линии карциномы и глиобластомы выращивали в монослоях с использованием тканевых колб (Fogh et al., 1977. J Natl Cancer Inst 59:221-226), клеточные линии HL-60 и Daudi (Klein et al., 1968. Cancer Res 28:1300-1310) выращивали в суспензии. Клетки поддерживали в RPMI 1640 (BT-474, SK-BR-3, PC-3, DU-145, HT-29, Daudi, HL60, Calu-3), DMEM (UMSCC-11B, NA, SK-OV-3, U87) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 ммоль/л L-глутамина. В дополнение к предшествующим добавкам, среды BT-474 содержали 10 МЕ/мл инсулина. Клетки инкубировали в увлажненной постоянной 37C° атмосфере, содержащей 5% CO_2. Когда клетки достигали 90% конфлюентности, их пассировали с использованием трипсин-EDTA для открепления. Подсчет клеток осуществляли с использованием стандартного гемоцитометра. Для экспериментов использовали только клетки с жизнеспособностью >95%, как определяли по исключению трипанового синего.

Анализ связывания/блокирования

Для того чтобы оценивать связывание, 4×10^5 соответствующих клеток злокачественной опухоли (BT-474, PC-3, UMSCC-11B, Calu-3, Daudi, U87) промывали и инкубировали при 4°C с 10 нМ меченного флуоресцеинизотиоциатом (FITC) scFv против EpCAM в течение 30 минут. Для анализа блокирования 200 нМ меченного FITC 1615EpCAM TriKE добавляли в 500 нМ scFv против EpCAM или конструкции scFv против CD22-CD19 и инкубировали в течение 30 минут при 4°C с клетками карциномы ободочной кишки HT-29. После промывания интенсивность окрашивания оценивали с использованием проточного цитометра LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Анализ CD107a дегрануляции

Анализ проточной цитометрии с измерением цитолитической дегрануляции через экспрессию CD107a и присутствие IFN-γ осуществляли, как сообщалось ранее (Gleason et al., 2012. Mol Cancer Ther 11:2674-2684). PBMC инкубировали в течение ночи (37°C, 5% CO_2) в RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и с рекомбинантным IL-12 10 нг/мл (PeproTech, Rocky Hill, NJ) и IL-18 100 нг/мл (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) в качестве положительного контроля. Клетки промывали в 1× PBS, обрабатывали с использованием 30 нМ 1615EpCAM TriKE или других лекарственных средств и инкубировали в течение 10 минут при 37°C с 5% CO_2. Добавляли FITC-конъюгированное моноклональное антитело против CD107a человека (mAb) (LAMP-1) (BD Biosciences, San Jose, CA) и дополнительно инкубировали в течение одного часа с соответствующими клетками-мишенями (BT-474, SK-BR-3, PC-3, DU-145, HT-29, HL60, UMSCC-11B, NA, SK-OV-3). Добавляли GolgiStop (1:1500) (BD Biosciences, San Jose, CA) и GolgiPlug (1:1000) (BD Biosciences, San Jose, CA) и клетки дополнительно инкубировали в течение трех часов. Клетки промывали в 1× PBS и окрашивали PE/Cy7-конъюгированным mAb против CD56, APC/Cy7-конъюгированным mAb против CD16 и PE-CF594-конъюгированным mAb против CD3 (BioLegend, Inc., San Diego, CA),

инкубировали в течение 15 минут и затем фиксировали в 2% параформальдегиде. Затем клетки подготавливали для внутриклеточного окрашивания с использованием пермеабилизационного буфера (BD Biosciences, San Jose, CA). Клетки инкубировали с Pacific Blue-конъюгированным средством против IFN-γ человека (BioLegend, Inc., San Diego, CA) в течение 20 минут, промывали и оценивали посредством FACS анализа с использованием проточного цитометра LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA). Для компенсации CompBead Plus Anti-Mouse Ig использовали частицы κ/Negative Control (BSA) Compensation Plus (7,5 мкм) (BD Biosciences, San Jose, CA).

Анализ цитотоксичности с высвобождением хрома-51

Клетки-мишени HT-29 метили в течение 1 часа с использованием 1 мкКи ^{51}Cr на 1×10^5 клеток-мишеней при 37°C, 5% CO_2. Процедуры промывания осуществляли для того, чтобы удалять избыток ^{51}Cr. Меченные клетки-мишени добавляли в лунки 96-луночных круглодонных планшетов (5×10^3 клеток). В планшеты добавляли покоящиеся эффекторные NK клетки, обработанные с использованием 1615EpCAM TriKE, EpCAM16 BiKE или отрицательных контролей. Соотношение E:T находилось в диапазоне между 20:1 и 0,08:1. Количество высвобожденного ^{51}Cr, которое соответствует гибели клеток-мишеней, измеряли с помощью гамма-сцинтилляционного счетчика, и процент лизиса клеток-мишеней вычисляли следующим образом: [(экспериментальный лизис - самопроизвольный лизис)/(максимальный лизис - самопроизвольный лизис)] × 100. Для того чтобы определять максимальный лизис, меченные ^{51}Cr клетки-мишени обрабатывали с использованием 3% Triton X в течение 4 ч.

Luminex

Для анализа хемокинов и цитокинов, очищенные NK клетки от 6 здоровых добровольцев совместно инкубировали в 96-луночных планшетах в течение 24 часов с клетками карциномы ободочной кишки HT-29 при соотношении E:T 2:1 и соответствующим лекарственным средством в концентрации 50 нМ при 37°C, 5% CO_2. После 24 ч времени инкубации, центрифугировали клетки и собирали супернатанты, которые хранили при -80°C до анализа. GM-CSF, IL-6, IL-8 и TNF-α (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) определяли с использованием системы Luminex (MAGPIX, Luminex, Austin, TX). Значения, представленные в пг/мл, интерполировали по калибровочным кривым рекомбинантных белков человека с использованием программного обеспечения Xponent 4.2 (Luminex, Austin, TX).

Анализы пролиферации и жизнеспособности

PBMC или обогащенные NK клетки от здоровых доноров метили с использованием CELLTRACE Violet Cell Proliferation Dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) в соответствии с протоколом производителя. После мечения, клетки культивировали с соответствующими лекарственными средствами в концентрациях 50 нМ. Клетки собирали после 7 суток, окрашивали на жизнеспособность с использованием реактива Live/Dead (Invitrogen, Carlsbad, CA) и окрашивали поверхность на средство против CD56 PE/Cy7 (BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA) и против CD3 PE-CF594 (BD Biosciences, San Jose, CA), чтобы определять жизнеспособную CD3-CD56+ субпопуляцию. Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo версии 7.6.5. (FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA).

Статистический анализ

Данные представлены в виде среднего±стандартное отклонение. Различия между двумя группами анализировали с помощью критерия Стьюдента или однофакторного

дисперсионного анализа. Анализ и представление данных выполняли с использованием GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

Пример 3

Конструкция EF91(средство ламы против IL16 человека)-IL15-CD33

Синтез и сборку гибридного полинуклеотида, кодирующего TriKE EF91(средство ламы против IL16 человека)-IL15-CD33 (SEQ ID № 14) осуществляли с использованием способов перетасовки и лигирования ДНК. Полностью собранный полинуклеотид имеет, от 5'-конца к 3'-концу, участок рестрикции NcoI; инициирующий кодон ATG; кодирующие области, которые кодируют области V_H и V_L из EF91 (средство ламы против IL16 человека), сегмент в 20 аминокислот (GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS; аминокислоты 142-161 SEQ ID № 14), модифицированный IL-15, линкер в 18 аминокислот (GSTSGSGKPGSGEGSTKG; аминокислоты 277-294) и гуманизированный scFv против CD33; и, наконец, участок рестрикции XhoI. Получаемый NcoI/XhoI полинуклеотид сплайсировали в экспрессирующий вектор pET21d под управлением индуцибельного изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (IPTG) T7 промотора.

Пример 4

Конструкция 1615 против HIV

Поскольку 1615x представляет собой платформенную технологию, также возможно использовать scFv против вирусов, которые связаны или не связаны с развитием злокачественных опухолей. Синтез и сборку гибридного полинуклеотида, кодирующего TriKE 1615 против HIV (SEQ ID № 19) осуществляли с использованием способов перетасовки и лигирования ДНК. Полностью собранный полинуклеотид имеет, от 5'-конца к 3'-концу, участок рестрикции NcoI; инициирующий кодон ATG; области V_H и V_L из scFv против CD16, сегмент в 20 аминокислот (PSGQAGAAASESLFVSNHAY; SEQ ID № 3), модифицированный IL-15, линкер в 7 аминокислот (EASGGPE; SEQ ID № 4) и scFv против HIV; и, наконец, участок рестрикции XhoI.

Полное раскрытие всех патентов, патентных заявок и публикаций, а также материалы, доступные в электронной форме, (включая, например, нуклеотидные последовательности, поданные, например, в GenBank и RefSeq, и аминокислотные последовательности, поданные, например, в SwissProt, PIR, PRF, PDB, и трансляции с аннотированных кодирующих областей в GenBank и RefSeq), цитируемые в настоящем описании, включены в данное описание посредством ссылки в полном объеме. В том случае, если имеет место любое противоречие между раскрытием настоящей заявки и раскрытием(ями) любого документа, включенного в настоящее описание посредством ссылки, раскрытие настоящей заявки имеет определяющее значение. Вышеуказанное подробное описание и примеры приведены лишь для прозрачности понимания. Не следует понимать их как излишние ограничения. Изобретение не ограничено конкретными подробностями, которые представлены и описаны, в отношении вариаций, очевидных специалисту в данной области, которые включены в изобретение, которое определено формулой изобретения.

Если не указано иное, все числа, выражающие количества компонентов, молекулярные массы и так далее, используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином «приблизительно». Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, приведенные в описании и формуле изобретения, представляют собой приближения, которые могут варьировать в зависимости от желаемых свойств, которые стремятся получить с помощью настоящего изобретения. Как минимум, и не в качестве попытки ограничить принцип эквивалентов

объемом формулы изобретения, каждый числовой параметр следует по меньшей мере толковать в свете числа приведенных значимых цифр и с применением обычных способов округления.

Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, в которых изложен широкий объем изобретения, представляют собой приближения, числовые значения, изложенные в конкретных примерах, приведены настолько точно, насколько возможно. Однако все числовые значения неотъемлемо включают определенный диапазон, являющийся неизбежным результатом стандартного отклонения, которое находят при соответствующих им тестовых измерениях.

Все заголовки приведены для удобства читателя, и их не следует использовать для ограничения значения текста, который следует за заголовком, пока иное не определено конкретно.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПРОИЗВОЛЬНЫМ ТЕКСТОМ

SEQ ID № 1

MEVQLVESGG GVVRPGGSLR LSCAASGFTF DDYGMSWVRQ APGKGLEWVS GINWNGGSTG YADSVKGRFT ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCARG RSLLFDYWGQ GTLVTVSRGG GGSGGGGSGG GGSSELTQDP AVSVALGQTV RITCQGDSLR SYYASWYQQK PGQAPVLVIY GKNNRPSGIP DRFSGSSSGN TASLTITGAQ AEDEADYYCN SRDSSGNHVV FGGGTKLTVL PSGQAGAAAS ESLFVSNHAY NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH DTVENLIILA NDSLSSNGNV TESGCKECEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTSEASGGP EQVQLVQSGA EVKKPGSSVK VSCKASGYTF TDYNMHWVRQ APGQGLEWIG YIYPYNGGTG YNQKFKSKAT ITADESTNTA YMELSSLRSE DTAVYYCARG RPAMDYWGQG TLVTVSSGGG GSGGGGSGGG GSDIQMTQSP SSLSASVGDR VTITCRASES VDNYGISFMN WFQQKPGKAP KLLIYAASNQ GSGVPSRFSG SGSGTDFTLT ISSLQPDDFA TYYCQQSKEV PWTFGQGTKV EIK

SEQ ID № 2

MEVQLVESGG GVVRPGGSLR LSCAASGFTF DDYGMSWVRQ APGKGLEWVS GINWNGGSTG YADSVKGRFT ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCARG RSLLFDYWGQ GTLVTVSRGG GGSGGGGSGG GGSSELTQDP AVSVALGQTV RITCQGDSLR SYYASWYQQK PGQAPVLVIY GKNNRPSGIP DRFSGSSSGN TASLTITGAQ AEDEADYYCN SRDSSGNHVV FGGGTKLTVL PSGQAGAAAS ESLFVSNHAY QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT DYNMHWVRQA PGQGLEWIGY IYPYNGGTGY NQKFKSKATI TADESTNTAY MELSSLRSED TAVYYCARGR PAMDYWGQGT LVTVSSGGGG SGGGGSGGGG SDIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCRASESV DNYGISFMNW FQQKPGKAPK LLIYAASNQG SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPDDFAT YYCQQSKEVP WTFGQGTKVE IK

SEQ ID № 3

PSGQAGAAAS ESLFVSNHAY

SEQ ID № 4

EASGGPE

SEQ ID № 5

MEVQLVESGG GVVRPGGSLR LSCAASGFTF DDYGMSWVRQ APGKGLEWVS GINWNGGSTG YADSVKGRFT ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCARG RSLLFDYWGQ GTLVTVSRGG GGSGGGGSGG GGSSELTQDP AVSVALGQTV RITCQGDSLR SYYASWYQQK PGQAPVLVIY GKNNRPSGIP DRFSGSSSGN TASLTITGAQ AEDEADYYCN SRDSSGNHVV FGGGTKLTVL NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH DTVENLIILA NDSLSSNGNV

TESGCKECEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTSQVQLVQ SGAEVKKPGS SVKVSCKASG
YTFTDYNMHW VRQAPGQGLE WIGYIYPYNG GTGYNQKFKS KATITADEST
NTAYMELSSL RSEDTAVYYC ARGRPAMDYW GQGTLVTVSS GGGGSGGGGS
GGGGSDIQMT QSPSSLSASV GDRVTITCRA SESVDNYGIS FMNWFQQKPG KAPKLLIYAA
SNQGSGVPSR FSGSGSGTDF TLTISSLQPD DFATYYCQQS KEVPWTFGQG TKVEIK

SEQ ID № 6

MENWVNVISD LKKIEDLIQS MHIDATLYTE SDVHPSCKVT AMKCFLLELQ
VISLESGDAS IHDTVENLII LANDSLSSNG NVTESGCKEC EELEEKNIKE FLQSFVHIVQ
MFINTSPSGQ AGAAASESLF VSNHAYEVQL VESGGGVVRP GGSLRLSCAA
SGFTFDDYGM SWVRQAPGKG LEWVSGINWN GGSTGYADSV KGRFTISRDN
AKNSLYLQMN SLRAEDTAVY YCARGRSLLF DYWGQGTLVT VSRGGGGSGG
GGSGGGGSSE LTQDPAVSVA LGQTVRITCQ GDSLRSYYAS WYQQKPGQAP
VLVIYGKNNR PSGIPDRFSG SSSGNTASLT ITGAQAEDEA DYYCNSRDSS GNHVVFGGGT
KLTVLEASGG PEQVQLVQSG AEVKKPGSSV KVSCKASGYT FTDYNMHWVR
QAPGQGLEWI GYIYPYNGGT GYNQKFKSKA TITADESTNT AYMELSSLRS
EDTAVYYCAR GRPAMDYWGQ GTLVTVSSGG GGSGGGGSGG GGSDIQMTQS
PSSLSASVGD RVTITCRASE SVDNYGISFM NWFQQKPGKA PKLLIYAASN QGSGVPSRFS
GSGSGTDFTL TISSLQPDDF ATYYCQQSKE VPWTFGQGTK VEIK

SEQ ID № 7

MEVQLVESGG GVVRPGGSLR LSCAASGFTF DDYGMSWVRQ APGKGLEWVS
GINWNGGSTG YADSVKGRFT ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCARG
RSLLFDYWGQ GTLVTVSRGG GGSGGGGSGG GGSSELTQDP AVSVALGQTV
RITCQGDSLR SYYASWYQQK PGQAPVLVIY GKNNRPSGIP DRFSGSSSGN TASLTITGAQ
AEDEADYYCN SRDSSGNHVV FGGGTKLTVL PSGQAGAAAS ESLFVSNHAY
QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT DYNMHWVRQA PGQGLEWIGY
IYPYNGGTGY NQKFKSKATI TADESTNTAY MELSSLRSED TAVYYCARGR
PAMDYWGQGT LVTVSSGGGG SGGGGSGGGG SDIQMTQSPS SLSASVGDRV
TITCRASESV DNYGISFMNW FQQKPGKAPK LLIYAASNQG SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI
SSLQPDDFAT YYCQQSKEVP WTFGQGTKVE IKEASGGPEN WVNVISDLKK IEDLIQSMHI
DATLYTESDV HPSCKVTAMK CFLLELQVIS LESGDASIHD TVENLIILAN DSLSSNGNVT
ESGCKECEEL EEKNIKEFLQ SFVHIVQMFI NTS

SEQ ID № 8

MEVQLVESGG GVVRPGGSLR LSCAASGFTF DDYGMSWVRQ APGKGLEWVS
GINWNGGSTG YADSVKGRFT ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCARG
RSLLFDYWGQ GTLVTVSRGG GGSGGGGSGG GGSSELTQDP AVSVALGQTV
RITCQGDSLR SYYASWYQQK PGQAPVLVIY GKNNRPSGIP DRFSGSSSGN TASLTITGAQ
AEDEADYYCN SRDSSGNHVV FGGGTKLTVL PSGQAGAAAS ESLFVSNHAY
NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
DTVENLIILA NDSLSSNGNV TESGCKECEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTSEASGGP
EDIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCRSTKSL LHSNGITYLY WYQQKPGKAP KLLIYQMSNL
ASGVPSRFSS SGSGTDFTLT ISSLQPEDFA TYYCAQNLEI PRTFGQGTKV ELKRATPSHN
SHQVPSAGGP TANSGTSGEV QLVQSGPGLV QPGGSVRISC AASGYTFTNY
GMNWVKQAPG KGLEWMGWIN TYTGESTYAD SFKGRFTFSL DTSASAAYLQ
INSLRAEDTA VYYCARFAIK GDYWGQGTLL TVSS

SEQ ID № 9

MEVQLVESGG GVVRPGGSLR LSCAASGFTF DDYGMSWVRQ APGKGLEWVS
GINWNGGSTG YADSVKGRFT ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCARG
RSLLFDYWGQ GTLVTVSRGG GGSGGGGSGG GGSSELTQDP AVSVALGQTV

