



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **129144** (13) **C2**
(51) МПК (2025.01)**C07K 14/725** (2006.01)**C07K 16/30** (2006.01)**C12N 15/62** (2006.01)**A61K 35/17** (2025.01)

A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

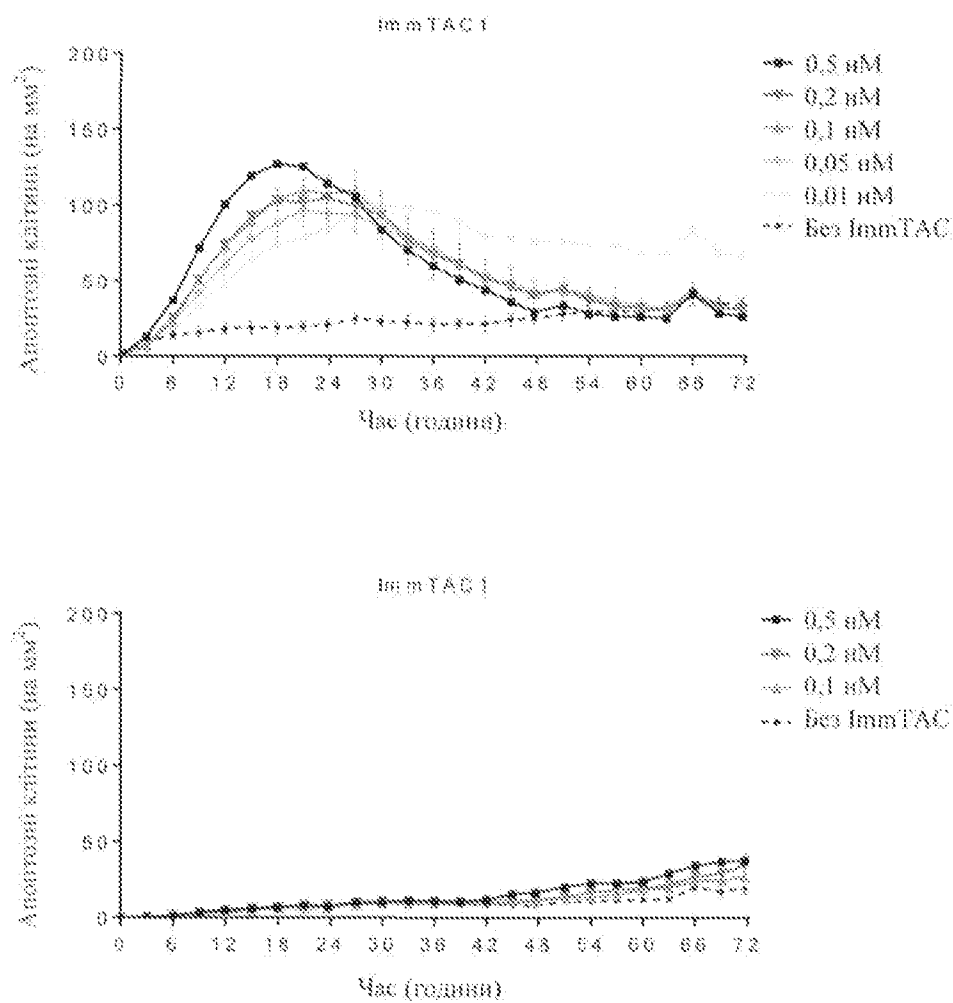
(21) Номер заявки: а 2018 10441	(72) Винахідник(и): Гейз Конор (GB), Гібберт Лінда (GB), Лідді Натаніел (GB), Ман Тейра (GB), Раман Марін (GB)
(22) Дата подання заявки: 07.04.2017	(73) Володілець (володільці): ІММУНОКОР ЛІМІТЕД, 101 Park Drive, Milton Park, Abingdon Oxfordshire OX14 4RY, United Kingdom (GB)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 30.01.2025	(74) Представник: Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 1606009.7	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2016/007570 A2, 14.01.2016 WO 2013/053021 A1, 18.04.2013 WO 2004/074322 A1, 02.09.2004 WO 2014/118236 A2, 07.08.2014 WO 2004/023973 A2, 25.03.2004
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 08.04.2016	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: GB	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.02.2019, Бюл.№ 4	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 29.01.2025, Бюл.№ 5	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/GB2017/050985, 07.04.2017	

(54) Т-КЛІТИННИЙ РЕЦЕПТОР**(57) Реферат:**

Винахід стосується Т-клітинного рецептора (TCR), який зв'язує рестриктований по HLA-A*02 пептид GVDYDGRENTV (SEQ ID NO: 1), що отриманий з ракового антигена зародкового типу MAGE A4. Вказаний TCR може містити неприродні мутації в межах варіабельних доменів альфа- та/або бета-ланцюгів відносно нативного TCR для MAGE A4. TCR придатний для застосування як імунотерапевтичний реагент для лікування злоякісного захворювання.

UA 129144 C2

Відповідь у режимі реального часу, що полягає в загибелі антигенпозитивних клітин (верхня панель) та антигеннегативних клітин (нижня панель), на дію злитих молекул TCR для MAGE A4-антитіло до CD3



Фіг. 11a

Даний винахід стосується Т-клітинних рецепторів (TCR), які зв'язують рестрикований по HLA-A*02 пептид GVYDGRENTV (SEQ ID NO: 1), що отриманий з ракового антигена зародкового типу MAGE A4. Вказані TCR можуть містити неприродні мутації в межах варіабельних доменів альфа- та/або бета-ланцюгів відносно нативного TCR для MAGE A4. TCR за даним винаходом є особливо придатними для застосування у ролі нових імунотерапевтичних реагентів для лікування злоякісного захворювання.

Передумови винаходу

Т-клітинні рецептори (TCR) в природних умовах експресуються CD4⁺ та CD8⁺ Т-клітинами. TCR призначені для розпізнавання коротких пептидних антигенів, які представлені на поверхні антигенпрезентувальних клітин у комплексі з молекулами головного комплексу гістосумісності (MHC) (у людини молекули MHC також відомі як антигени лейкоцитів людини або HLA) [Davis, et al., (1998), Annu Rev Immunol 16: 523-544.]. CD8⁺ Т-клітини, які також називають цитотоксичними Т-клітинами, специфічно розпізнають пептиди, зв'язані з молекулами MHC класу I, та загалом відповідають за виявлення та опосередковування руйнування уражених захворюванням клітин. CD8⁺ Т-клітини здатні руйнувати ракові, а також інфіковані вірусом клітини; проте афінність TCR, які експресуються специфічними щодо раку Т-клітинами у природному репертуарі, як правило, є низькою внаслідок тимусної селекції, це означає, що ракові клітини часто уникають виявлення та руйнування. Нові імунотерапевтичні підходи, спрямовані на поліпшення розпізнавання раку Т-клітинами, є дуже перспективною стратегією для розробки ефективних протиракових засобів лікування.

MAGE A4 належить до ракових антигенів родини MAGE, які кодуються генами зародкової типу [De Plaen, et al., (1994), Immunogenetics 40(5): 360-369], і має номер доступу Uniprot P43358. Було з'ясовано, що такі антигени часто експресуються в різних типах раку, в той час як їхня експресія у нормальних тканинах обмежується дорослими сім'яниками та іншими імунно-привілейованими частинами, включаючи плаценту. Специфічний зв'язок цих генів із типами раку робить їх ідеальними мішенями для протиракових терапевтичних препаратів. Точна функція MAGE A4 залишається невідомою, але вважається, що він бере участь в ембріональному розвитку. Повідомлялося про високий рівень експресії MAGE A4 в пухлинах деяких типів, включаючи меланому, типи ракових пухлин стравоходу, голови та шиї, легені, молочної залози та сечового міхура [Bergeron, (2009), Int J Cancer 125(6): 1365-1371; Cabezon, et al., (2013), Mol Cell Proteomics 12(2): 381-394; Cuffel, et al., (2011), Int J Cancer 128(11): 2625-2634; Forghanifard, et al., (2011), Cancer Biol Ther 12(3): 191-197; Karimi, et al., (2012), Clin Lung Cancer 13(3): 214-219; Svobodova, et al., (2011), Eur J Cancer 47(3): 460-469]. 10-мерний пептид GVYDGRENTV (SEQ ID NO 1) відповідає амінокислотам 230-239 повнорозмірного білка MAGE A4. Цей пептид зв'язується з HLA-A*02, та, як було показано, комплекс пептид-HLA стимулює цитотоксичні Т-клітини, що спричиняє лізис MAGE A4 позитивних, HLA-A*02 позитивних пухлинних клітин [Duffour, et al., (1999), Eur J Immunol 29(10): 3329-3337, та WO2000020445]. Отже, комплекс GVYDGRENTV-HLA-A*02 забезпечує застосовний цільовий антиген для імунотерапевтичного втручання.

Ідентифікація конкретних послідовностей TCR, що зв'язуються з комплексом GVYDGRENTV-HLA-A*02 з високою специфічністю, сприяє розробці нових видів імунотерапії. Терапевтичні TCR можуть застосовуватися, наприклад, як розчинні націлювальні засоби, призначені для доставлення цитотоксичних або імунних ефекторних агентів у пухлину [Lissin, et al., (2013). "High-Affinity Monoclonal T-cell receptor (mTCR) Fusions. Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges". S. R. Schmidt, Wiley; Boulter, et al., (2003), Protein Eng 16(9): 707-711; Liddy, et al., (2012), Nat Med 8: 980-987], або, як альтернатива, їх можна застосовувати для конструювання Т-клітин, призначених для адоптивної терапії [June, et al., (2014), Cancer Immunol Immunother 63(9): 969-975]. Проте, з рівня техніки невідомі такі послідовності TCR, а способи ідентифікації TCR з характеристиками специфічності, придатними для терапевтичного застосування, мають високий показник відсіювання і, таким чином, не забезпечують фахівця обґрунтованим очікуванням успіху.

Насамперед фахівець повинен ідентифікувати придатну вихідну або каркасну послідовність. Як правило, такі послідовності отримують з природних джерел, наприклад, з антигенреактивних Т-клітин, екстрагованих з крові донора. Зважаючи на рідкість специфічних щодо раку Т-клітин у природному репертуарі, часто потрібно проводити скринінг багатьох донорів, наприклад, 20 або більше, перед тим, як можна буде знайти реактивну Т-клітину. Процес скринінгу може тривати кілька тижнів або місяців, та, якщо реактивна Т-клітина навіть виявлена, вона може бути непридатною для імунотерапевтичного застосування. Наприклад, відповідь може бути занадто слабкою та/або може бути неспецифічною щодо цільового антигена, як альтернатива, може бути неможливим створення клональної популяції Т-клітин, розмноження або підтримування

лінії даних Т-клітин, щоб отримати достатню кількість матеріалу для ідентифікації правильних послідовностей ланцюга TCR. Крім того, оскільки TCR є виродженими та, як було прогнозовано, здатні зв'язувати приблизно один мільйон різних HLA-пептидів [Wooldridge, et al., (2012), *J Biol Chem* 287(2): 1168-1177], навіть досвідченим фахівцям надзвичайно важко визначити, чи має конкретний TCR профіль специфічності, який зробить його придатним для конструювання засобу для терапевтичного застосування.

Послідовності TCR, що є придатними як вихідні або каркасні послідовності, повинні характеризуватися задовільною афінністю щодо цільового комплексу пептид-HLA, що становить, наприклад, 200 мкМ або більше, демонструвати високий рівень специфічності щодо мішені, наприклад, виявляти відносно слабе зв'язування або відсутність зв'язування з комплексами альтернативний пептид-HLA, піддаватися змінам для застосування у дисплейних бібліотеках, таких як фаговий дисплей, і бути здатними до рефолдингу та очищення з високим виходом.