RITCQGDSLR SYYASWYQQK PGQAPVLVIY GKNNRPSGIP DRFSGSSSGN TASLTITGAQ
AEDEADYYCN SRDSSGNHVV FGGGTKLTVL PSGQAGAAAS ESLFVSNHAY
NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
DTVENLIILA NDSLSSNGNV TESGCKECEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTSEASGGP
EDIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCRSTKSL LHSNGITYLY WYQQKPGKAP KLLIYQMSNL
ASGVPSRFSS SGSGTDFTLT ISSLQPEDFA TYYCAQNLEI PRTFGQGTKV ELKRATPSHN
SHQVPSAGGP TANSGTSGEV QLVQSGPGLV QPGGSVRISC AASGYTFTNY
GMNWVKQAPG KGLEWMGWIN TYTGESTYAD SFKGRFTFSL DTSASAAYLQ
INSLRAEDTA VYYCARFAIK GDYWGQGTLL TVSSEPKSSD KTHTSPPSPD IVLSQSPAIM
SASPGEKVTI SCSASSSVSY MYWYQQKPGS SPKPWIYRTS NLASGVPARF SGSGSGTSYS
LTISSMEAED AATYYCQQYH SYPPTFGAGT KLELKSSGGG GSGGGGGGSS
RSSLEVKLVE SGPELKKPGE TVKISCKASG YTFTDYSMHW VNQAPGKGLK
WMGWINTETG EPSYADDFKG RFAFSLETSA STAYLQINNL KNEDTATYFC
ATDYGDYFDY WGQGTTLTVS SAKTTPPSVT S

SEQ ID № 10

MEVQLVESGG GVVRPGGSLR LSCAASGFTF DDYGMSWVRQ APGKGLEWVS
GINWNGGSTG YADSVKGRFT ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCARG
RSLLFDYWGQ GTLVTVSRGG GGSGGGGSGG GGSSELTQDP AVSVALGQTV
RITCQGDSLR SYYASWYQQK PGQAPVLVIY GKNNRPSGIP DRFSGSSSGN TASLTITGAQ
AEDEADYYCN SRDSSGNHVV FGGGTKLTVL PSGQAGAAAS ESLFVSNHAY
NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
DTVENLIILA NDSLSSNGNV TESGCKECEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTSEASGGP
EDIVLSQSPA IMSASPGEKV TISCSASSSV SYMYWYQQKP GSSPKPWIYR TSNLASGVPA
RFSGSGSGTS YSLTISSMEA EDAATYYCQQ YHSYPPTFGA GTKLELKSSG
GGGSGGGGGG SSRSSLEVKL VESGPELKKP GETVKISCKA SGYTFTDYSM
HWVNQAPGKG LKWMGWINTE TGEPSYADDF KGRFAFSLET SASTAYLQIN
NLKNEDTATY FCATDYGDYF DYWGQGTTLT VSS

SEQ ID № 11

MEVQLVESGG GVVRPGGSLR LSCAASGFTF DDYGMSWVRQ APGKGLEWVS
GINWNGGSTG YADSVKGRFT ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCARG
RSLLFDYWGQ GTLVTVSRGG GGSGGGGSGG GGSSELTQDP AVSVALGQTV
RITCQGDSLR SYYASWYQQK PGQAPVLVIY GKNNRPSGIP DRFSGSSSGN TASLTITGAQ
AEDEADYYCN SRDSSGNHVV FGGGTKLTVL PSGQAGAAAS ESLFVSNHAY
NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
DTVENLIILA NDSLSSNGNV TESGCKECEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTSEASGGP
EQVQLVQSGA EVKKPGASVK VSCKASGYSF TGYTMNWVRQ APGQGLEWMG
LITPYNGASS YNQKFRGKAT MTVDTSTSTV YMELSSLRSE DTAVYYCARG
GYDGRGFDYW GQGTLVTVSS GGGGSGGGGS SGGGSDIQMT QSPSSLSASV
GDRVTITCSA SSSVSYMHWY QQKSGKAPKL LIYDTSKLAS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS
SLQPEDFATY YCQQWSKHPL TFGQGTKLEI K

SEQ ID № 12

MEVQLVESGG GVVRPGGSLR LSCAASGFTF DDYGMSWVRQ APGKGLEWVS
GINWNGGSTG YADSVKGRFT ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCARG
RSLLFDYWGQ GTLVTVSRGG GGSGGGGSGG GGSSELTQDP AVSVALGQTV
RITCQGDSLR SYYASWYQQK PGQAPVLVIY GKNNRPSGIP DRFSGSSSGN TASLTITGAQ
AEDEADYYCN SRDSSGNHVV FGGGTKLTVL EPKSSDKTHT SPPSPNWVNV ISDLKKIEDL
IQSMHIDATL YTESDVHPSC KVTAMKCFLL ELQVISLESG DASIHDTVEN LIILANDSLS
SNGNVTESGC KECEELEEKN IKEFLQSFVH IVQMFINTSP SGQAGAAASE SLFVSNHAYD

IQMTQSPSSL SASVGDRVTI TCRSTKSLLH SNGITYLYWY QQKPGKAPKL LIYQMSNLAS GVPSRFSSSG SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCAQNLEIPR TFGQGTKVEL KRATPSHNSH QVPSAGGPTA NSGTSGEASG GPEDIQMTQT TSSLSASLGD RVTISCRASQ DISNYLNWYQ QKPDGTVKLL IYYTSILHSG VPSRFSGSGS GTDYSLTISN LEQEDFATYF CQQGNTLPWT FGGGTKLEIK GSTSGSGKPG SGEGSTKGEV QLVESGGGLV KPGGSLKLSC AASGFAFSIY DMSWVRQTPE KRLEWVAYIS SGGGTTYYPD TVKGRFTISR DNAKNTLYLQ MSSLKSEDTA MYYCARHSGY GTHWGVLFAY WGQGTLVTVS AGGGGSDILL TQTPASLAVS LGQRATISCK ASQSVDYDGD SYLNWYQQIP GQPPKLLIYD ASNLVSGIPP RFSGSGSGTD FTLNIHPVEK VDAATYHCQQ STEDPWTFGG GTKLEIKRGS TSGSGKPGSG EGSTKGQVQL QQSGAELVRP GSSVKISCKA SGYAFSSYWM NWVKQRPGQG LEWIGQIWPG DGDTNYNGKF KGKATLTADE SSSTAYMQLS SLASEDSAVY FCARRETTTV GRYYYAMDYW GQGTSVTVSS

SEQ ID № 13

MDIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCRASQDI RNYLNWYQQK PDGTVKLLIY YTSRLHSGVP SKFSGSGSGT DYTLTISNLE QEDIATYFCQ QGNTLPWTFA GGTKLEIKRG GGGSGGGGSG GGGSGGREVQ LVQSGAELVK PGATMKISCK ASGYSFTGYT MNWVKQSHGK NLEWMGLINP YKGVSTYNQK FKDKATLTVD TSTDTAYMEL LSLTSEDSAV YYCARSGYYG DSDWYFDVWG AGTTVTVSSP SGQAGAAASE SLFVSNHAYP TSSSTKKTQL QLEHLLLDLQ MILNGINNYK NPKLTRMLTF KFYMPKKATE LKHLQCLEEE LKPLEEVLNL AQSKNFHLRP RDLISNINVI VLELKGSETT FMCEYADETA TIVEFLNRWI TFCQSIISTL TEASGGPEDI QMTQSPSSLS ASVGDRVTIT CRSTKSLLHS NGITYLYWYQ QKPGKAPKLL IYQMSNLASG VPSRFSSSGS GTDFTLTISS LQPEDFATYY CAQNLEIPRT FGQGTKVELK RATPSHNSHQ VPSAGGPTAN SGTSGEVQLV QSGPGLVQPG GSVRISCAAS GYTFTNYGMN WVKQAPGKGL EWMGWINTYT GESTYADSFK GRFTFSLDTS ASAAYLQINS LRAEDTAVYY CARFAIKGDY WGQGTLLTVS S

SEQ ID № 14

MKWVTFISLL FLFSSAYSQV QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGLTFSSY NMGWFRQAPG QGLEAVASIT WSGRDTFYAD SVKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNSLRAEDTA VYYCAANPWP VAAPRSGTYW GQGTLVTVSS SGGGGSGGGG SGGGGSGGGG SGNWVNVISD LKKIEDLIQS MHIDATLYTE SDVHPSCKVT AMKCFLLELQ VISLESGDAS IHDTVENLII LANNSLSSNG NVTESGCKEC EELEEKNIKE FLQSFVHIVQ MFINTSGSTS GSGKPGSGEG STKGQVQLVQ SGAEVKKPGS SVKVSCKASG YTFTDYNMHW VRQAPGQGLE WIGYIYPYNG GTGYNQKFKS KATITADEST NTAYMELSSL RSEDTAVYYC ARGRPAMDYW GQGTLVTVSS GGGGSGGGGS GGGGSDIQMT QSPSSLSASV GDRVTITCRA SESVDNYGIS FMNWFQQKPG KAPKLLIYAA SNQGSGVPSR FSGSGSGTDF TLTISSLQPD DFATYYCQQS KEVPWTFGQG TKVEIKVDE

SEQ ID № 15

NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH DTVENLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

SEQ ID № 16

MEVQLVESGG GVVRPGGSLR LSCAASGFTF DDYGMSWVRQ APGKGLEWVS GINWNGGSTG YADSVKGRFT ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCARG RSLLFDYWGQ GTLVTVSRGG GGSGGGGSGG GGSSELTQDP AVSVALGQTV RITCQGDSLR SYYASWYQQK PGQAPVLVIY GKNNRPSGIP DRFSGSSSGN TASLTITGAQ AEDEADYYCN SRDSSGNHVV FGGGTKLTVL PSGQAGAAAS ESLFVSNHAY NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH

DTVENLIILA NDSLSSNGNV TESGCKECEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTSEASGGP
EAKVQLQESG PSLVQPSQRL SITCTVSGFS LISYGVHWVR QSPGKGLEWL GVIWRGGSTD
YNAAFMSRLS ITKDNSKSQV FFKMNSLQAD DTAIYFCAKT LITTGYAMDY
WGQGTTVTVS SGGGGSGGGG SGGGGSDIEL TQSPSSFSVS LGDRVTITCK ASEDIYNRLA
WYQQKPGNAP RLLISGATSL ETGVPSRFSG SGSGKDYTLS ITSLQTEDVA TYYCQQYWST
PTFGGGTKLE IKR

SEQ ID № 17

MDIVLSQSPA IMSASPGEKV TISCSASSSV SYMYWYQQKP GSSPKPWIYR
TSNLASGVPA RFSGSGSGTS YSLTISSMEA EDAATYYCQQ YHSYPPTFGA GTKLELKSSG
GGGSGGGGGG SSRSSLEVKL VESGPELKKP GETVKISCKA SGYTFTDYSM
HWVNQAPGKG LKWMGWINTE TGEPSYADDF KGRFAFSLET SASTAYLQIN
NLKNEDTATY FCATDYGDYF DYWGQGTTLT VSS

SEQ ID № 18

PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT
ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET
ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LT

SEQ ID № 19

MEVQLVESGG GVVRPGGSLR LSCAASGFTF DDYGMSWVRQ APGKGLEWVS
GINWNGGSTG YADSVKGRFT ISRDNAKNSL YLQMNSLRAE DTAVYYCARG
RSLLFDYWGQ GTLVTVSRGG GGSGGGGSGG GGSSELTQDP AVSVALGQTV
RITCQGDSLR SYYASWYQQK PGQAPVLVIY GKNNRPSGIP DRFSGSSSGN TASLTITGAQ
AEDEADYYCN SRDSSGNHVV FGGGTKLTVL PSGQAGAAAS ESLFVSNHAY
NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
DTVENLIILA NDSLSSNGNV TESGCKECEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTSEASGGP
EMGWSCIILF LVATATGVHS QVRLSQSGGQ MKKPGDSMRI SCRASGYEFI NCPINWIRLA
PGKRPEWMGW MKPRHGAVSY ARQLQGRVTM TRDMYSETAF LELRSLTSDD
TAVYFCTRGK YCTARDYYNW DFEHWGQGTP VTVSSASTKG PSVFPLAPSS
KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS
LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSCDK

SEQ ID № 20

MKWVTFISLL FLFSSAYSQV QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGLTFSSY
NMGWFRQAPG QGLEAVASIT WSGRDTFYAD SVKGRFTISR DNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTA VYYCAANPWP VAAPRSGTYW GQGTLVTVSS

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA
Vallera, Daniel
Miller, Jeffrey
<120> ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ
<130> 110.04990201
<150> US 62/237,835
<151> 2015-10-06
<160> 20
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 623
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>

<223> Полипептид

<400> 1

```
Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly
1               5                  10                  15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp
            20                  25                  30
Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45
Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser
    50                  55                  60
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu
65                  70                  75                  80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95
Cys Ala Arg Gly Arg Ser Leu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110
Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125
Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val
    130                 135                 140
Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg
145                 150                 155                 160
Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
                165                 170                 175
Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg
            180                 185                 190
Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
        195                 200                 205
Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser
    210                 215                 220
Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
225                 230                 235                 240
Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ala Ala Ser Glu Ser Leu Phe Val Ser
                245                 250                 255
Asn His Ala Tyr Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile
            260                 265                 270
Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu
        275                 280                 285
Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu
    290                 295                 300
Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His
305                 310                 315                 320
Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser
                325                 330                 335
Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu
            340                 345                 350
Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln
        355                 360                 365
```

Met Phe Ile Asn Thr Ser Glu Ala Ser Gly Gly Pro Glu Gln Val Gln
370 375 380
Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys
385 390 395 400
Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met His
405 410 415
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile
420 425 430
Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Ser Lys
435 440 445
Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu
450 455 460
Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly
465 470 475 480
Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
485 490 495
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
500 505 510
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
515 520 525
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
530 535 540
Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
545 550 555 560
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
565 570 575
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
580 585 590
Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
595 600 605
Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
610 615 620

<210> 2
<211> 502
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 2

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp
20 25 30
Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser
50 55 60
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu

65 70 75 80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Gly Arg Ser Leu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val
130 135 140
Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg
145 150 155 160
Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
165 170 175
Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg
180 185 190
Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
195 200 205
Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser
210 215 220
Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
225 230 235 240
Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ala Ala Ser Glu Ser Leu Phe Val Ser
245 250 255
Asn His Ala Tyr Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
260 265 270
Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
275 280 285
Phe Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
290 295 300
Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr
305 310 315 320
Asn Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr
325 330 335
Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
340 345 350
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
355 360 365
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
370 375 380
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
385 390 395 400
Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
405 410 415
Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln
420 425 430
Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn
435 440 445
Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

450 455 460

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr
465 470 475 480

Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly
485 490 495

Thr Lys Val Glu Ile Lys
500

<210> 3
<211> 20
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 3

Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ala Ala Ser Glu Ser Leu Phe Val Ser
1 5 10 15

Asn His Ala Tyr
20

<210> 4
<211> 7
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 4

Glu Ala Ser Gly Gly Pro Glu
1 5

<210> 5
<211> 596
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 5

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp
20 25 30

Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Arg Ser Leu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val
130 135 140
Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg
145 150 155 160
Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
165 170 175
Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg
180 185 190
Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
195 200 205
Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser
210 215 220
Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
225 230 235 240
Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
245 250 255
Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
260 265 270
Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
275 280 285
Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
290 295 300
Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
305 310 315 320
Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
325 330 335
Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
340 345 350
Thr Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
355 360 365
Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
370 375 380
Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
385 390 395 400
Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln
405 410 415
Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr
420 425 430
Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
435 440 445
Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
450 455 460
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
465 470 475 480
Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
485 490 495

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu
500 505 510
Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys
515 520 525
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly
530 535 540
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
545 550 555 560
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
565 570 575
Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
580 585 590
Val Glu Ile Lys
595

<210> 6
<211> 624
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 6

Met Glu Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp
1 5 10 15
Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp
20 25 30
Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu
35 40 45
Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr
50 55 60
Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser Asn Gly
65 70 75 80
Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys
85 90 95
Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe
100 105 110
Ile Asn Thr Ser Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ala Ala Ser Glu Ser
115 120 125
Leu Phe Val Ser Asn His Ala Tyr Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
130 135 140
Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
145 150 155 160
Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala
165 170 175
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly
180 185 190
Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
195 200 205
Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala

210 215 220
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Ser Leu Leu Phe
225 230 235 240
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly
245 250 255
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr
260 265 270
Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr
275 280 285
Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln
290 295 300
Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg
305 310 315 320
Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr
325 330 335
Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
340 345 350
Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly
355 360 365
Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Glu Ala Ser Gly Gly Pro Glu Gln Val
370 375 380
Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val
385 390 395 400
Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met
405 410 415
His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr
420 425 430
Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Ser
435 440 445
Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu
450 455 460
Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
465 470 475 480
Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
485 490 495
Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
500 505 510
Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
515 520 525
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn
530 535 540
Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
545 550 555 560
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro
565 570 575
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
580 585 590
Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser

595 600 605

Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
610 615 620

<210> 7
<211> 623
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 7

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp
20 25 30
Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser
50 55 60
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu
65 70 75 80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Gly Arg Ser Leu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val
130 135 140
Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg
145 150 155 160
Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
165 170 175
Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg
180 185 190
Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
195 200 205
Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser
210 215 220
Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
225 230 235 240
Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ala Ala Ser Glu Ser Leu Phe Val Ser
245 250 255
Asn His Ala Tyr Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
260 265 270
Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
275 280 285
Phe Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
290 295 300

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Gly Tyr
305 310 315 320
Asn Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr
325 330 335
Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
340 345 350
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
355 360 365
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
370 375 380
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
385 390 395 400
Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
405 410 415
Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln
420 425 430
Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn
435 440 445
Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
450 455 460
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr
465 470 475 480
Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly
485 490 495
Thr Lys Val Glu Ile Lys Glu Ala Ser Gly Gly Pro Glu Asn Trp Val
500 505 510
Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met
515 520 525
His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys
530 535 540
Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser
545 550 555 560
Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile
565 570 575
Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser
580 585 590
Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe
595 600 605
Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
610 615 620

<210> 8
<211> 634
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 8
Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly

```
1               5                   10                  15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp
            20                  25                  30
Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45
Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser
    50                  55                  60
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu
65                  70                  75                  80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95
Cys Ala Arg Gly Arg Ser Leu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110
Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125
Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val
    130                 135                 140
Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg
145                 150                 155                 160
Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
                165                 170                 175
Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg
            180                 185                 190
Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
        195                 200                 205
Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser
    210                 215                 220
Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
225                 230                 235                 240
Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ala Ala Ser Glu Ser Leu Phe Val Ser
                245                 250                 255
Asn His Ala Tyr Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile
            260                 265                 270
Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu
        275                 280                 285
Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu
    290                 295                 300
Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His
305                 310                 315                 320
Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser
                325                 330                 335
Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu
            340                 345                 350
Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln
        355                 360                 365
Met Phe Ile Asn Thr Ser Glu Ala Ser Gly Gly Pro Glu Asp Ile Gln
    370                 375                 380
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
```

385 390 395 400
Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile
405 410 415
Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
420 425 430
Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
435 440 445
Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
450 455 460
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Ile
465 470 475 480
Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys Arg Ala Thr
485 490 495
Pro Ser His Asn Ser His Gln Val Pro Ser Ala Gly Gly Pro Thr Ala
500 505 510
Asn Ser Gly Thr Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gly
515 520 525
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly
530 535 540
Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly
545 550 555 560
Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser
565 570 575
Thr Tyr Ala Asp Ser Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr
580 585 590
Ser Ala Ser Ala Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
595 600 605
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp
610 615 620
Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser
625 630

<210> 9
<211> 901
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 9

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp
20 25 30
Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser
50 55 60
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu
65 70 75 80

```
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95
Cys Ala Arg Gly Arg Ser Leu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110
Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125
Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val
    130                 135                 140
Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg
145                 150                 155                 160
Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
                165                 170                 175
Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg
            180                 185                 190
Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
        195                 200                 205
Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser
    210                 215                 220
Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
225                 230                 235                 240
Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ala Ala Ser Glu Ser Leu Phe Val Ser
                245                 250                 255
Asn His Ala Tyr Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile
            260                 265                 270
Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu
        275                 280                 285
Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu
    290                 295                 300
Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His
305                 310                 315                 320
Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser
                325                 330                 335
Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu
            340                 345                 350
Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln
        355                 360                 365
Met Phe Ile Asn Thr Ser Glu Ala Ser Gly Gly Pro Glu Asp Ile Gln
    370                 375                 380
Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
385                 390                 395                 400
Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile
                405                 410                 415
Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
            420                 425                 430
Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
        435                 440                 445
Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
    450                 455                 460
```

```
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Ile
465                 470                 475                 480
Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys Arg Ala Thr
                485                 490                 495
Pro Ser His Asn Ser His Gln Val Pro Ser Ala Gly Gly Pro Thr Ala
            500                 505                 510
Asn Ser Gly Thr Ser Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gly
        515                 520                 525
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly
    530                 535                 540
Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly
545                 550                 555                 560
Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser
                565                 570                 575
Thr Tyr Ala Asp Ser Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr
            580                 585                 590
Ser Ala Ser Ala Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
        595                 600                 605
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp
    610                 615                 620
Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp
625                 630                 635                 640
Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser
                645                 650                 655
Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys
            660                 665                 670
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
        675                 680                 685
Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
    690                 695                 700
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
705                 710                 715                 720
Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
                725                 730                 735
Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
            740                 745                 750
Glu Leu Lys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        755                 760                 765
Ser Ser Arg Ser Ser Leu Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Pro Glu
    770                 775                 780
Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
785                 790                 795                 800
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Met His Trp Val Asn Gln Ala Pro Gly
                805                 810                 815
Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro
            820                 825                 830
Ser Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr
        835                 840                 845
```

Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp
850 855 860
Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Thr Asp Tyr Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr
865 870 875 880
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro
885 890 895
Pro Ser Val Thr Ser
900

<210> 10
<211> 623
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 10

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp
20 25 30
Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser
50 55 60
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu
65 70 75 80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Gly Arg Ser Leu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val
130 135 140
Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg
145 150 155 160
Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
165 170 175
Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg
180 185 190
Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
195 200 205
Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser
210 215 220
Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
225 230 235 240
Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ala Ala Ser Glu Ser Leu Phe Val Ser
245 250 255
Asn His Ala Tyr Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile

260 265 270
Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu
275 280 285
Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu
290 295 300
Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His
305 310 315 320
Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser
325 330 335
Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu
340 345 350
Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln
355 360 365
Met Phe Ile Asn Thr Ser Glu Ala Ser Gly Gly Pro Glu Asp Ile Val
370 375 380
Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val
385 390 395 400
Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr
405 410 415
Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Arg Thr Ser
420 425 430
Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
435 440 445
Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala
450 455 460
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ala
465 470 475 480
Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
485 490 495
Gly Gly Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Leu Glu Val Lys Leu Val Glu
500 505 510
Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys
515 520 525
Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Met His Trp Val Asn
530 535 540
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu
545 550 555 560
Thr Gly Glu Pro Ser Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe
565 570 575
Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu
580 585 590
Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Thr Asp Tyr Gly Asp
595 600 605
Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
610 615 620

<210> 11
<211> 621
<212> Белок

<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 11

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp
20 25 30
Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser
50 55 60
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu
65 70 75 80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Gly Arg Ser Leu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val
130 135 140
Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg
145 150 155 160
Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
165 170 175
Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg
180 185 190
Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
195 200 205
Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser
210 215 220
Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
225 230 235 240
Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ala Ala Ser Glu Ser Leu Phe Val Ser
245 250 255
Asn His Ala Tyr Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile
260 265 270
Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu
275 280 285
Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu
290 295 300
Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His
305 310 315 320
Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser
325 330 335
Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu
340 345 350

Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln
355 360 365
Met Phe Ile Asn Thr Ser Glu Ala Ser Gly Gly Pro Glu Gln Val Gln
370 375 380
Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
385 390 395 400
Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn
405 410 415
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Leu Ile
420 425 430
Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg Gly Lys
435 440 445
Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu
450 455 460
Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly
465 470 475 480
Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
485 490 495
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly
500 505 510
Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
515 520 525
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
530 535 540
Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Leu
545 550 555 560
Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
565 570 575
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
580 585 590
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Lys His
595 600 605
Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
610 615 620

<210> 12
<211> 1040
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 12

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp
20 25 30
Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser

```
    50                  55                  60
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu
65                  70                  75                  80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
                85                  90                  95
Cys Ala Arg Gly Arg Ser Leu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110
Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125
Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val
    130                 135                 140
Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg
145                 150                 155                 160
Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
                165                 170                 175
Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg
            180                 185                 190
Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
        195                 200                 205
Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser
    210                 215                 220
Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
225                 230                 235                 240
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Asn
                245                 250                 255
Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln
            260                 265                 270
Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro
        275                 280                 285
Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val
    290                 295                 300
Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn
305                 310                 315                 320
Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr
                325                 330                 335
Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys
            340                 345                 350
Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr
        355                 360                 365
Ser Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ala Ala Ser Glu Ser Leu Phe Val
    370                 375                 380
Ser Asn His Ala Tyr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
385                 390                 395                 400
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys
                405                 410                 415
Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln
            420                 425                 430
Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu
```

435 440 445

Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp

450 455 460

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr

465 470 475 480

Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr

485 490 495

Lys Val Glu Leu Lys Arg Ala Thr Pro Ser His Asn Ser His Gln Val

500 505 510

Pro Ser Ala Gly Gly Pro Thr Ala Asn Ser Gly Thr Ser Gly Glu Ala

515 520 525

Ser Gly Gly Pro Glu Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu

530 535 540

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln

545 550 555 560

Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr

565 570 575

Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro

580 585 590

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile

595 600 605

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly

610 615 620

Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

625 630 635 640

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

645 650 655

Lys Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro

660 665 670

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser

675 680 685

Ile Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu

690 695 700

Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp

705 710 715 720

Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr

725 730 735

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr

740 745 750

Tyr Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Thr His Trp Gly Val Leu Phe

755 760 765

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly

770 775 780

Gly Ser Asp Ile Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser

785 790 795 800

Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp

805 810 815

Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln

820 825 830
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile
835 840 845
Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn
850 855 860
Ile His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln
865 870 875 880
Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
885 890 895
Lys Arg Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly
900 905 910
Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val
915 920 925
Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala
930 935 940
Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly
945 950 955 960
Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
965 970 975
Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser
980 985 990
Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala
995 1000 1005
Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr
1010 1015 1020
Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
1025 1030 1035
Ser Ser
1040

<210> 13
<211> 661
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 13

Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn
20 25 30
Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu
65 70 75 80
Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro
85 90 95

```
Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly
            100                 105                 110
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Arg Glu
        115                 120                 125
Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Thr
    130                 135                 140
Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr
145                 150                 155                 160
Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Met Gly
                165                 170                 175
Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
            180                 185                 190
Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr Met
        195                 200                 205
Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
    210                 215                 220
Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
225                 230                 235                 240
Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala
                245                 250                 255
Ala Ala Ser Glu Ser Leu Phe Val Ser Asn His Ala Tyr Pro Thr Ser
            260                 265                 270
Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp
        275                 280                 285
Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu
    290                 295                 300
Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu
305                 310                 315                 320
Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu
                325                 330                 335
Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp
            340                 345                 350
Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu
        355                 360                 365
Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu
    370                 375                 380
Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu
385                 390                 395                 400
Thr Glu Ala Ser Gly Gly Pro Glu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
                405                 410                 415
Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg
            420                 425                 430
Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp
        435                 440                 445
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met
    450                 455                 460
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser
465                 470                 475                 480
```

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe
485 490 495
Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Ile Pro Arg Thr Phe Gly
500 505 510
Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys Arg Ala Thr Pro Ser His Asn Ser
515 520 525
His Gln Val Pro Ser Ala Gly Gly Pro Thr Ala Asn Ser Gly Thr Ser
530 535 540
Gly Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Gly
545 550 555 560
Gly Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn
565 570 575
Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
580 585 590
Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Ser
595 600 605
Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Ala Ala
610 615 620
Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
625 630 635 640
Cys Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
645 650 655
Leu Thr Val Ser Ser
660

<210> 14
<211> 539
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 14

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
20 25 30
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser
35 40 45
Ser Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
50 55 60
Ala Val Ala Ser Ile Thr Trp Ser Gly Arg Asp Thr Phe Tyr Ala Asp
65 70 75 80
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
85 90 95
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Ala Asn Pro Trp Pro Val Ala Ala Pro Arg Ser Gly Thr
115 120 125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly

```
        130                 135                 140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145                 150                 155                 160
Ser Gly Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp
                165                 170                 175
Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp
            180                 185                 190
Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu
        195                 200                 205
Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr
    210                 215                 220
Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly
225                 230                 235                 240
Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys
                245                 250                 255
Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe
            260                 265                 270
Ile Asn Thr Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly
        275                 280                 285
Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
    290                 295                 300
Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
305                 310                 315                 320
Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
                325                 330                 335
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr
            340                 345                 350
Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu
        355                 360                 365
Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
    370                 375                 380
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Pro Ala Met Asp Tyr Trp
385                 390                 395                 400
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
                405                 410                 415
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
            420                 425                 430
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
        435                 440                 445
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp
    450                 455                 460
Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala
465                 470                 475                 480
Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
                485                 490                 495
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe
            500                 505                 510
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly
```

515 520 525

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Val Asp Glu
530 535

<210> 15
<211> 114
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 15

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
1 5 10 15
Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
20 25 30
Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
35 40 45
Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
50 55 60
Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
65 70 75 80
Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
85 90 95
Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
100 105 110
Thr Ser

<210> 16
<211> 623
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 16

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp
20 25 30
Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser
50 55 60
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu
65 70 75 80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Gly Arg Ser Leu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

```
Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val
    130                 135                 140
Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg
145                 150                 155                 160
Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
                165                 170                 175
Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg
            180                 185                 190
Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
        195                 200                 205
Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser
    210                 215                 220
Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
225                 230                 235                 240
Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ala Ala Ser Glu Ser Leu Phe Val Ser
                245                 250                 255
Asn His Ala Tyr Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile
            260                 265                 270
Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu
        275                 280                 285
Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu
    290                 295                 300
Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His
305                 310                 315                 320
Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser
                325                 330                 335
Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu
            340                 345                 350
Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln
        355                 360                 365
Met Phe Ile Asn Thr Ser Glu Ala Ser Gly Gly Pro Glu Ala Lys Val
    370                 375                 380
Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Gln Pro Ser Gln Arg Leu
385                 390                 395                 400
Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Ser Tyr Gly Val
                405                 410                 415
His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val
            420                 425                 430
Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met Ser Arg
        435                 440                 445
Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met
    450                 455                 460
Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Lys Thr
465                 470                 475                 480
Leu Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
                485                 490                 495
Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
            500                 505                 510
```

Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Phe Ser
515 520 525
Val Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asp
530 535 540
Ile Tyr Asn Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro
545 550 555 560
Arg Leu Leu Ile Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser
565 570 575
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr
580 585 590
Ser Leu Gln Thr Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp
595 600 605
Ser Thr Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
610 615 620

<210> 17
<211> 243
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 17

Met Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro
1 5 10 15
Gly Glu Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
20 25 30
Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile
35 40 45
Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala
65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Ser Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Leu Glu Val
115 120 125
Lys Leu Val Glu Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val
130 135 140
Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Met
145 150 155 160
His Trp Val Asn Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp
165 170 175
Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Ser Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly
180 185 190
Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln
195 200 205
Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Thr

210 215 220

Asp Tyr Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr
225 230 235 240

Val Ser Ser

<210> 18
<211> 132
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 18

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1 5 10 15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
20 25 30

Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
35 40 45

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
50 55 60

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65 70 75 80

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
85 90 95

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
100 105 110

Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile
115 120 125

Ser Thr Leu Thr
130

<210> 19
<211> 630
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 19

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp
20 25 30

Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser
50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Arg Ser Leu Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val
130 135 140
Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg
145 150 155 160
Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val
165 170 175
Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg
180 185 190
Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly
195 200 205
Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser
210 215 220
Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
225 230 235 240
Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ala Ala Ser Glu Ser Leu Phe Val Ser
245 250 255
Asn His Ala Tyr Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile
260 265 270
Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu
275 280 285
Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu
290 295 300
Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His
305 310 315 320
Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asp Ser Leu Ser Ser
325 330 335
Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu
340 345 350
Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln
355 360 365
Met Phe Ile Asn Thr Ser Glu Ala Ser Gly Gly Pro Glu Met Gly Trp
370 375 380
Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser
385 390 395 400
Gln Val Arg Leu Ser Gln Ser Gly Gly Gln Met Lys Lys Pro Gly Asp
405 410 415
Ser Met Arg Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ile Asn Cys
420 425 430
Pro Ile Asn Trp Ile Arg Leu Ala Pro Gly Lys Arg Pro Glu Trp Met
435 440 445
Gly Trp Met Lys Pro Arg His Gly Ala Val Ser Tyr Ala Arg Gln Leu
450 455 460
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Met Tyr Ser Glu Thr Ala Phe
465 470 475 480

Leu Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
485 490 495
Thr Arg Gly Lys Tyr Cys Thr Ala Arg Asp Tyr Tyr Asn Trp Asp Phe
500 505 510
Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
515 520 525
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
530 535 540
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
545 550 555 560
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
565 570 575
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
580 585 590
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
595 600 605
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
610 615 620
Pro Lys Ser Cys Asp Lys
625 630

<210> 20
<211> 140
<212> Белок
<213> Искусственный
<220>
<223> Полипептид
<400> 20

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15
Tyr Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
20 25 30
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser
35 40 45
Ser Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
50 55 60
Ala Val Ala Ser Ile Thr Trp Ser Gly Arg Asp Thr Phe Tyr Ala Asp
65 70 75 80
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
85 90 95
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Ala Asn Pro Trp Pro Val Ala Ala Pro Arg Ser Gly Thr
115 120 125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

(57) Формула изобретения

1. Соединение для лечения злокачественной опухоли, которая экспрессирует

опухолевый антиген, которое содержит:

привлекающий NK домен, содержащий аминокислотные остатки 1-240 SEQ ID No.1 или аминокислотные остатки 19-140 SEQ ID No.14;

активирующий NK домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID No.15 или аминокислотную последовательность SEQ ID No.15, содержащую аминокислотную замену N72D или аминокислотную замену N72A;

первый фланкирующий полипептид, связывающий привлекающий NK домен и активирующий NK домен;

направляющий домен, который специфично связывается с указанным опухолевым антигеном; и

второй фланкирующий полипептид, связывающий активирующий NK домен и направляющий домен.

2. Соединение по п. 1, в котором привлекающий NK домен блокирует ингибирование NK клетки.

3. Соединение по любому предшествующему пункту, в котором направляющий домен содержит фрагмент, который избирательно связывается с опухолевой клеткой.

4. Соединение по п. 3, в котором фрагмент направляющего домена содержит антитело или его фрагмент.

5. Соединение по п. 4, в котором фрагмент антитела содержит scFv.

6. Композиция для лечения злокачественной опухоли, которая экспрессирует опухолевый антиген, которая содержит:

соединение по любому предшествующему пункту; и

фармацевтически приемлемый носитель.

7. Способ лечения злокачественной опухоли, которая экспрессирует опухолевый антиген, который включает:

введение субъекту соединения по любому из пп. 1-5 в количестве, эффективном для того, чтобы индуцировать NK-опосредованное уничтожение клеток злокачественной опухоли, которые экспрессируют указанный опухолевый антиген.

8. Способ по п. 7, в котором соединение содержит SEQ ID No. 1.

9. Способ стимуляции размножения NK клеток in vivo, включающий:

введение субъекту количества соединения по любому из пп. 1-5, эффективного для того, чтобы стимулировать размножение NK клеток у субъекта.

10. Способ по п. 9, в котором соединение содержит аминокислотную последовательность SEQ ID No. 1.

11. Способ лечения злокачественной опухоли, которая экспрессирует опухолевый антиген, у субъекта, где способ включает:

введение субъекту количества соединения по любому из пп. 1-5, эффективного для лечения злокачественной опухоли, которая экспрессирует указанный опухолевый антиген.

12. Способ по п. 11, в котором соединение содержит аминокислотную последовательность SEQ ID No. 1.

13. Способ по п. 11, в котором злокачественная опухоль включает злокачественную опухоль предстательной железы, злокачественную опухоль легких, злокачественную опухоль ободочной кишки, злокачественную опухоль прямой кишки, злокачественную опухоль мочевого пузыря, меланому, злокачественную опухоль почки, почечную злокачественную опухоль, злокачественную опухоль ротовой полости, злокачественную опухоль глотки, злокачественную опухоль поджелудочной железы, злокачественную опухоль матки, злокачественную опухоль щитовидной железы, злокачественную

опухоль кожи, злокачественную опухоль головы и шеи, злокачественную опухоль шейки матки, злокачественную опухоль яичников или гематопоэтическую злокачественную опухоль.

14. Способ по п. 11, который дополнительно включает введение композиции до, одновременно с или после химиотерапии, хирургической резекции опухоли или лучевой терапии.