TCR, що існують у природі, характеризуються слабкою афінністю щодо цільового антигена (у низькому мікромолярному діапазоні) порівняно з антитілами, а TCR проти ракових антигенів, як правило, характеризуються більш слабким розпізнаванням антигена, ніж TCR, специфічні щодо вірусу [Aleksic, et al. (2012). *Eu J Immunol.*, 42(12), 3174-3179]. Така слабка афінність разом із зниженням експресії HLA на ракових клітинах означає, що терапевтичні TCR, призначені для імунотерапії раку, потребують конструювання, щоб підвищити їхню афінність щодо цільового антигена і, таким чином, спричинити більш потужну відповідь. Для розчинних націлювальних засобів на основі TCR необхідна афінність зв'язування з антигеном TCR у діапазоні від наномолярної до пікомолярної, при цьому напівперіод зв'язування має становити декілька годин. Поліпшена активність, зумовлена розпізнаванням антигена з високою афінністю у разі невеликої кількості епітопів, наведена як приклад на фігурах 1e та 1f з Liddy et al. [Liddy, et al. (2012), *Nat Med*, 18(6), 980-987]. Дозрівання афінності, як правило, передбачає, що фахівець має ідентифікувати специфічні мутації та/або комбінації мутацій, включаючи без обмеження заміни, вставки та/або делеції, які можуть бути введені до вихідної послідовності TCR, щоб підвищити ефективність розпізнавання антигена. Способи ідентифікації мутацій даного TCR, які забезпечують посилення афінності, відомі з рівня техніки, наприклад, застосування дисплейних бібліотек [Li et al., (2005) *Nat Biotechnol.* 23(3):349-354; Holler et al., (2000). *Proc Natl Acad Sci USA*; 97(10):5387-5392]. Однак, щоб забезпечити значне підвищення афінності даного TCR проти даної мішені, фахівець має вибирати специфічні мутації та/або комбінації мутацій з великого пулу можливих альтернатив. Специфічні мутації та/або комбінації мутацій, які забезпечують значне підвищення афінності, не є прогнозованими, та спостерігається високий показник відсіювання. У багатьох випадках може бути неможливо досягти значного підвищення афінності із застосуванням даної вихідної послідовності TCR.

У процесі дозрівання афінності необхідно також враховувати необхідність збереження антигенної специфічності TCR. Підвищення афінності TCR щодо його цільового антигена призводить до суттєвого ризику прояву перехресної реактивності з іншими непередбачуваними мішенями внаслідок притаманної виродженості розпізнавання антигена в TCR [Wooldridge, et al., (2012), *J Biol Chem* 287(2): 1168-1177; Wilson, et al., (2004), *Mol Immunol* 40(14-15): 1047-1055; Zhao et al., (2007) *J.Immunol*, 179;9, 5845-5854]. На природному рівні афінності розпізнавання перехресно реактивного антигена може бути занадто слабким для забезпечення відповіді. Якщо перехресно реактивний антиген представлений на нормальних здорових клітинах, цілком ймовірним є нецільове зв'язування *in vivo*, що може проявлятися як клінічна токсичність. Таким чином, окрім забезпечення підвищення ефективності зв'язування з антигеном фахівцю необхідно вибирати мутації та/або комбінації мутацій, які дозволяють TCR зберігати високу специфічність щодо цільового антигена та демонструвати задовільний профіль безпеки в доклінічному тестуванні. До того ж, такі мутації та/або комбінації мутацій не є прогнозованими. Показник відсіювання на цій стадії є навіть більшим, і в багатьох випадках можна зовсім не досягти успіху, виходячи з даної вихідної послідовності TCR.

Мутації, необхідні для забезпечення високої афінності та високої специфічності, також повинні забезпечити TCR, який може піддаватися експресії, рефолдингу та очищенню з припустимим виходом та який є дуже стабільним в очищеній формі.

Незважаючи на описані вище труднощі ідентифікації послідовностей TCR з відповідними характеристиками для терапевтичного застосування, автори даного винаходу несподівано виявили послідовність TCR, яка забезпечує ідеальну відправну точку або каркас для одержання терапевтичних TCR. Крім того, автори даного винаходу несподівано ідентифікували придатні мутації, які можуть вводитися в альфа та бета варіабельні домени каркасу, щоб одержати

послідовності TCR з ідеальними характеристиками для імунотерапії на основі TCR, що націлюється на типи раку, які експресують MAGE A4.

Короткий опис винаходу

У першому аспекті даного винаходу передбачений Т-клітинний рецептор (TCR), який характеризується властивістю зв'язування з GYVDGRENTV (SEQ ID NO: 1) у комплексі з HLA-A*02 та містить варіабельний домен альфа-ланцюга TCR та/або варіабельний домен бета-ланцюга TCR,

при цьому варіабельний домен альфа-ланцюга містить амінокислотну послідовність, яка характеризується щонайменше 90 % ідентичністю з послідовністю амінокислотних залишків 1-113 з SEQ ID NO: 2, та/або

варіабельний домен бета-ланцюга містить амінокислотну послідовність, яка характеризується щонайменше 90 % ідентичністю з послідовністю амінокислотних залишків 1-116 з SEQ ID NO: 3.

Варіабельний домен альфа-ланцюга може містити амінокислотну послідовність, яка характеризується щонайменше 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю з амінокислотами 1-113 з SEQ ID NO: 2, та/або варіабельний домен бета-ланцюга може містити амінокислотну послідовність, яка характеризується щонайменше 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю з амінокислотами 1-116 з SEQ ID NO: 3.

У другому аспекті даного винаходу передбачений TCR, що зв'язується з комплексом GYVDGRENTV (SEQ ID NO: 1)-HLA-A*02 з афінністю, яка перевищує 200 мкМ, при цьому CDR 1, 2 і 3 альфа-ланцюга містять SEQ ID NO 6, 7 і 8 відповідно, та/або CDR 1, 2 і 3 бета-ланцюга містять SEQ ID NO 11, 12 і 13 відповідно; та/або щонайменше одна з CDR містить одну або декілька консервативних замін відносно SEQ ID NO: 6-8 і 11-13; та/або щонайменше одна з CDR містить не більше трьох допустимих замін відносно SEQ ID NO: 6-8 і 11-13.

Афінність TCR за даним винаходом щодо комплексу GYVDGRENTV-HLA-A*02 може бути в діапазоні від 200 мкМ до 1 пМ. Переважно вказані заміни не змінюють афінність зв'язування більше ніж на +/- 50 % або більш переважно не більше ніж на +/-20 % відносно TCR, що не містить замін. Переважно вказані заміни не підвищують афінність зв'язування комплексів альтернативний пептид-HLA.

Каркасний TCR характеризується застосуванням наступних варіабельних альфа-та бета-ланцюгів:

альфа-ланцюг: TRAV10*01/TRAJ6*01

бета-ланцюг: TRBV28*01/TRBD1*01/TRBJ2-7*01/

(слід зазначити, що термін '*01' указує на алельний варіант цієї послідовності, як зазначено в номенклатурі IMGT);

та наступні послідовності CDR3 альфа- і бета-ланцюгів:

альфа-ланцюг: WNHSGGSYIPTF (SEQ ID NO: 8)

бета-ланцюг: ASSFLMTSGDPYEQYF (SEQ ID NO: 13)

Термін 'каркасний TCR' або 'вихідний TCR' застосовують у даній заявці як синоніми термінів TCR дикого типу, або 'WT TCR', або 'не підданий мутації TCR', або 'нативний TCR', або 'первісний TCR' для позначення TCR з варіабельний доменом альфа-ланцюга, що містить залишки 1-113 з SEQ ID NO: 2, та варіабельний домен бета-ланцюга, що містить залишки 1-116 з SEQ ID NO: 3. Константний домен WT TCR може бути повнорозмірним, або може бути усіченим та/або підданим мутації для утворення розчинного TCR. У будь-якому випадку у ділянки TRAC та TRBC можуть вводитися цистеїнові заміни, за рахунок яких може утворюватися ненативний дисульфідний зв'язок між ланцюгами. Придатні положення для розташування вказаних цистеїнових замін описані у WO03020763. На фігурі 2 супутніх графічних матеріалів показані відповідно позаклітинні послідовності альфа- та бета-ланцюгів TCR дикого типу в розчинному форматі. SEQ ID NO: 4 ідентична нативній позаклітинній послідовності альфа-ланцюга під SEQ ID NO: 2, за винятком того, що цистеїн у положенні 48 константного домену був заміщений треоніном. Подібним чином, SEQ ID NO: 5 ідентична нативній позаклітинній послідовності бета-ланцюга під SEQ ID NO: 3, за винятком того, що цистеїн у положенні 57 константного домену був заміщений серином, цистеїн у положенні 75 константного домену був заміщений аланіном, та аспарагін у положенні 89 константного домену був заміщений аспарагіновою кислотою. Розчинний TCR дикого типу може застосовуватися для забезпечення еталону, з яким можна порівнювати профіль зв'язування підданих мутації TCR за даним винаходом.

Послідовності TCR, визначені в даному документі, описані із посиланням на номенклатуру IMGT, яка широко відома та доступна тим, хто працює в галузі TCR. Див., наприклад, [LeFranc

and LeFranc, (2001). "T cell Receptor Factsbook", Academic Press; Lefranc, (2011), Cold Spring Harb Protoc 2011(6): 595-603; Lefranc, (2001), Curr Protoc Immunol Appendix 1: Appendix 100; i Lefranc, (2003), Leukemia 17(1): 260-266]. Коротко, 1П TCR складаються з двох ланцюгів, зв'язаних дисульфідним зв'язком. Зазвичай вважається, що кожний ланцюг (альфа та бета) має два домени, а саме варіабельний та константний домен. Коротка з'єднувальна ділянка сполучає варіабельний та константний домени і зазвичай розглядається як частина варіабельної ділянки альфа-ланцюга. Крім того, бета-ланцюг зазвичай містить коротку ділянку різноманітності поруч зі з'єднувальною ділянкою, яку, як правило, також розглядають як частину варіабельної ділянки бета-ланцюга.

Варіабельний домен кожного ланцюга розташований на N-кінці та містить три ділянки, що визначають комплементарність (CDR), вбудовані в каркасну послідовність. CDR містять сайт розпізнавання для зв'язування пептиду-молекули МНС. Існують декілька генів, що кодують варіабельні ділянки альфа-ланцюга (Va), та декілька генів, що кодують варіабельні ділянки бета-ланцюга (Vp), які відрізняються їхніми каркасними послідовностями, послідовностями CDR1 і CDR2 та частково визначеною послідовністю CDR3. За номенклатурою IMGT гени Va і Vp називаються за допомогою префіксів TRAV і TRBV відповідно [Folch and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(1): 42-54; Scaviner and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(2): 83-96; LeFranc and LeFranc, (2001), "T cell Receptor Factsbook", Academic Press]. Подібним чином, існують декілька генів з'єднувальних ділянок або J, які називають TRAJ або TRBJ у випадку альфа- і бета-ланцюгів відповідно, та у випадку бета-ланцюга, ген ділянки різноманітності або D, який називають TRBD [Folch and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(2): 107-114; Scaviner and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(2): 97-106; LeFranc and LeFranc, (2001), "T cell Receptor Factsbook", Academic Press]. Величезна різноманітність ланцюгів Т-клітинних рецепторів зумовлена комбінаторними перегрупуваннями між різними генами V, J та D, які включають алельні варіанти та множинність J-сегментів [Arstila, et al., (1999), Science 286(5441): 958-961; Robins et al., (2009), Blood 114(19): 4099-4107.] Константні або C ділянки альфа- і бета-ланцюгів TCR називають TRAC і TRBC відповідно [Lefranc, (2001), Curr Protoc Immunol Appendix 1: Appendix 10].

Варіабельний домен альфа-ланцюга за першим або другим аспектом може мати мутацію щонайменше в одному з наступних положень із посиланням на нумерацію залишків 1-113 з SEQ ID NO: 2: M50, T51, F52, S53, E54, H94, S95, G96, S98. Мутації можуть бути вибрані з наступних амінокислот із посиланням на нумерацію залишків 1-113 3SEQIDNO: 2:

Таблиця 1

№	
M50	L
T51	D
F52	Y
S53	A
E54	I
H94	S, R
S95	A
G96	N, D, S,
S98	L

Додатково або як альтернатива варіабельний домен бета-ланцюга за першим або другим аспектом може мати мутацію щонайменше в одному з наступних положень із посиланням на нумерацію залишків 1-116 з SEQ ID NO: 3: M27; D28; H29, E30, N31, Y50, D51, V52, K53, M54, F95, L96, M97, T98. Мутації можуть бути вибрані з наступних амінокислот із посиланням на нумерацію залишків 1-116 з SEQ ID NO: 3:

Таблиця 2

№	
M27	A,
D28	P
H29	L
E30	S
N31	K

Таблиця 2

№	
Y50	R
D51	F
V52	A
K53	T
M54	G,
F95	S
L96	D
M97	Q
T98	N

Варіабельний домен альфа-ланцюга може мати 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або 9 з мутацій, показаних у таблиці 1, та/або варіабельний домен бета-ланцюга може мати 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 з мутацій, показаних у таблиці 2.