15. Способ по п. 14, в котором химиотерапия содержит алтретамин, амсакрин, L-аспарагиназу, коласпазу, блеомицин, бусульфан, капецитабин, карбоплатин, кармустин, хлорамбуцил, цисплатин, кладрибин, циклофосфамид, цитофосфан, цитарабин, дакарбазин, дактиномицин, даунорубицин, доцетаксел, доксорубицин, эпирубицин, этопозид, фторурацил, флударабин, фотемустин, ганцикловир, гемцитабин, гидроксимочевину, идарубицин, ифосфамид, иринотекан, ломустин, мелфалан, меркаптопурин, метотрексат, митоксантрон, митомицин С, нимустин, оксалиплатин, паклитаксел, пеметрексед, прокарбазин, ралтитрексед, темозоломид, тенипозид, тиогуанин, тиотепу, топотекан, винбластин, винкристин, виндезин и винорелбин.

16. Соединение по п. 1, в котором активирующий NK домен содержит замену аминокислоты N72D или N72A по сравнению с SEQ ID No. 15.

17. Соединение по п. 1, в котором привлекающий NK домен и активирующий NK домен связаны посредством фланкирующего полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID No.3.

18. Соединение по п. 1, в котором активирующий NK домен и направляющий домен связаны посредством фланкирующего полипептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID No.4.

19. Соединение для лечения злокачественной опухоли, содержащее аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID No.1 или SEQ ID No.14.

20. Соединение по п. 1, в котором направляющий домен содержит:
аминокислотные остатки 382-620 SEQ ID No.1; или
аминокислотные остатки 295-537 SEQ ID No.14.

21. Соединение по п. 1, в котором первый фланкирующий полипептид содержит:
аминокислотную последовательность SEQ ID No.3;
аминокислотную последовательность SEQ ID No.4;
аминокислоты 119-133 SEQ ID No.5;
аминокислоты 494-518 SEQ ID No.8;
аминокислоты 241-255 SEQ ID No.12;
аминокислоты 488-506 SEQ ID No.10;
аминокислоты 277-294 SEQ ID No.14; или
аминокислоты 142-161 SEQ ID No.14.

22. Соединение по п. 1, в котором второй фланкирующий полипептид содержит:
аминокислотную последовательность SEQ ID No.3;
аминокислотную последовательность SEQ ID No.4;
аминокислоты 119-133 SEQ ID No.5;
аминокислоты 494-518 SEQ ID No.8;
аминокислоты 241-255 SEQ ID No.12;
аминокислоты 488-506 SEQ ID No.10;
аминокислоты 277-294 SEQ ID No.14; или
аминокислоты 142-161 SEQ ID No.14.

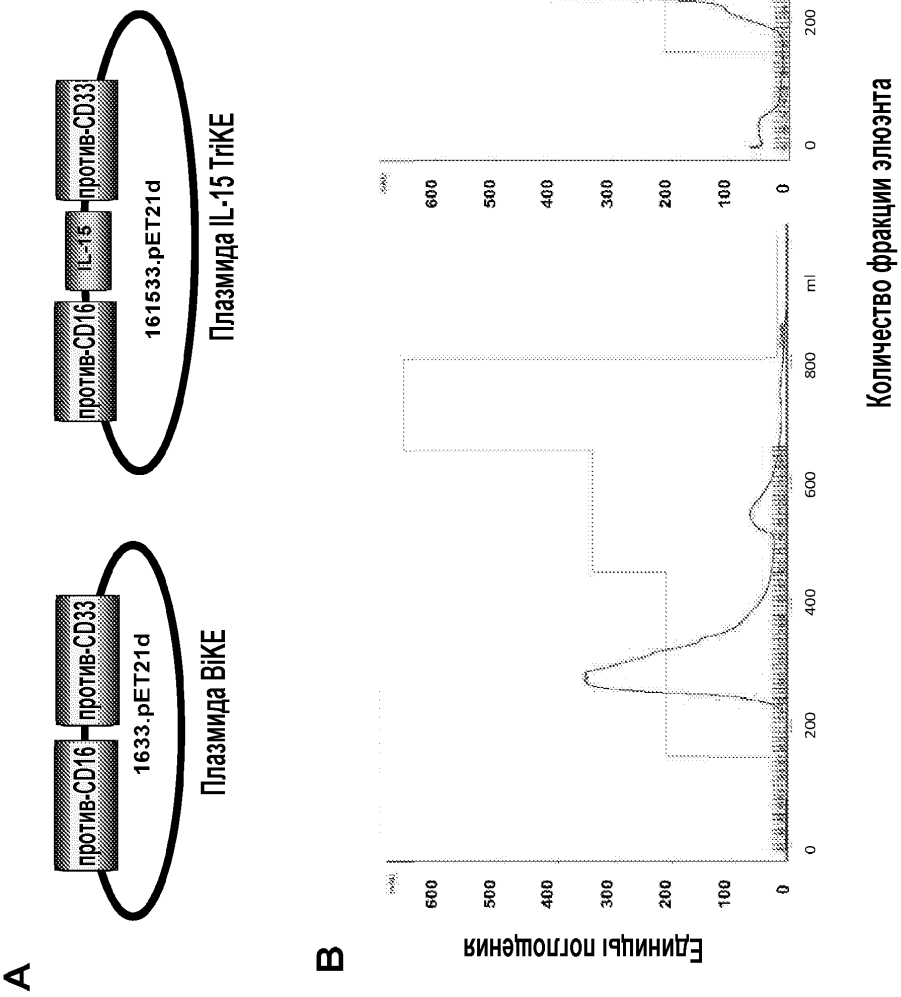
23. Соединение по п. 1, в котором первый фланкирующий полипептид содержит аминокислоты SEQ ID No.3; и второй фланкирующий полипептид содержит

аминокислоты SEQ ID No.4.

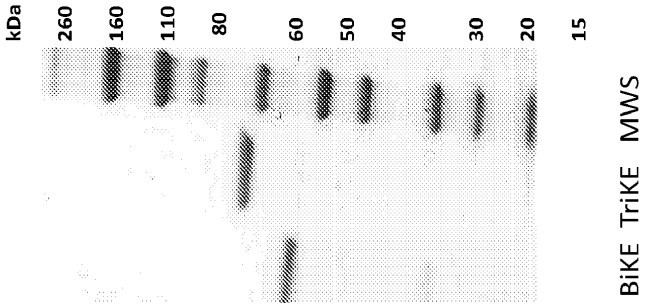
24. Соединение по п. 1, в котором первый фланкирующий полипептид содержит аминокислоты 142-161 SEQ ID No.14; и второй фланкирующий полипептид содержит аминокислоты 277-294 SEQ ID No.14.

1

ФИГ. 1


A
против-CD16
против-CD33
1633.pET21d
Плазмида BiKE
против-CD16
IL-15
против-CD33
161533.pET21d
Плазмида IL-15 TriKE
B
Единицы поглощения
Количество фракции элюэнта
мл
МЛ

2

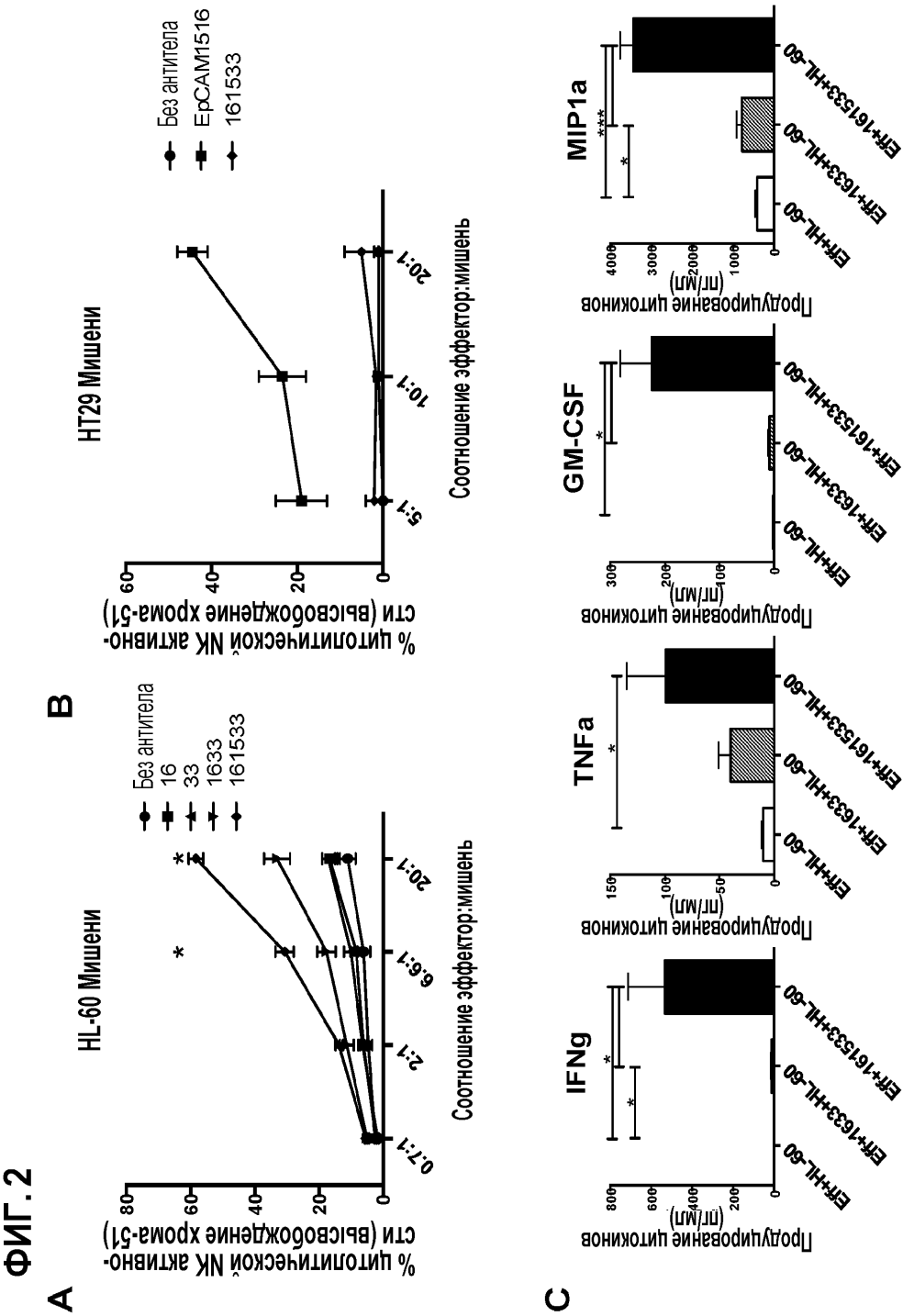


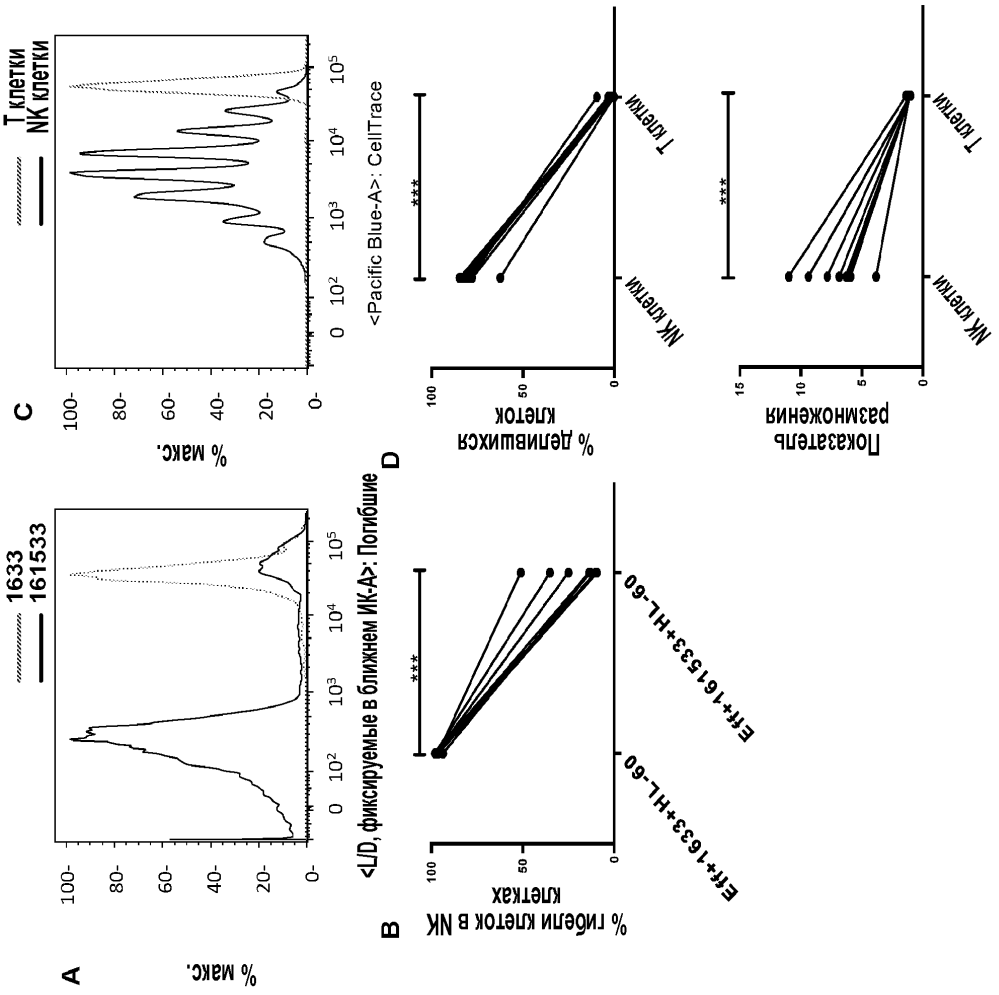
ФИГ. 1-А

С

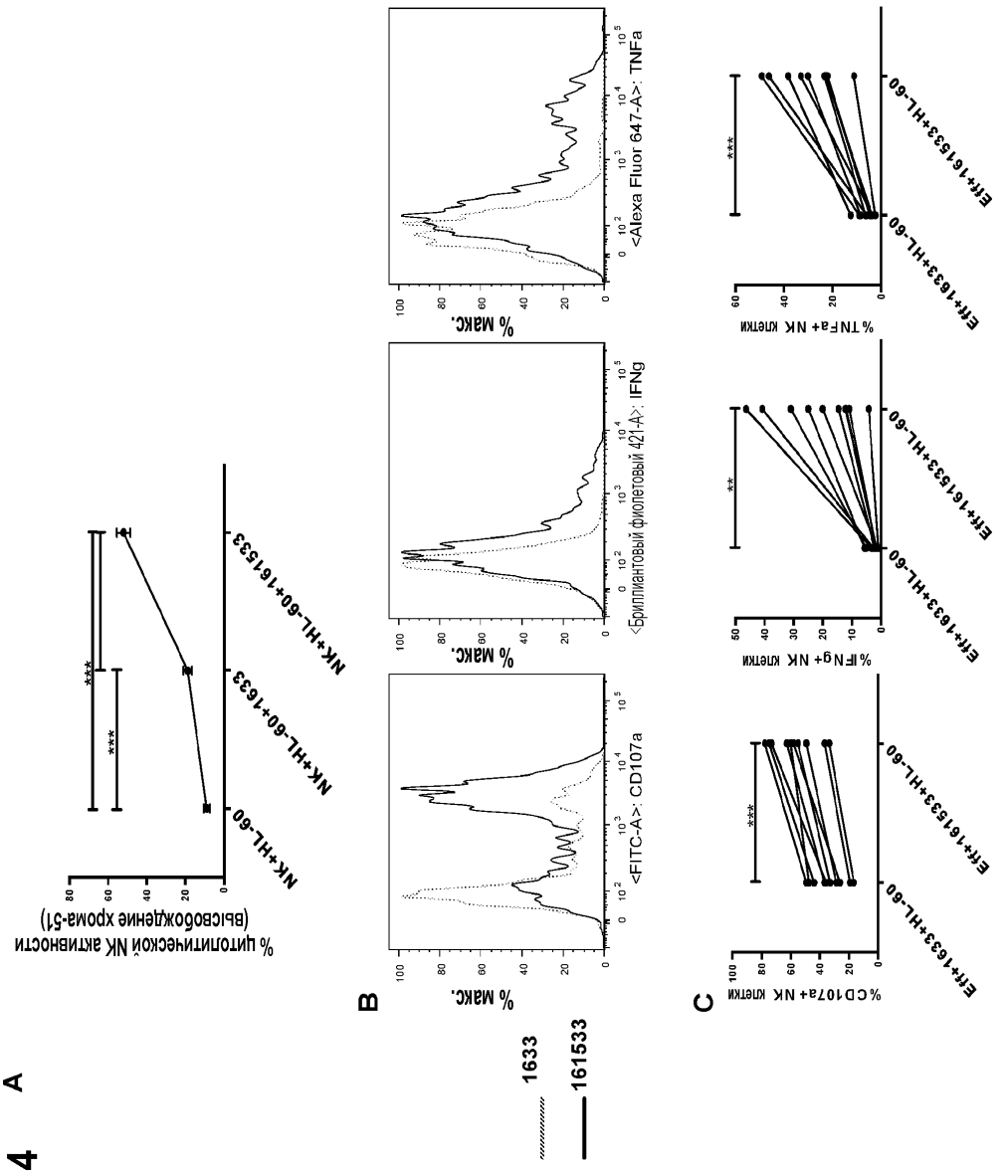
3

ФИГ. 2


A
HL-60 Мишени
% цитолитической NK активности (высвобождение хрома-51)
Соотношение эффектор:мишень
0:7:1
2:1
6.6:1
20:1
Без антитела
16
33
1633
161533
B
HT29 Мишени
% цитолитической NK активности (высвобождение хрома-51)
Соотношение эффектор:мишень
5:1
10:1
20:1
Без антитела
EpCAM1516
161533
C
IFNg
TNFa
GM-CSF
MIP1a
Продуцирование цитокинов (пг/мл)
Эф+HL-60
Эф+1633+HL-60
Эф+161533+HL-60


A
% макс.
1633
161533
B
% гибели клеток в NK клетках
<L/D, фиксируемые в ближнем ИК-А>: Потибшие
***
Eff+1633+HL-60
Eff+161533+HL-60
C
% макс.
T клетки
NK клетки
<Pacific Blue-A>: CellTrace
D
% делящихся клеток
Показатель разможения
***
NK клетки
T клетки

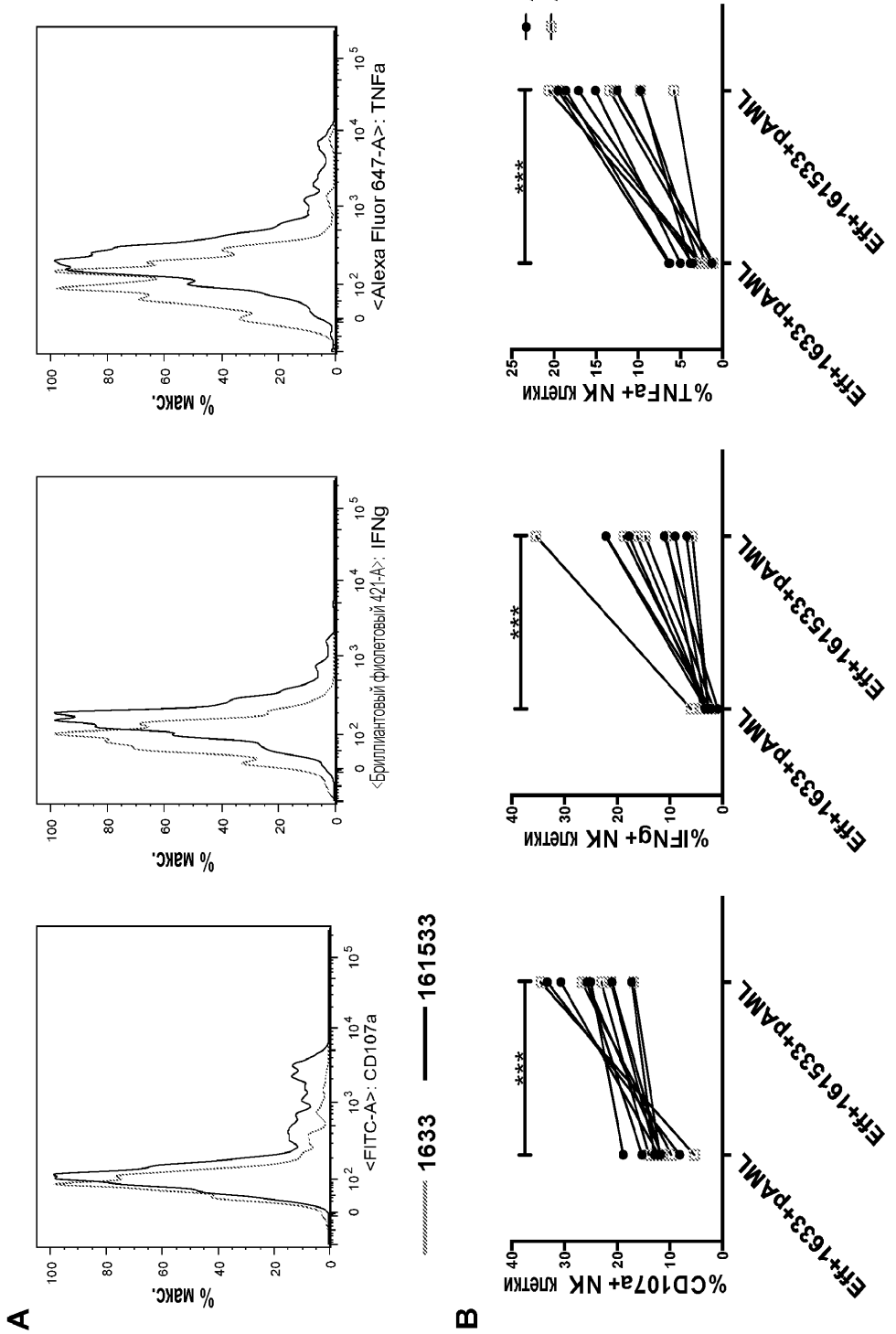
ФИГ. 3


A
% цитолитической NK активности (высвобождение хрома-51)
NK+HL-60
NK+HL-60+1633
NK+HL-60+161533
***
***
B
% макс.
<FITC-A>: CD107a
<Бриллиантовый фиолетовый 421-A>: IFNg
<Alexa Fluor 647-A>: TNFa
1633
161533
C
%CD107a+ NK клетки
%IFNg+ NK клетки
%TNFa+ NK клетки
Eff+1633+HL-60
Eff+161533+HL-60
***
**

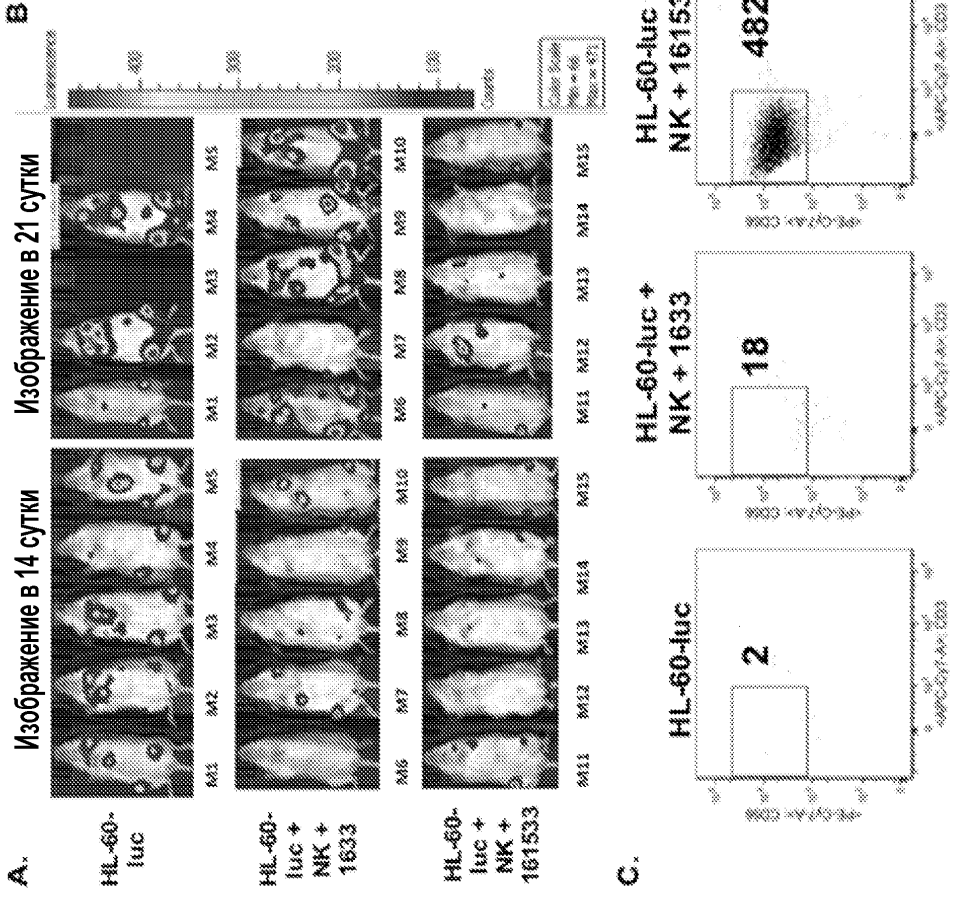
ФИГ. 4

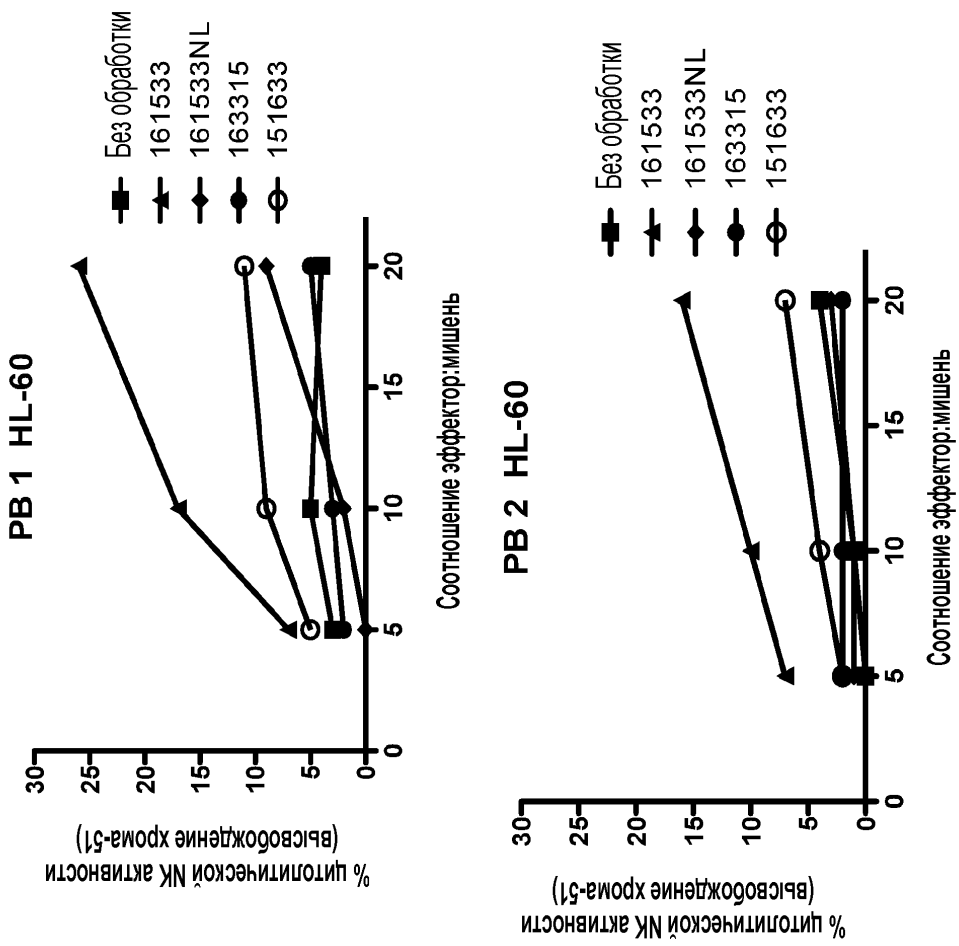
6

ФИГ. 5


A
B
% макс.
<FITC-A>: CD107a
<Бриллиантовый фиолетовый 421-A>: IFNg
<Alexa Fluor 647-A>: TNFa
1633
161533
%CD107a+ NK клетки
%IFNg+ NK клетки
%TNFa+ NK клетки
***
AML1
AML2
Eff+1633+pAML
Eff+161533+pAML

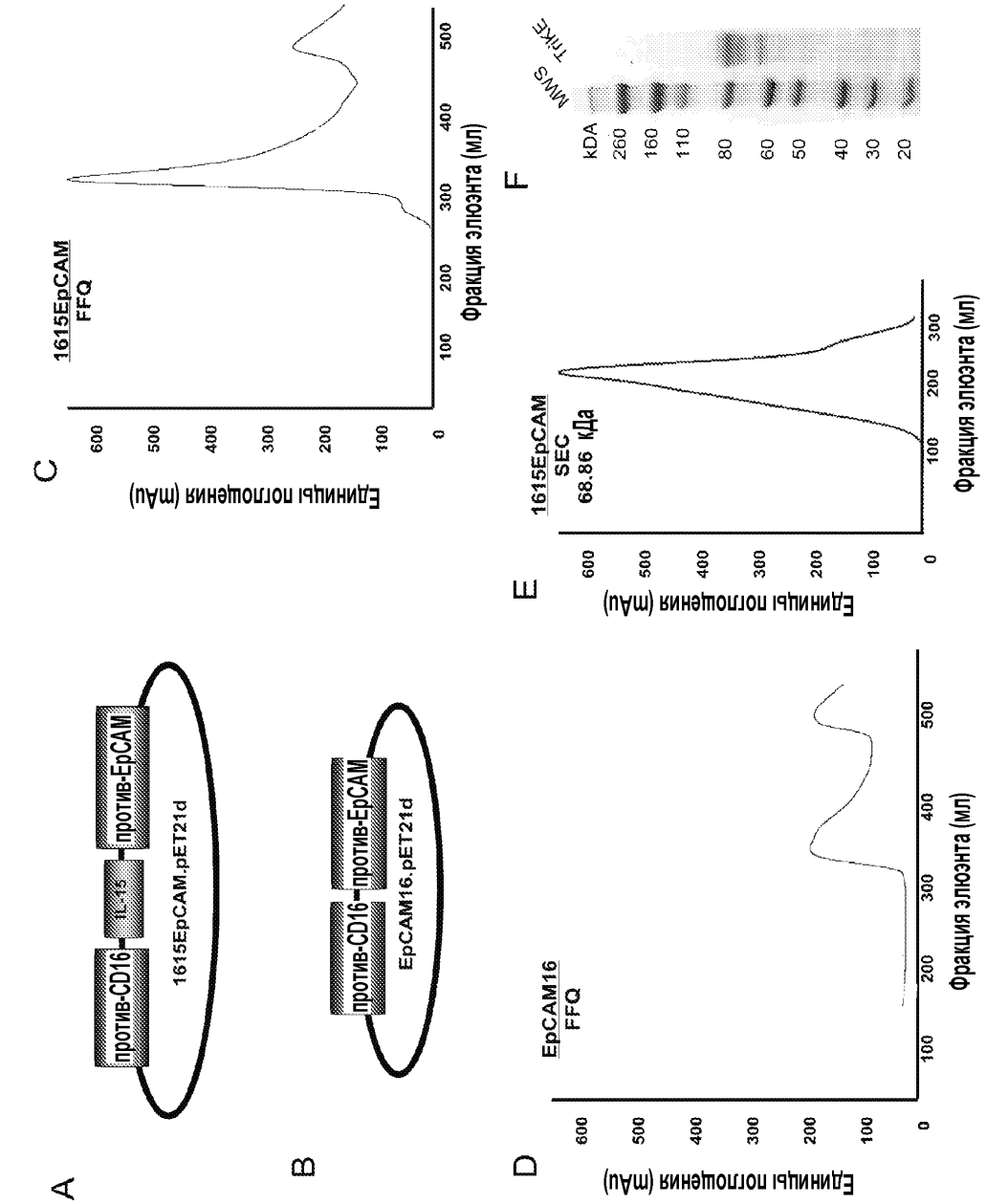
ФИГ. 6

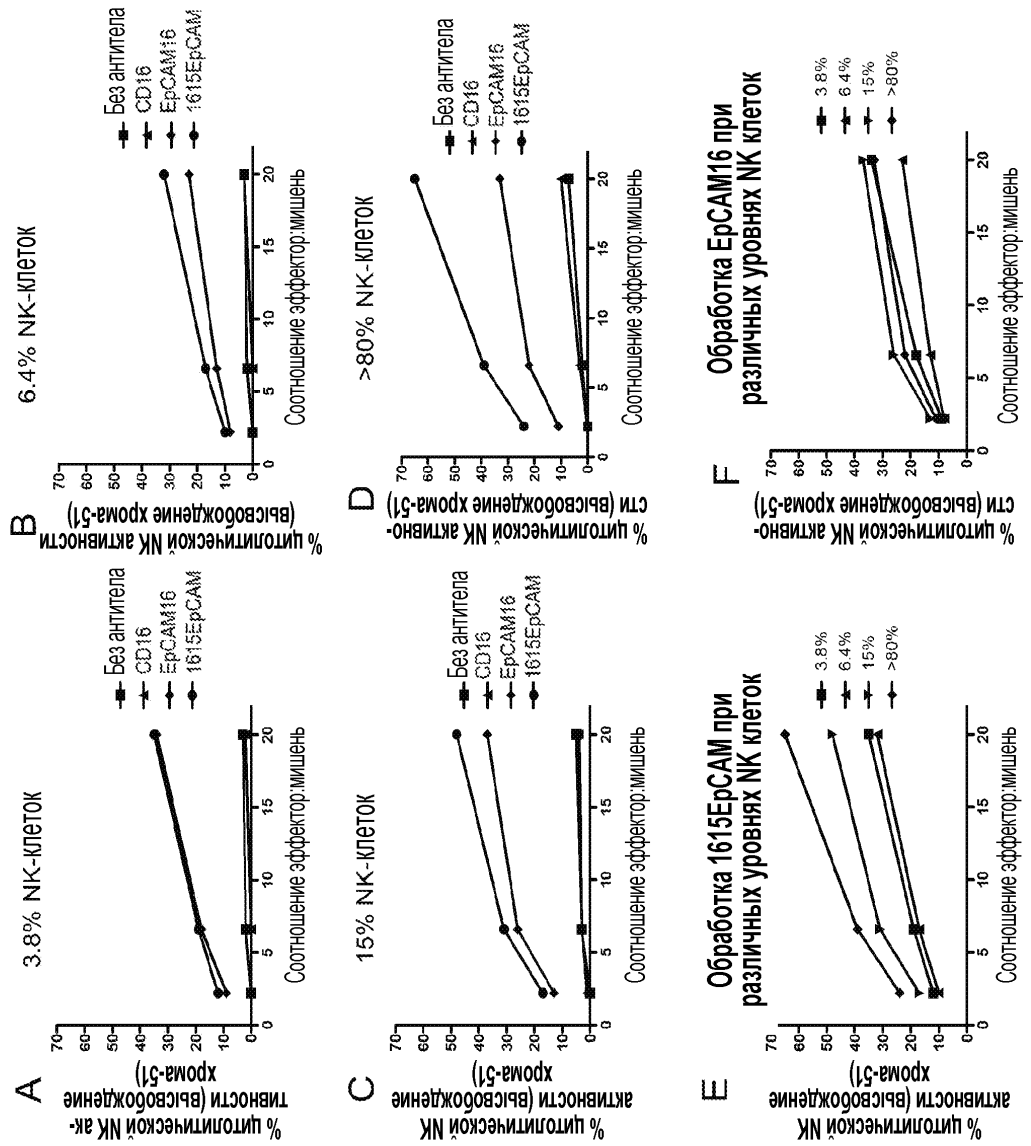

A.
Изображение в 14 сутки
Изображение в 21 сутки
HL-60-luc
HL-60-luc + NK + 1633
HL-60-luc + NK + 161533
B.
Сутки 14
Сутки 21
Счеты
HL-60-luc
HL-60-luc + NK + 1633
HL-60-luc + NK + 161533
C.
HL-60-luc
HL-60-luc + NK + 1633
HL-60-luc + NK + 161533
2
18
4829
D.
Событий CD56+CD3- в пределах 60 с регистрации


PB 1 HL-60
PB 2 HL-60
Без обработки
161533
161533NL
163315
151633
% цитолитической NK активности (высвобождение хрома-51)
Соотношение эффектор:мишень
0
5
10
15
20
25
30