5 Варіабельний домен альфа-ланцюга може мати щонайменше одну з наступних груп мутацій:

група 1: M50L, T51D, F52Y, S53A, E54I;

група 2: H94S, S95A, G96N, S98L;

група 3: H94R S95A, G96D, S98L;

10 група 4: M50L, T51D, F52Y, S53A, E54I, H94R S95A, G96D, S98L;

група 5: M50L, H94S, S95A, G96S, S98L;

група 6: M50L, H94S, S95A, G96Q, S98L;

та/або варіабельний домен бета-ланцюга може мати щонайменше одну з наступних груп мутацій:

15 група 1: M27A, D28P, H29L, E30S, N31K F95S, L96D, M97Q, T98N;

група 2: Y50R, D51F, V52A, K53T, M54G, F95S, L96D, M97Q, T98N;

група 3: F95S, L96D, M97Q, T98N;

група 4: M27L, ;Y50R, D51F, V52A, K53T, M54G, F95S, L96D, M97Q, T98N

група 5: M27A, D28P, H29L, E30S, N31K, M54L, F95S, L96D, M97Q, T98N.

20 Наприклад, варіабельний домен альфа-ланцюга може мати мутації групи 4, а варіабельний домен бета-ланцюга може мати мутації групи 1; варіабельний домен альфа-ланцюга може мати мутації групи 4, а варіабельний домен бета-ланцюга може мати мутації групи 5; варіабельний домен альфа-ланцюга може мати мутації групи 2, а варіабельний домен бета-ланцюга може мати мутації групи 2; варіабельний домен альфа-ланцюга може мати мутації групи 6, а
25 варіабельний домен бета-ланцюга може мати мутації групи 4; варіабельний домен альфа-ланцюга може мати мутації групи 5, а варіабельний домен бета-ланцюга може мати мутації групи 4.

Додатково або як альтернатива мутації можуть бути здійснені поза межами CDR; при цьому такі мутації можуть поліпшувати зв'язування, та/або специфічність, та/або стабільність, та/або вихід очищеної розчинної форми TCR. Наприклад, TCR за даним винаходом додатково або як
30 альтернатива може містити варіабельний домен альфа-ланцюга, який має наступні мутації із посиленням на нумерацію залишків 1-113 з SEQ ID NO: 2:

Таблиця 3

№	
K1	A
C19	V

35 У варіабельному домені альфа-ланцюга послідовність амінокислотних залишків 27-32, 50-56 і 91-103 може бути вибрана з наступних:

Таблиця 4

Залишки 27-32 (CDR1)	Залишки 50-56 (CDR2)	Залишки 91-103 (CDR3)
VSPFSN	MTFSENT	VVNHSAGSYIPTF
VSPFSN	MTFSENT	VVNSANGLYIPTF
VSPFSN	MTFSENT	VVNRADGLYIPTF
VSPFSN	LDYAIN	VVNHSAGSYIPTF
VSPFSN	LDYAIN	VVNRADGLYIPTF
VSPFSN	LTFSENT	VVNSASGLYIPTF
VSPFSN	LTFSENT	VVNSAQGLYIPTF

Варіабельний домен альфа-ланцюга TCR може містити амінокислотну послідовність, яка характеризується щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю з будь-якою з SEQ ID NO: 16-24 або 46-64.

У варіабельному домені бета-ланцюга послідовність амінокислотних залишків 27-31, 49-54 і 92-107 може бути вибрана з наступних:

Таблиця 5

Залишки 27-31 (CDR1)	Залишки 49-54 (CDR2)	Залишки 92-107 (CDR3)
MDHEN	SYDVKM	ASSFLMTSGDPYEQYF
MDHEN	SRFATG	ASSSDQNSGDPYEQYF
MDHEN	SYDVKM	ASSSDQNSGDPYEQYF
LDHEN	SRFATG	ASSSDQNSGDPYEQYF
APLSK	SYDVKM	ASSSDQNSGDPYEQYF
APLSK	SYDVKL	ASSSDQNSGDPYEQYF

Варіабельний домен бета-ланцюга TCR може містити амінокислотну послідовність, яка характеризується щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю з будь-якою з SEQ ID NO: 25-29 або 65-81.

Послідовність амінокислотних залишків 27-32, 50-56 і 91-103 варіабельного домену альфа-ланцюга та послідовність амінокислотних залишків 27-31, 49-54 і 92-107 варіабельного домену бета-ланцюга можуть бути вибрані з наступних

Таблиця 6

Альфа-ланцюг			Бета-ланцюг		
27-32	50-56	91-103	27-31	49-54	92-107
VSPFSN	LDYAIN	WNRADGLYIPTF	APLSK	SYDVKM	ASSSDQNSGDPYEQYF
VSPFSN	LDYAIN	WNRADGLYIPTF	APLSK	SYDVKL	ASSSDQNSGDPYEQYF
VSPFSN	MTFSENT	WNSANGLYIPTF	MDHEN	SRFATG	ASSSDQNSGDPYEQYF
VSPFSN	LTFSENT	WNSAQGLYIPTF	LDHEN	SRFATG	ASSSDQNSGDPYEQYF
VSPFSN	LTFSENT	WNSASGLYIPTF	LDHEN	SRFATG	ASSSDQNSGDPYEQYF

Варіабельний домен альфа-ланцюга може містити амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 16-24 або 46-64, та/або варіабельний домен бета-ланцюга може містити амінокислотну послідовність будь-якої з SEQ ID NO: 25-29 або 65-81.

Наприклад, варіабельний домен альфа-ланцюга може містити амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 22, а варіабельний домен бета-ланцюга може містити амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 26; варіабельний домен альфа-ланцюга може містити амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 22, а варіабельний домен бета-ланцюга може містити амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 27; варіабельний домен альфа-ланцюга може містити амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 20, а варіабельний домен бета-ланцюга може містити амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 28; варіабельний домен альфа-ланцюга може містити амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 24, а варіабельний домен бета-ланцюга може містити амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 29; варіабельний домен альфа-ланцюга може містити амінокислотну послідовність під SEQ ID NO:

23, а варіабельний домен бета-ланцюга може містити амінокислотну послідовність під SEQ ID NO:29.

5 TCR за даним винаходом може являти собою альфа-бета гетеродимер з послідовністю константного домену альфа-ланцюга TRAC та послідовністю константного домену бета-ланцюга TRBC1 або TRBC2.