ФИГ. 7

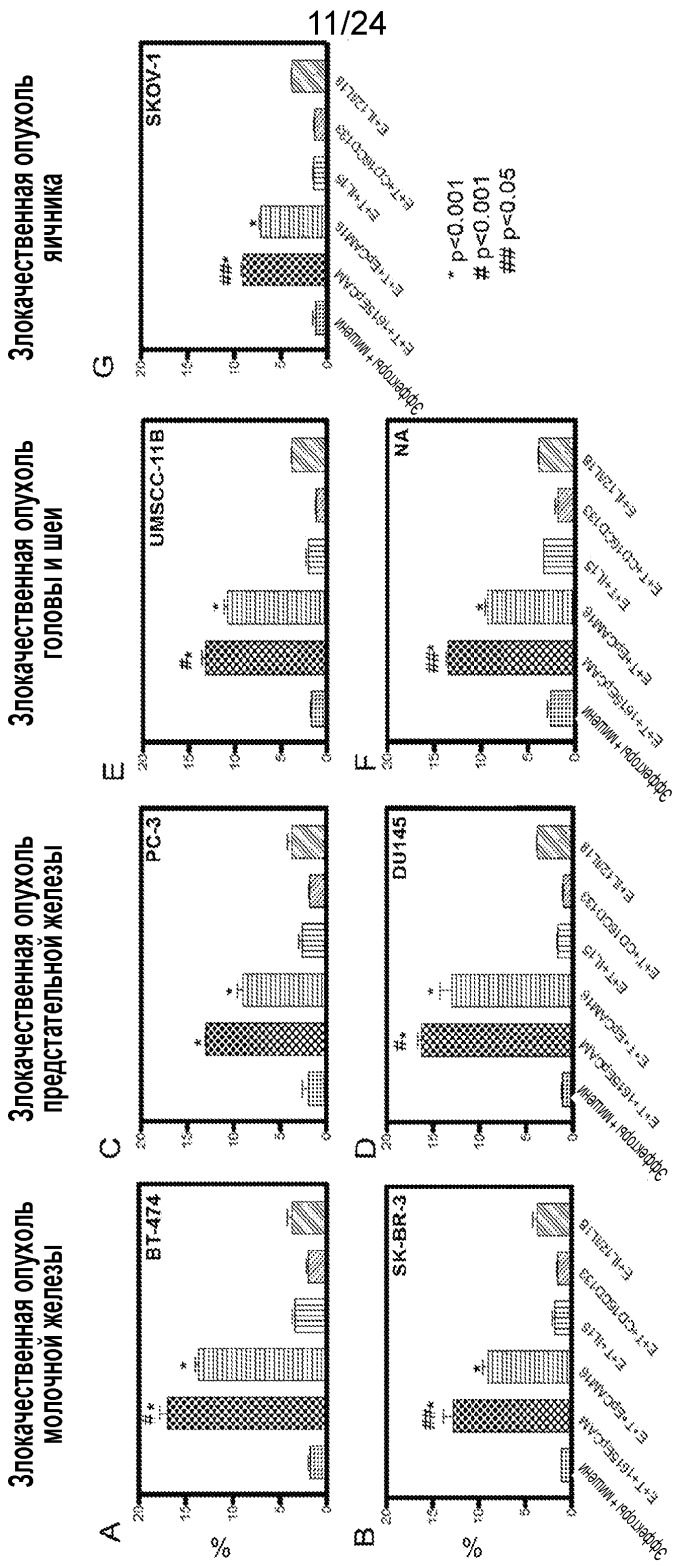
ФИГ. 8


A
против-CD16
IL-15
против-EpCAM
1615EpCAM.pET21d
B
против-CD16
против-EpCAM
EpCAM16.pET21d
C
1615EpCAM
FFQ
Единицы поглощения (mAu)
Фракция элюэнта (мл)
D
EpCAM16
FFQ
Единицы поглощения (mAu)
Фракция элюэнта (мл)
E
1615EpCAM
SEC
68.86 кДа
Единицы поглощения (mAu)
Фракция элюэнта (мл)
F
MWS
TRIKE
kDA
260
160
110
80
60
50
40
30
20

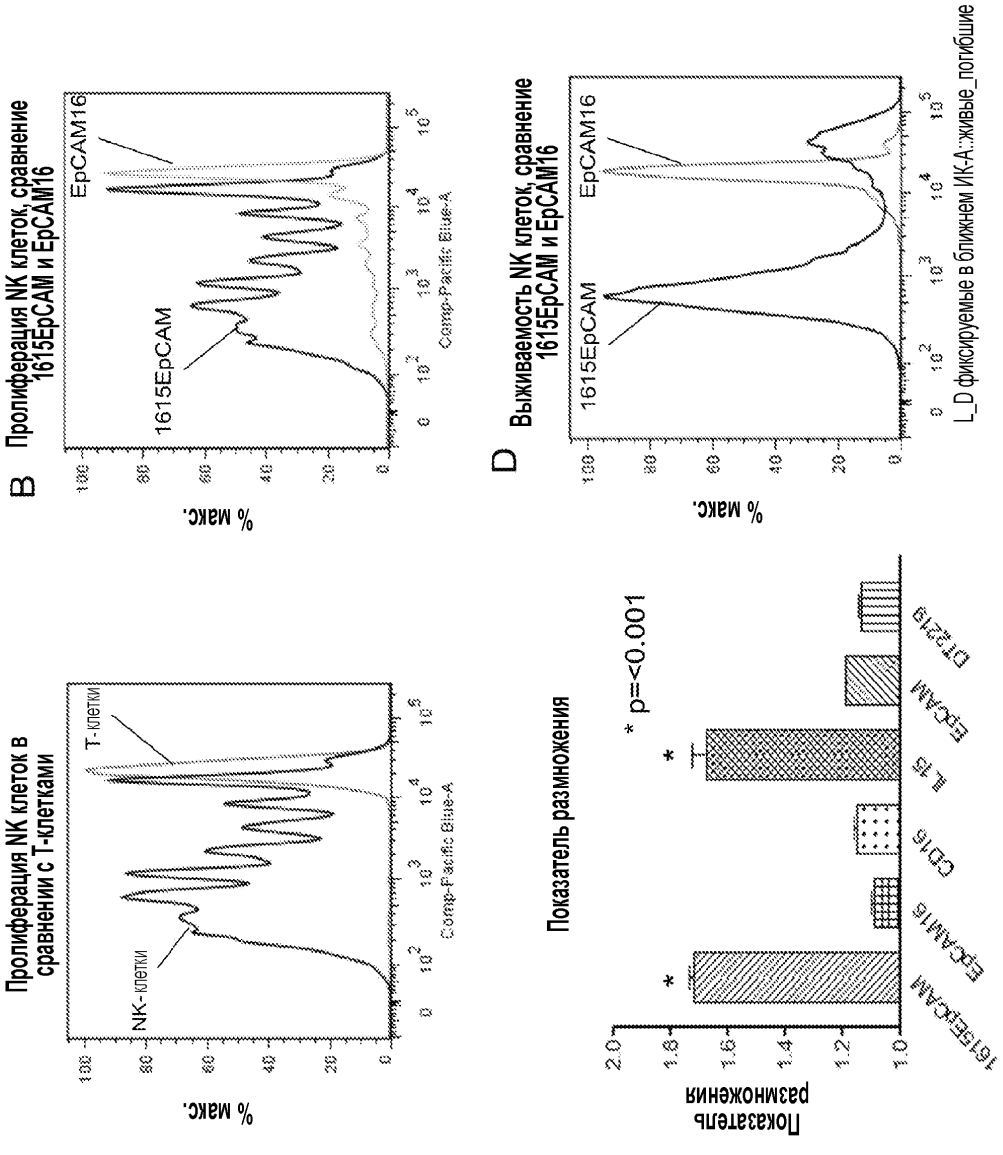

A
3.8% NK-клеток
% цитолитической NK активности (высвобождение хрома-51)
Соотношение эффектор:мишень
Без антитела
CD16
EpCAM16
1615EpCAM
B
6.4% NK-клеток
C
15% NK-клеток
D
>80% NK-клеток
E
Обработка 1615EpCAM при различных уровнях NK клеток
3.8%
6.4%
15%
>80%
F
Обработка EpCAM16 при различных уровнях NK клеток

ФИГ.9

ФИГ. 10

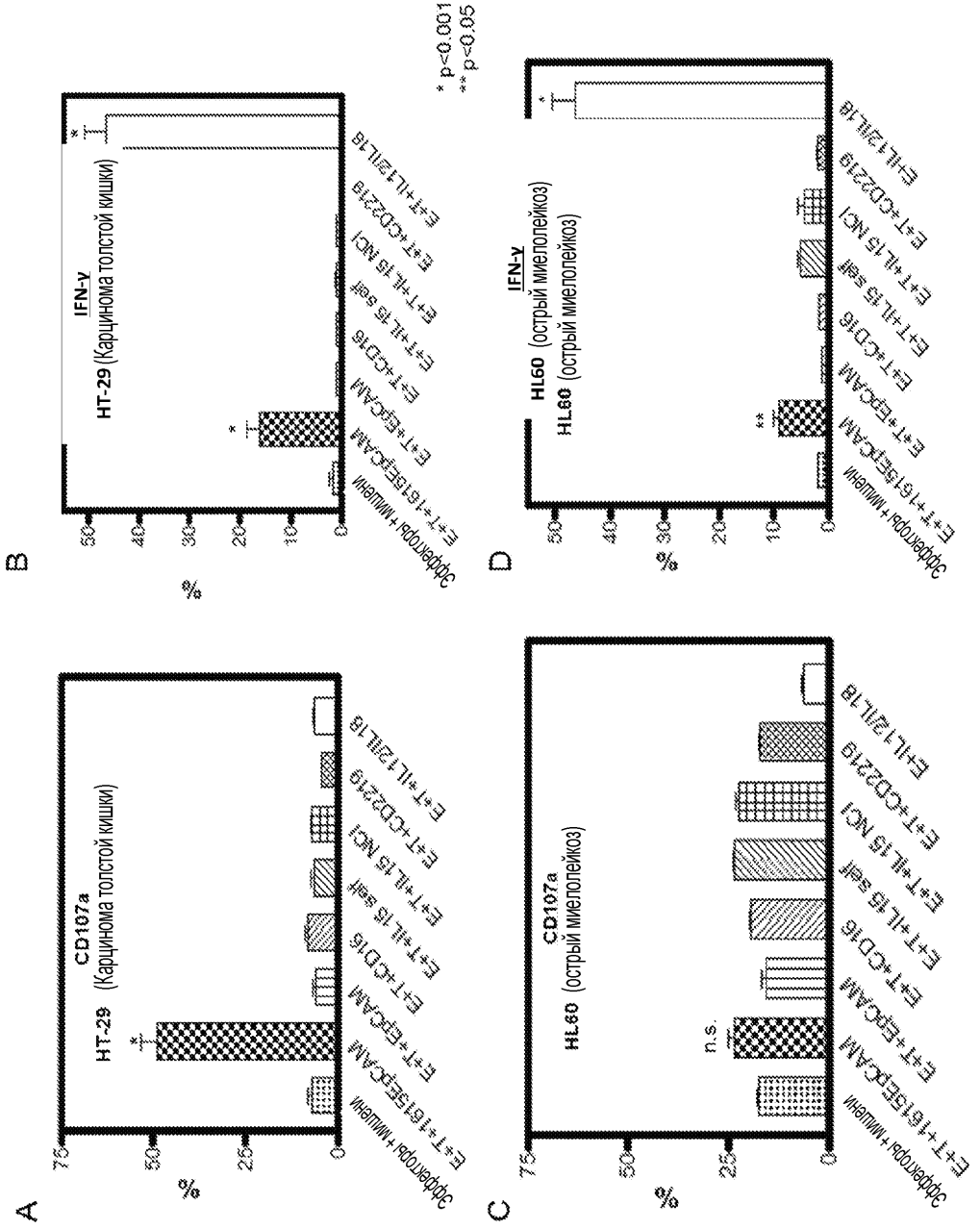

Злокачественная опухоль молочной железы
Злокачественная опухоль предстательной железы
Злокачественная опухоль головы и шеи
Злокачественная опухоль яичника
A
BT-474
B
SK-BR-3
C
PC-3
D
DU145
E
UMSCC-11B
F
NA
G
SKOV-1
%
Эрибулин + Mitomycin
E+T+16 TEC-CAM
E+T+EGC-CAM 16
E+T+IL-13
E+T+CD TEC D-133
E+IL-13 ZAL-16
* p<0.001
# p<0.001
p<0.05

12

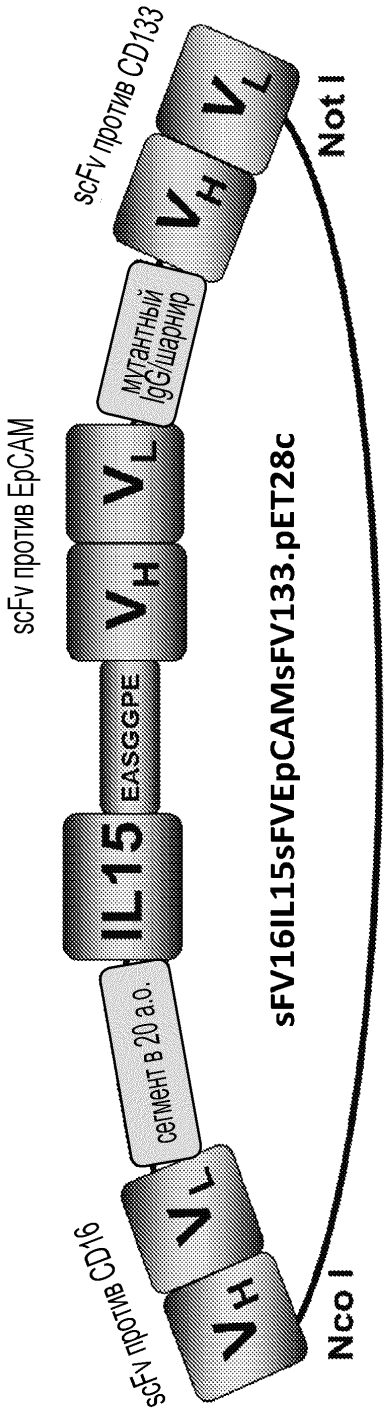

A
Пролиферация NK клеток в сравнении с Т-клетками
NK- клетки
Т- клетки
% макс.
Comp-Pacific Blue-A
B
Пролиферация NK клеток, сравнение 1615EpCAM и EpCAM16
1615EpCAM
EpCAM16
% макс.
Comp-Pacific Blue-A
C
Показатель размножения
* p=<0.001
1615EpCAM
EpCAM16
CD16
IL15
EpCAM
DT2219
D
Выживаемость NK клеток, сравнение 1615EpCAM и EpCAM16
1615EpCAM
EpCAM16
% макс.
L_D фиксируемые в ближнем ИК-А::живые_погибшие

ФИГ. 11

13


A
CD107a
HT-29 (Карцинома толстой кишки)
%
B
IFN-γ
HT-29 (Карцинома толстой кишки)
%
C
CD107a
HL60 (острый миелолейкоз)
n.s.
%
D
IFN-γ
HL60 (острый миелолейкоз)
HL60 (острый миелолейкоз)
%
Эффекторы+мишени
E+T+16/15EpCAM
E+T+EpCAM
E+T+CD16
E+T+IL-15 sαR
E+T+IL-15 NCI
E+T+CD2219
E+IL-12/IL-18
* p<0.001
** p<0.05