TCR за даним винаходом може мати одноланцюговий формат, включаючи без обмеження V α -L-V β , V β -L-V α , V α -C α -L-V β , V α -L-V-C β , де V α та V β являють собою варіабельні ділянки α - та β -ланцюгів TCR відповідно, C β та C α являють собою константні ділянки α - та β -ланцюгів TCR відповідно, а L являє собою лінкерну послідовність.

10 TCR за даним винаходом може бути асоційованим з детективною міткою, терапевтичним засобом або фрагментом, що модифікує РК.

15 TCR за даним винаходом може містити антитіло до CD3, ковалентно з'єднане з С-або N-кінцем альфа- або бета-ланцюга TCR. Такий TCR може містити варіабельний домен альфа-ланцюга, вибраний з будь-якої з SEQ ID NO: 16-24 або 46-64, та варіабельний домен бета-ланцюга, вибраний з будь-якої з SEQ ID NO: 25-29 або 65-81, злитий з антитілом до CD3. Бета-ланцюг можуть бути з'єднаний з послідовністю антитіла до CD3 за допомогою лінкерної послідовності; при цьому лінкерна послідовність може бути вибрана з групи, що складається з GGGGS (SEQ ID NO: 30), GGGSG (SEQ ID NO: 31), GSGGG (SEQ ID NO: 32), GSGGG (SEQ ID NO: 33), GSGGGP (SEQ ID NO: 34), GGEPS (SEQ ID NO: 35), GGEGGGP (SEQ ID NO: 36) та GGEGGGSEGGGS (SEQ ID NO: 37).

20 Переважні варіанти здійснення зливої молекули з TCR та антитіла до CD3 містять амінокислотну послідовність альфа-ланцюга, вибрану з послідовностей під SEQ ID NO: 38-41, або послідовність, яка характеризується щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 38-41, та амінокислотну послідовність бета-ланцюга, вибрану з послідовностей під SEQ ID NO: 42-45, або послідовність, яка характеризується щонайменше 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю з амінокислотною послідовністю, викладеною під SEQ ID NO: 42-45.

30 TCR за даним винаходом можуть бути включені у бібліотеку частинок. Для таких цілей TCR може бути представлений, наприклад, на поверхні бактеріофага, дріжджової клітини, клітини ссавців або рибосоми. TCR може бути виділеним, позаклітинним та/або розчинним, тобто він може не являти собою TCR, який зустрічається у своєму природному стані в межах Т-клітини організму людини.

35 TCR за даним винаходом можуть бути такими, що не зустрічаються у природі, та/або очищеними, та/або сконструйованими. TCR за даним винаходом можуть мати більше ніж одну мутацію, що присутня у варіабельному домені альфа-ланцюга та/або варіабельному домені бета-ланцюга, порівняно з нативним TCR для MAGE A4.

40 TCR за даним винаходом може містити каркасну ділянку 2 (FR2) альфа-ланцюга та каркасну ділянку 3 (FR3) альфа-ланцюга, де ділянки FR2 і FR3 містять SEQ ID NO: 9 і 10 відповідно та/або мають одну або декілька, наприклад, одну, дві або три, консервативних заміни та/або не більше трьох допустимих заміні.

45 TCR за даним винаходом може містити ділянку FR2 бета-ланцюга та ділянку FR3 бета-ланцюга, де ділянки FR2 і FR3 містять SEQ ID NO:14 і 15 відповідно та/або містять одну або декілька, наприклад одну, дві або три, консервативних заміні та/або не більше трьох допустимих заміні.

TCR за даним винаходом може містити амінокислоти 1-113 з SEQ ID NO: 2 та/або амінокислоти 1-116 з SEQ ID NO: 3, кожна з яких може містити одну або декілька консервативних заміні, та/або не більше трьох допустимих мутацій, та/або одну або декілька з мутацій, викладених в таблицях 1, 2 і 3.

50 "Сконструйований TCR" та "мутантний TCR" застосовують у даному документі як синоніми для позначення TCR, який має одну або декілька введених мутацій порівняно з нативним TCR для MAGE A4, зокрема, у своєму варіабельному домені альфа-ланцюга та/або варіабельному домені бета-ланцюга. Мутація(ii), як правило, поліпшує афінність зв'язування TCR з комплексом GVDGRENTV (SEQ ID NO: 1)-HLA-A*02, але додатково або як альтернатива може забезпечувати інші переваги, такі як поліпшена стабільність у виділеній формі та поліпшена специфічність. Мутації в одному або кількох положеннях додатково або як альтернатива можуть впливати на взаємодію суміжного положення з когнатним комплексом pMHC, наприклад, шляхом створення більш сприятливого кута для взаємодії. Для поліпшення зв'язування TCR з комплексом GVDGRENTV (SEQ ID NO: 1)-HLA-A*02 мутації переважно створюють в межах однієї або кількох ділянок CDR.

У деяких варіантах здійснення в CDR альфа-ланцюга міститься 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 або 9 мутацій, наприклад, 4, 5 або 9 мутацій, та/або в CDR бета-ланцюга міститься 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 мутацій, наприклад, 4, 9 або 10 мутацій.

У деяких варіантах здійснення варіабельний домен а-ланцюга TCR за даним винаходом може містити амінокислотну послідовність, яка характеризується щонайменше 90 %, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичністю з послідовністю амінокислотних залишків 1-113 з SEQ ID NO: 2, за умови, що варіабельний домен а-ланцюга має щонайменше одну з мутацій, наведених вище, наприклад, в таблиці 1 або таблиці 3. У деяких варіантах здійснення варіабельний домен [3-ланцюга TCR за даним винаходом може містити амінокислотну послідовність, яка характеризується щонайменше 90 %, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 % або щонайменше 99 % ідентичністю з послідовністю амінокислотних залишків 1-116 з SEQ ID NO: 3, за умови, що варіабельний домен (3-ланцюга має щонайменше одну з мутацій, наведених вище, наприклад в таблиці 2.

Мутації відносно первісного TCR (або дикого типу) можуть включати такі, що здатні підвищувати афінність зв'язування (K_D та/або напівперіод зв'язування) TCR з GVDGRENTV. Мутації можуть включати такі, що здатні знижувати кількість неспецифічного зв'язування, тобто знижувати зв'язування з антигенами окрім зв'язування з GVDGRENTV. Мутації можуть включати такі, що підвищують ефективність фолдингу та/або виготовлення. Деякі мутації можуть сприяти кожній з цих характеристик, інші можуть сприяти, наприклад, афінності, але не специфічності, або специфічності, але не афінності тощо.