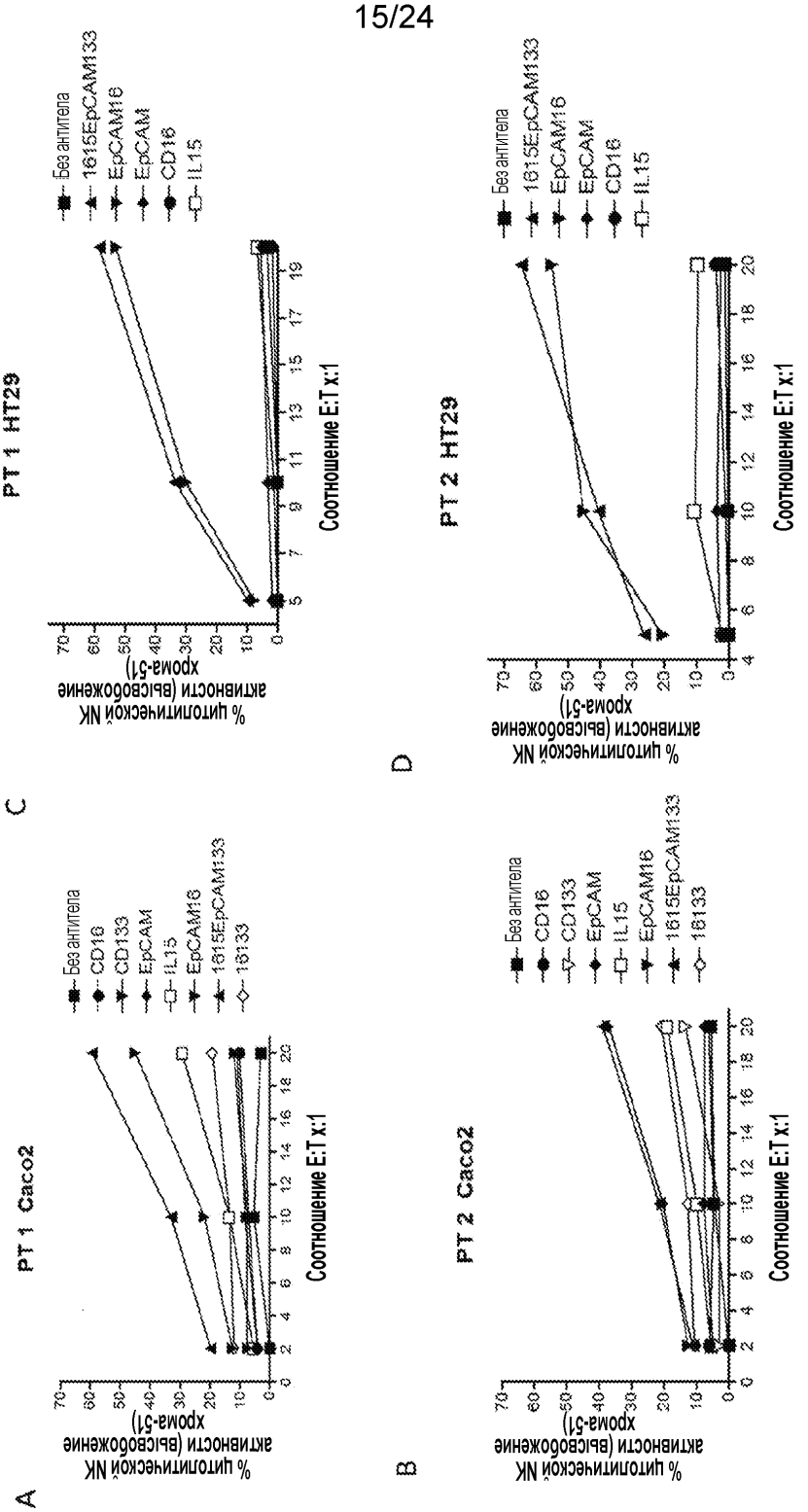
ФИГ. 12



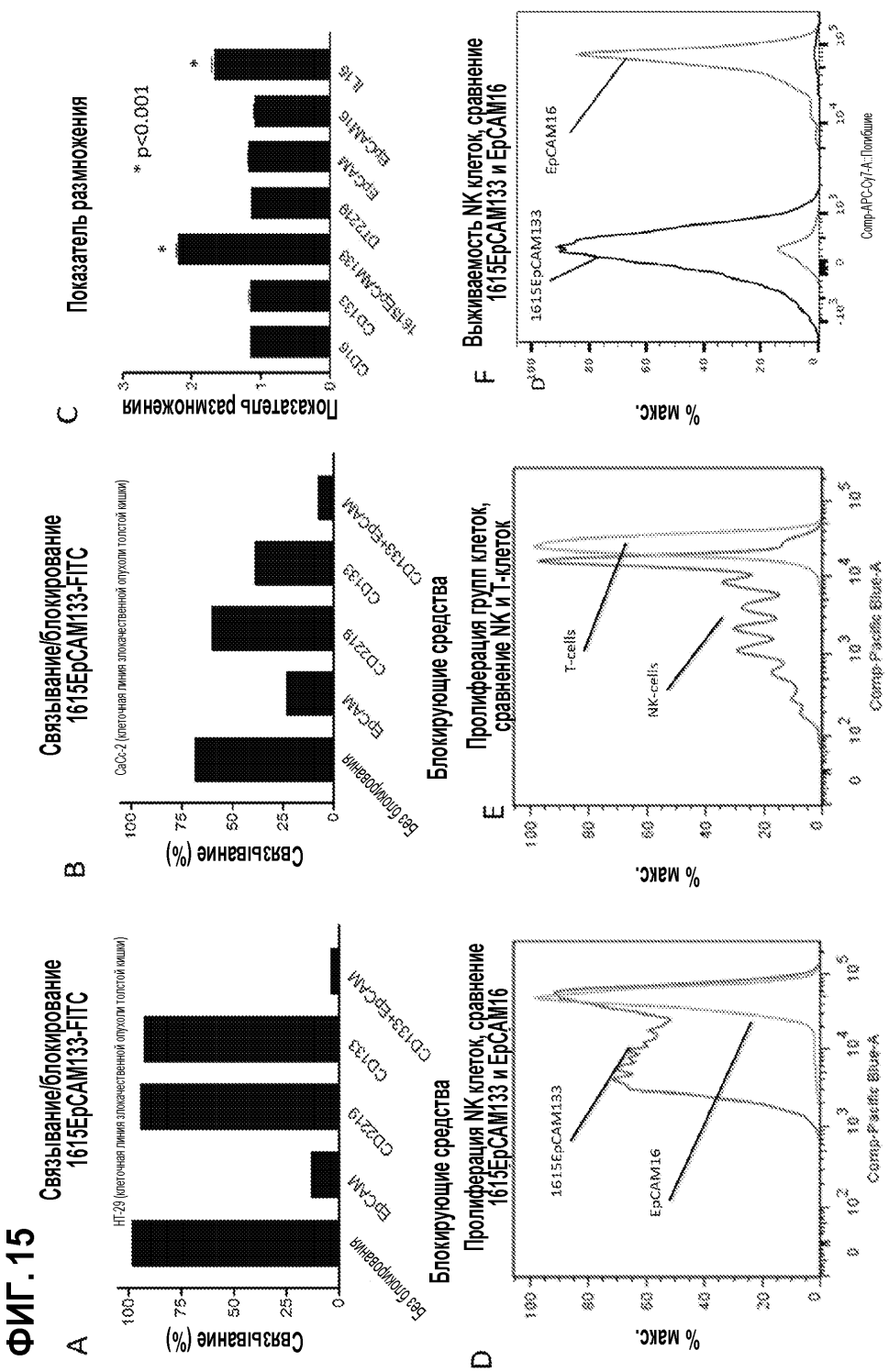
ФИГ. 13

Измененная страница

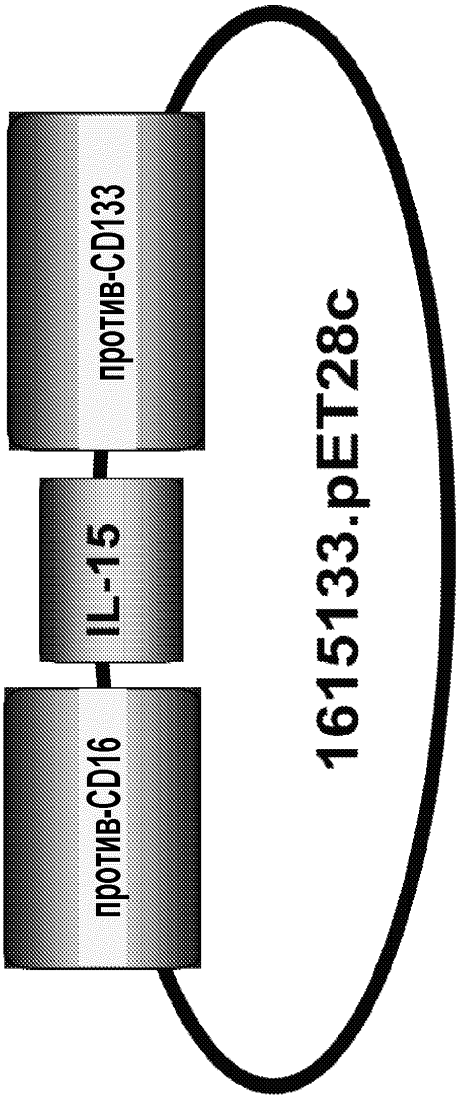
ФИГ. 14


A
PT 1 Caco2
B
PT 2 Caco2
C
PT 1 HT29
D
PT 2 HT29
% цитолитической NK активности (высвобождение хрома-51)
Соотношение E:T x:1
Без антитела
CD16
CD133
EpCAM
IL15
EpCAM16
1615EpCAM133
18133

ФИГ. 15

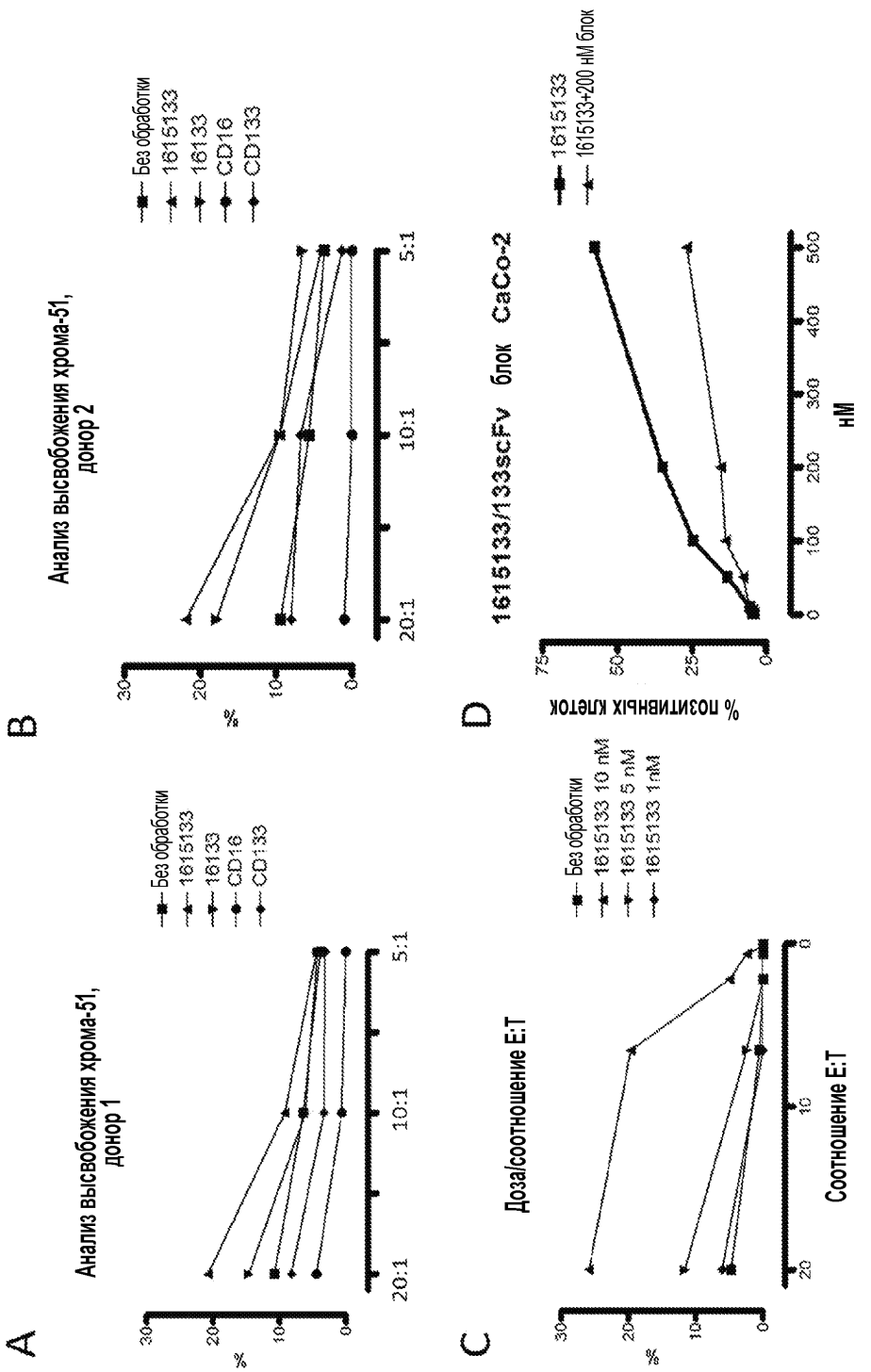

A
Связывание/блокирование 1615EpCAM133-FITC
HT-29 (клеточная линия злокачественной опухоли толстой кишки)
Связывание (%)
Без блокирования
EpCAM
CD2219
CD133
CD133+EpCAM
B
Связывание/блокирование 1615EpCAM133-FITC
CaCo-2 (клеточная линия злокачественной опухоли толстой кишки)
Связывание (%)
Без блокирования
EpCAM
CD2219
CD133
CD133+EpCAM
C
Показатель размножения
* p<0.001
Показатель размножения
CD16
CD133
1615EpCAM133
CD2219
EpCAM
EpCAM16
IL15
D
Блокирующие средства
Пролиферация NK клеток, сравнение 1615EpCAM133 и EpCAM16
% макс.
1615EpCAM133
EpCAM16
Comp-Pacific Blue-A
E
Блокирующие средства
Пролиферация групп клеток, сравнение NK и T-клеток
% макс.
T-cells
NK-cells
Comp-Pacific Blue-A
F
Выживаемость NK клеток, сравнение 1615EpCAM133 и EpCAM16
% макс.
1615EpCAM133
EpCAM16
Comp-APC-Cy7-A::Погибшие