У межах обсягу даного винаходу перебувають фенотипово мовчазні варіанти будь-якого TCR за даним винаходом, розкритого в даному документі. Як застосовується у даному документі, вважається, що термін "фенотипово мовчазні варіанти" відноситься до TCR, який включає одну або декілька додаткових змін амінокислот, включаючи заміни, вставки та делеції, окрім викладених вище, при цьому такий TCR має фенотип, подібний до фенотипу відповідного TCR без вказаної зміни(змін). Для цілей даної заявки фенотип TCR передбачає афінність зв'язування з антигеном (K_D та/або напівперіод зв'язування) та антигенну специфічність. Фенотипово мовчазний варіант може характеризуватися K_D та/або напівперіодом зв'язування з комплексом GVDGRENTV (SEQ ID NO: 1)-HLA-A*02 в межах 50 %, або більш переважно в межах 20 % від вимірюваних K_D та/або напівперіоду зв'язування відповідного TCR без вказаної зміни(змін), у разі вимірювання за ідентичних умов (наприклад, 25 °C та/або однаковому чипі SPR). Придатні умові додатково наведені в прикладі 3. Антигенна специфічність додатково визначена нижче. Як відомо фахівцям у даній галузі, можна створювати TCR, які включають зміни в своїх варіабельних доменах порівняно з докладно описаними вище, без зміни афінності взаємодії з комплексом GVDGRENTV (SEQ ID NO: 1)-HLA-A*02. Зокрема, такі мовчазні мутації можуть бути введені в межах частин послідовності, які, як відомо, безпосередньо не беруть участь у зв'язуванні з антигеном (наприклад, CDR або частин CDR, які не контактують з пептидним антигеном). Такі тривіальні варіанти включені в обсяг даного винаходу.

Фенотипово мовчазні варіанти можуть містити одну або декілька консервативних заміни та/або одну або декілька допустимих заміни. Допустимі та консервативні заміни можуть приводити до зміни K_D та/або напівперіоду зв'язування комплексу GVDGRENTV (SEQ ID NO: 1)-HLA-A*02 у межах 50 %, або більш переважно у межах 20 %, ще більш переважно у межах 10 % від вимірюваних K_D та/або напівперіоду зв'язування відповідного TCR без вказаної консервативної та/або допустимої заміни(замін), у разі вимірювання за ідентичних умов (наприклад, 25 °C та/або однаковому чипі SPR), за умови, що зміна у K_D не веде до афінності, меншої (тобто більш слабкої) ніж 200 мкМ. Допустимими замінами вважаються такі заміни, які не підпадають під визначення консервативних заміни, як представлено нижче, але, незважаючи на це є фенотипово мовчазними.

TCR за даним винаходом можуть включати одну або декілька консервативних заміни, які мають подібну амінокислотну послідовність та/або які зберігають таку саму функцію (тобто є фенотипово мовчазними, як визначено вище). Фахівець усвідомлює, що різні амінокислоти мають подібні властивості й, таким чином, є 'консервативними'. Одна або декілька таких амінокислот у білку, поліпептиді або пептиді часто можуть бути заміщені однією або кількома іншими такими амінокислотами без втрати необхідної активності цього білка, поліпептиду або пептиду.

Отже, амінокислоти гліцин, аланін, валін, лейцин та ізолейцин часто можуть заміщувати одна одну (амінокислоти з аліфатичними бічними ланцюгами). Серед цих можливих заміни

переважно, щоб гліцин і аланін застосовувалися для заміщення одна одної (оскільки вони мають відносно короткі бічні ланцюги), і щоб валін, лейцин та ізолейцин застосовувалися для заміщення одна одної (оскільки вони мають більш великі аліфатичні бічні ланцюги, які є гідрофобними). Інші амінокислоти, які часто можуть заміщувати одна одну, включають

5 фенілаланін, тирозин і триптофан (амінокислоти з ароматичними бічними ланцюгами); лізин, аргінін і гістидин (амінокислоти з основними бічними ланцюгами); аспартат і глутамат (амінокислоти з кислотними бічними ланцюгами); аспарагін і глутамін (амінокислоти з амідними бічними ланцюгами) та цистеїн і метіонін (амінокислоти з сірковмісними бічними ланцюгами). Слід враховувати, що амінокислотні заміни в межах обсягу даного винаходу можна здійснювати

10 із застосуванням амінокислот, що зустрічаються у природі або не зустрічаються у природі. Наприклад, у даному документі передбачається, що метильна група на аланіні може бути заміщена етильною групою, та/або що незначні зміни можна здійснювати у пептидному остові. Незалежно від того, які амінокислоти використовуються, природні або синтетичні, переважною є присутність тільки L-амінокислот.

15 Заміни такої природи часто називають "консервативними" або "напівконсервативними" амінокислотними замінами. Отже, даний винахід поширюється на застосування TCR, що містить амінокислотну послідовність, описану вище, але з однією або кількома консервативними замінами та/або з однією або декількома допустимими замінами у послідовності, внаслідок чого амінокислотна послідовність TCR характеризується щонайменше 90 % ідентичністю,

20 наприклад, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичністю з TCR, що містить амінокислоти 1-113 з SEQ ID NO: 2, 16-24 або 46-64 та/або амінокислоти 1-116 з SEQ IDNO: 3, 25-29 або 65-81.

Як відомо з рівня техніки "ідентичність" означає взаємозв'язок між двома або більше поліпептидними послідовностями або двома або більше полінуклеотидними послідовностями,

25 що визначений шляхом порівняння послідовностей. У рівні техніки ідентичність також означає, залежно від випадку, ступінь спорідненості послідовності у поліпептидних або полінуклеотидних послідовностей, що визначений за збігом між нитками таких послідовностей. Хоча існує низка способів для вимірювання ідентичності між двома поліпептидними або двома полінуклеотидними послідовностями, способи, які зазвичай використовуються для визначення

30 ідентичності, кодифіковані в комп'ютерних програмах. Переважні комп'ютерні програми для виявлення ідентичності між двома послідовностями включають без обмеження пакет програм GCG [Devereux, et al., Nucleic Acids Research, 12, 387 (1984), BLASTP, BLASTN та FASTA (Atschul et al., J. Molec. Biol. 215,403(1990))].