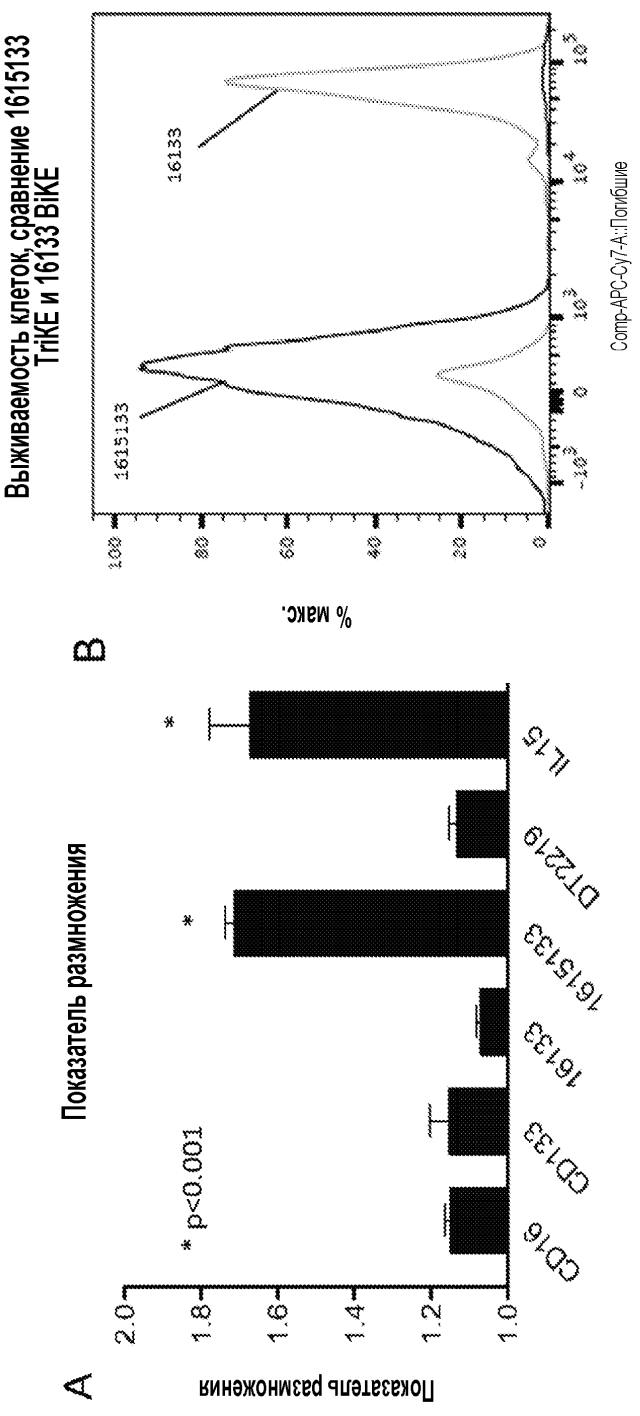
17



ФИГ. 16

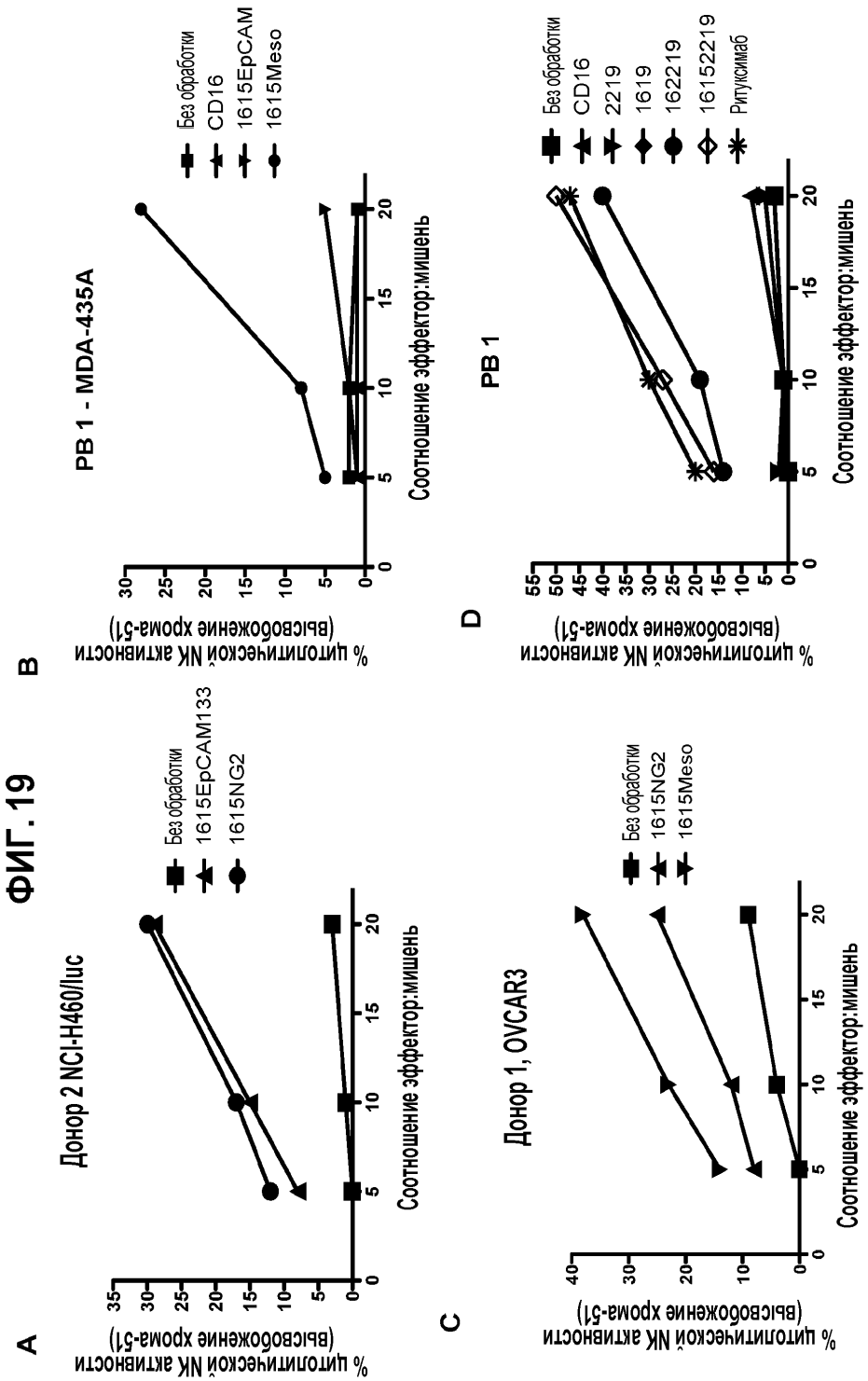
ФИГ. 17

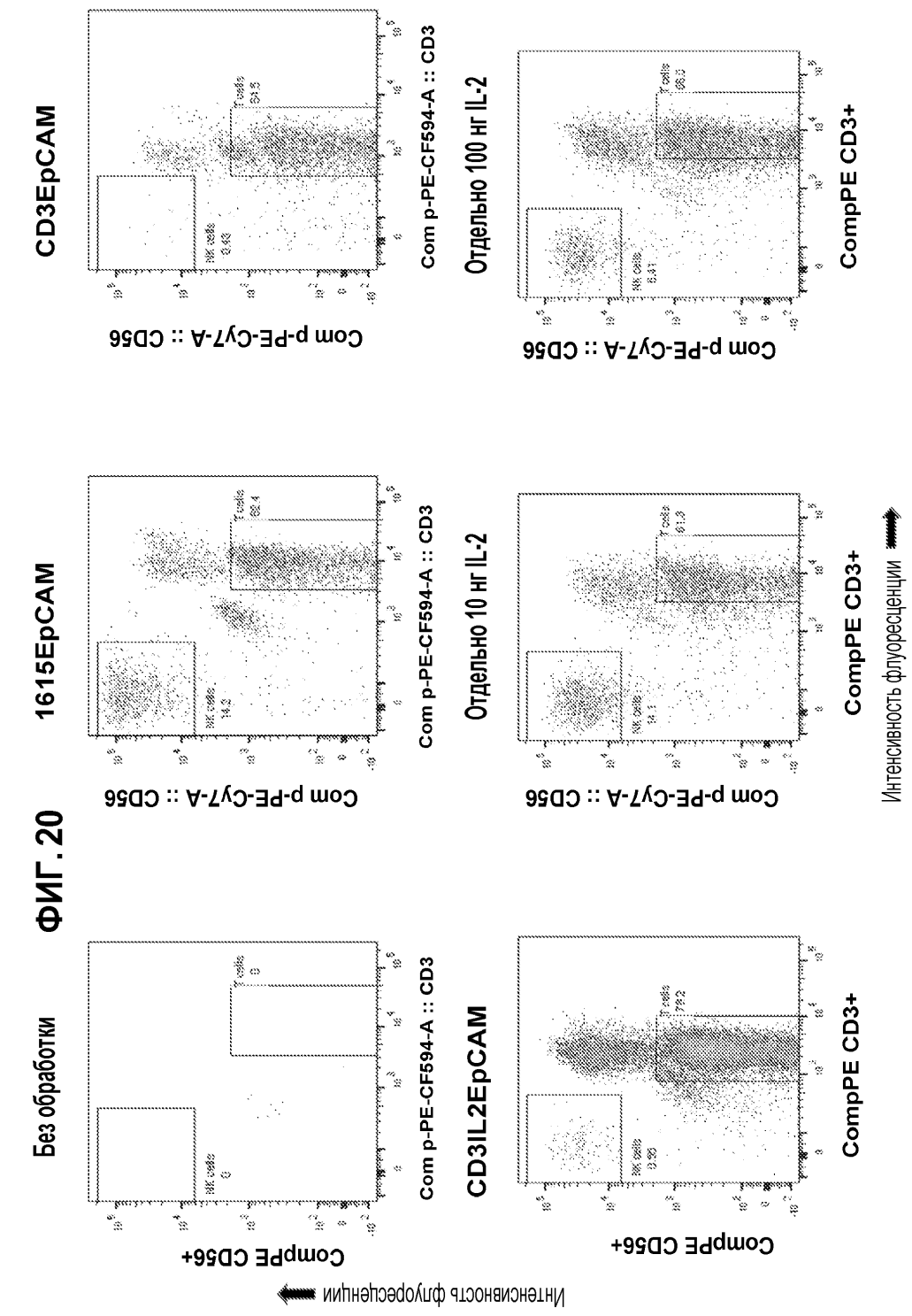

A
Анализ высвобождения хрома-51, донор 1
Без обработки
1615133
16133
CD16
CD133
%
20:1
10:1
5:1
B
Анализ высвобождения хрома-51, донор 2
C
Доза/соотношение E:T
1615133 10 nM
1615133 5 nM
1615133 1nM
Соотношение E:T
D
1615133/133scFv блок CaCo-2
% позитивных клеток
1615133+200 нМ блок
нМ


A
Показатель размножения
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
* p<0.001
*
*
CD16
CD133
16133
1615133
DT2219
IL15
B
% макс.
Выживаемость клеток, сравнение 1615133 TriKE и 16133 BiKE
1615133
16133
Comp-APC-Cy7-A::Погибшие

ФИГ. 18

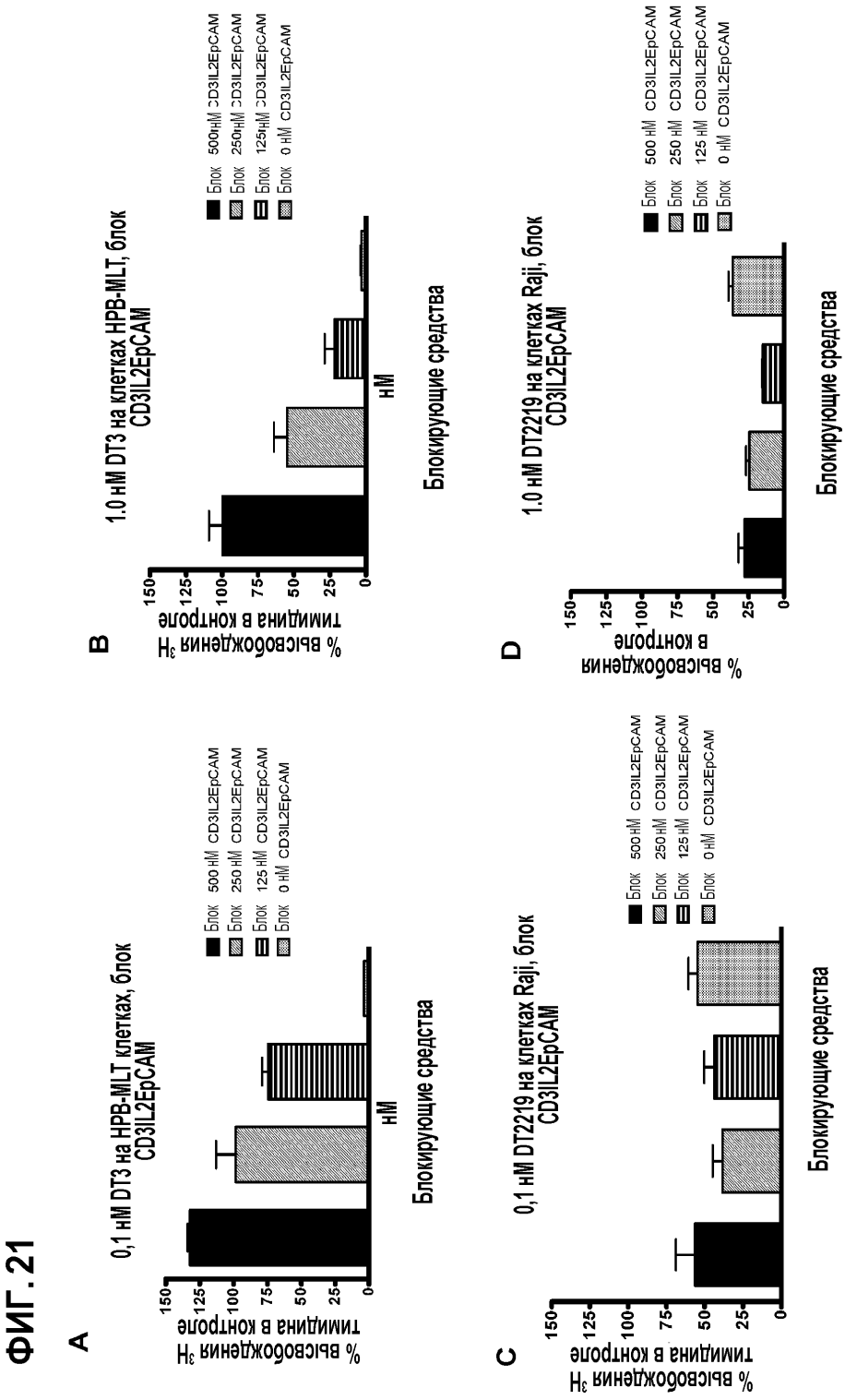
ФИГ. 19

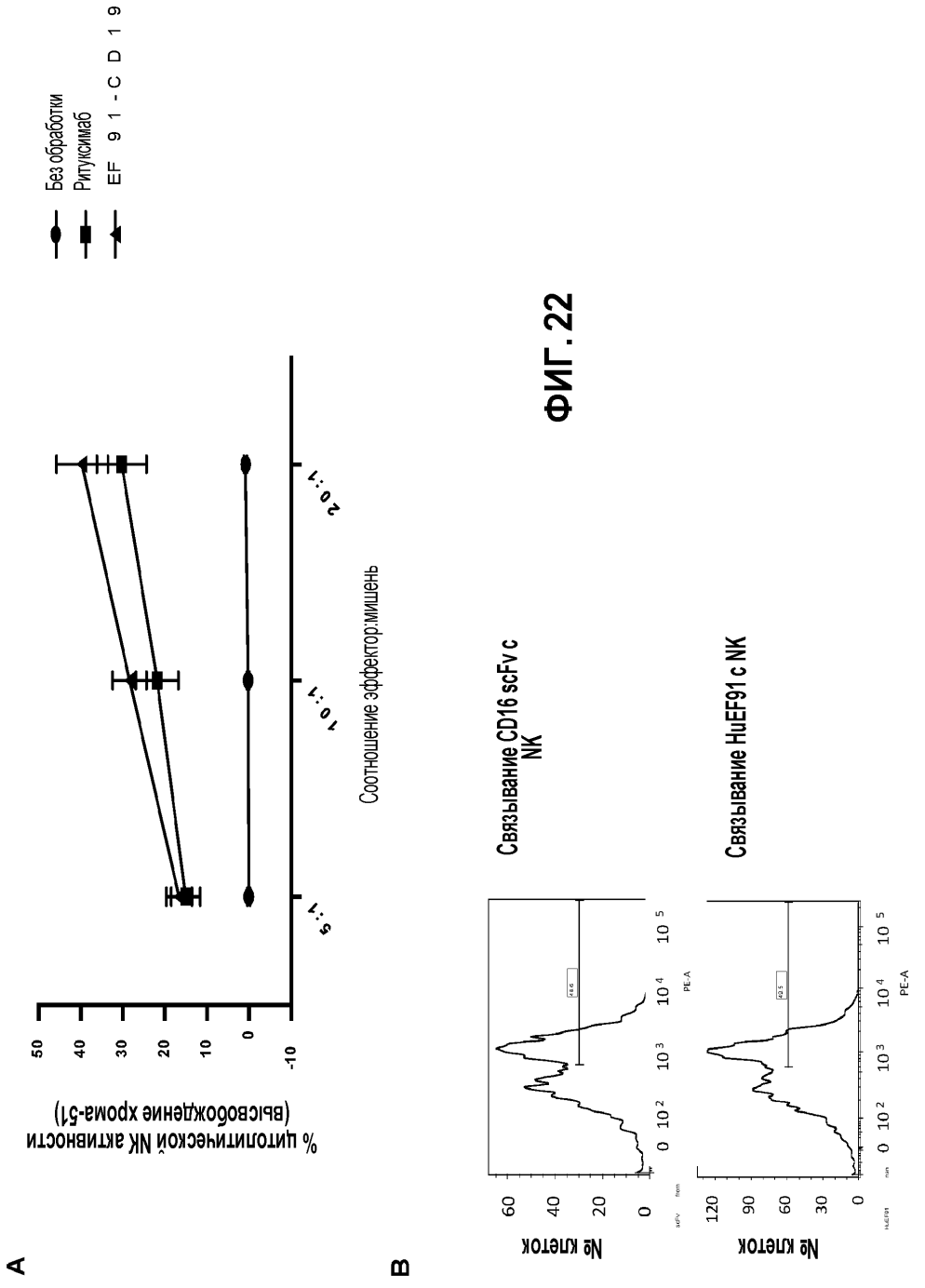

A
Донор 2 NCI-H460/luc
Без обработки
1615EpCAM133
1615NG2
% цитолитической NK активности (высвобождение хрома-51)
Соотношение эффектор:мишень
B
PB 1 - MDA-435A
Без обработки
CD16
1615EpCAM
1615Meso
% цитолитической NK активности (высвобождение хрома-51)
Соотношение эффектор:мишень
C
Донор 1, OVCAR3
Без обработки
1615NG2
1615Meso
% цитолитической NK активности (высвобождение хрома-51)
Соотношение эффектор:мишень
D
PB 1
Без обработки
CD16
2219
1619
162219
16152219
Ритуксимаб
% цитолитической NK активности (высвобождение хрома-51)
Соотношение эффектор:мишень


Без обработки
1615EpCAM
CD3IL2EpCAM
CD3EpCAM
Отдельно 10 нг IL-2
Отдельно 100 нг IL-2
Com p-PE-CF594-A :: CD3
Com p-PE-Cy7-A :: CD56
CompPE CD56+
CompPE CD3+
Интенсивность флуоресценции

ФИГ. 20

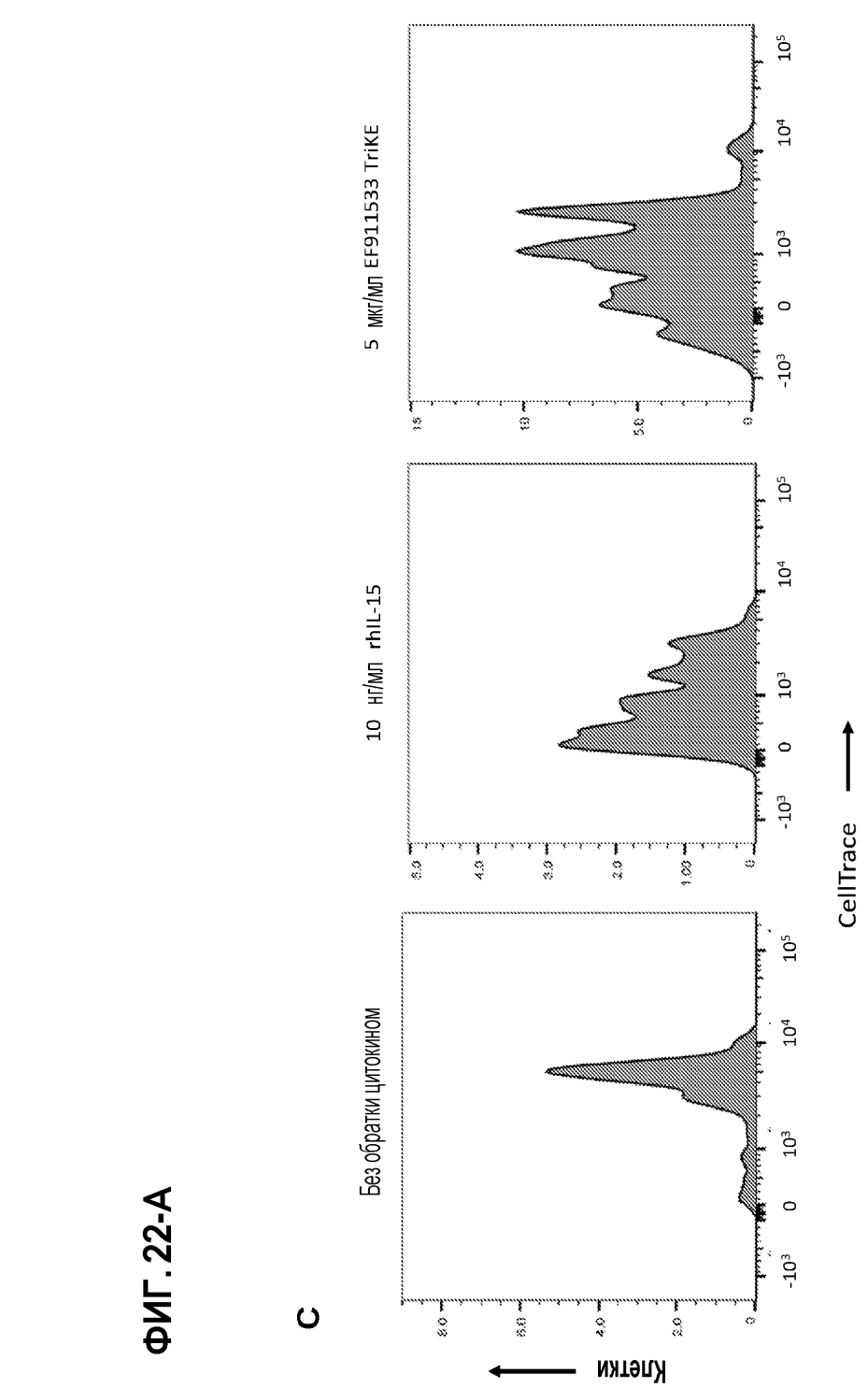
ФИГ. 21


A
0,1 нМ DT3 на HPB-MLT клетках, блок CD3IL2EpCAM
% высвобождения 3H тимидина в контроле
Блок 500 нМ CD3IL2EpCAM
Блок 250 нМ CD3IL2EpCAM
Блок 125 нМ CD3IL2EpCAM
Блок 0 нМ CD3IL2EpCAM
нМ
Блокирующие средства
B
1.0 нМ DT3 на клетках HPB-MLT, блок CD3IL2EpCAM
% высвобождения 3H тимидина в контроле
Блок 500нМ CD3IL2EpCAM
Блок 250нМ CD3IL2EpCAM
Блок 125нМ CD3IL2EpCAM
Блок 0 нМ CD3IL2EpCAM
нМ
Блокирующие средства
C
0,1 нМ DT2219 на клетках Raji, блок CD3IL2EpCAM
% высвобождения 3H тимидина в контроле
Блок 500 нМ CD3IL2EpCAM
Блок 250 нМ CD3IL2EpCAM
Блок 125 нМ CD3IL2EpCAM
Блок 0 нМ CD3IL2EpCAM
Блокирующие средства
D
1.0 нМ DT2219 на клетках Raji, блок CD3IL2EpCAM
% высвобождения в контроле
Блок 500 нМ CD3IL2EpCAM
Блок 250 нМ CD3IL2EpCAM
Блок 125 нМ CD3IL2EpCAM
Блок 0 нМ CD3IL2EpCAM
Блокирующие средства


A
Без обработки
Ритуксимаб
EF 9 1 - C D 1 9
% цитотитической NK активности
(высвобождение хрома-51)
50
40
30
20
10
0
-10
5:1
10:1
20:1
Соотношение эффектор:мишень
B
Связывание CD16 scFv с NK
Связывание HuEF91 с NK
№ клеток
60
40
20
0
120
90
60
30
0
0 10 2 10 3 10 4 10 5
PE-A

ФИГ. 22

ФИГ.22-А


C
Без обработки цитокином
10 нг/мл rhIL-15
5 мкг/мл EF911533 TriKE
Клетки
CellTrace
-10³
0
10³
10⁴
10⁵