Для порівняння амінокислотних послідовностей можна застосовувати таку програму, як

35 програма CLUSTAL. Ця програма порівнює амінокислотні послідовності і виявляє оптимальне вирівнювання, у випадку необхідності вставляючи пробіли в одній з послідовностей. Для здійснення оптимального вирівнювання можливим є розрахування ідентичності або подібності (ідентичність, а також збереження типу амінокислот) амінокислот. Програма, така як BLASTx, буде вирівнювати найдовший відрізок подібних послідовностей та призначати значення

40 відповідності. Таким чином, можна отримати порівняння, за якого виявлено кілька ділянок подібності, кожна з яких має окремий бал. Обидва типи аналізу ідентичності передбачені у даному винаході.

Відсоток ідентичності двох амінокислотних послідовностей або двох послідовностей нуклеїнової кислоти визначають за допомогою вирівнювання послідовностей, маючи на меті

45 оптимальне порівняння (наприклад, у першу послідовність можуть вводитися гепи для найкращого вирівнювання з послідовністю), та порівняння амінокислотних залишків або нуклеотидів у відповідних положеннях. "Найкращим вирівнюванням" є вирівнювання двох послідовностей, що веде до найвищого відсотку ідентичності. Відсоток ідентичності визначають за числом ідентичних амінокислотних залишків або нуклеотидів у послідовностях, які

50 порівнюють (тобто % ідентичності = число ідентичних положень/загальне число положень x 100).

Визначення відсотка ідентичності між двома послідовностями може виконуватися із застосуванням математичного алгоритму, відомого фахівцям в даній галузі. Прикладом математичного алгоритму для порівняння двох послідовностей є алгоритм за [Karlin and Altschul

55 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, модифікований за Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877]. Програми NBLAST і XBLAST з Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410, включали такий алгоритм. Нуклеотидні пошуки на основі BLAST можна виконувати за допомогою програми NBLAST, бал = 100, довжина слова = 12, з одержанням нуклеотидних послідовностей, гомологічних молекулам нуклеїнової кислоти. Білкові пошуки на

60 основі BLAST можна виконувати за допомогою програми XBLAST, бал = 50, довжина слова = 3,

з одержанням амінокислотних послідовностей, гомологічних білковим молекулам для застосування у даному винаході. Для отримання вирівнювань з гепами, маючи на меті порівняння, може застосовуватися BLAST з гепами, як описано в [Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402]. Як альтернатива, можна застосовувати PSI-Blast для здійснення ітеративного пошуку, який виявляє віддалені взаємозв'язки між молекулами (там же). Під час застосування програм BLAST, BLAST з гепами та PSI-Blast можна використовувати параметри за замовчуванням відповідних програм (наприклад, XBLAST і NBLAST). Див. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov]. Іншим прикладом математичного алгоритму, що застосовують для порівняння послідовностей є алгоритм [Myers та Miller, CABIOS (1989)]. Програма ALIGN (версія 2.0), яка є частиною пакету програм для вирівнювання послідовностей CGC, включає такий алгоритм. Інші алгоритми для аналізу послідовності, відомі з рівня техніки, включають ADVANCE і ADAM, описані в [Torellis and Robotti (1994) *Comput. Appl. Biosci.*, 10:3-5; та FASTA], описаний у [Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444-8]. В межах FASTA опцією керування є ktp, що встановлює чутливість та швидкість пошуку.

Мутації, включаючи консервативні та допустимі заміни, вставки та делеції, можуть вводиться у надані послідовності із застосуванням будь-якого приданого способу, включаючи без обмеження способи на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), процедур клонування на основі ферменту рестрикції або безлігазного клонування (LIC). Ці способи докладно описані у багатьох текстах зі стандартної молекулярної біології. Додаткову інформацію щодо полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та клонування на основі ферменту рестрикції див. у [Sambrook & Russell, (2001) *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (3rd Ed.) CSHL Press]. Додаткову інформацію щодо процедури безлігазного клонування (LIC) можна знайти в [Rashtchian, (1995) *Curr Opin Biotechnol* 6(1): 30-6]. Послідовності TCR за даним винаходом можна отримувати за допомогою твердофазного синтезу або будь-якого іншого придатного способу, відомого з рівня техніки.

TCR за даним винаходом мають властивість зв'язування комплексу GVDGREHTV (SEQ ID NO: 1)-HLA-A*02. Як було з'ясовано, TCR за даним винаходом надійно розпізнають даний епітоп у порівнянні з іншими, невідповідними епітопами і, таким чином, є особливо придатними у ролі векторів націлювання для доставки терапевтичних засобів або детектовних міток у клітини та тканини, в яких представлені ці епітопи. Специфічність у контексті TCR за даним винаходом стосується їхньої здатності розпізнавати цільові клітини з HLA-A*02, які є антигенпозитивними, при цьому з мінімальною здатністю розпізнавати цільові клітини з HLA-A*02, які є антигеннегативними.

Специфічність може бути виміряна *in vitro*, наприклад, у клітинних аналізах, таких як аналізи, описані в прикладі 6. Під час тестування специфічності TCR можуть перебувати в розчинній формі, та/або можуть бути злитими з імунним ефектором, та/або можуть бути експресовані на поверхні клітин, таких як Т-клітини. Розпізнавання може бути визначено шляхом вимірювання рівня активації Т-клітин у присутності TCR за даним винаходом та цільових клітин. Мінімальне розпізнавання антиген негативних цільових клітин визначене як рівень активації Т-клітин, що становить менше ніж 20 %, переважно менше ніж 10 %, переважно менше ніж 5 % та більш переважно менше ніж 1 % рівня, який одержують у присутності антигенпозитивних цільових клітин у разі вимірювання за однакових умов та за терапевтично релевантною концентрації TCR. Для розчинних TCR за даним винаходом терапевтично релевантна концентрація може визначатися як концентрація TCR, що становить 10^{-9} М або менше, та/або концентрація, що не більше ніж у 100, переважно не більше ніж у 1000 разів перевищує відповідне значення EC50. Антигенпозитивні клітини можуть бути отримані шляхом інкубації з пептидами із застосуванням придатної концентрації пептидів для отримання рівня антигенної презентації, аналогічного такому в ракових клітин (наприклад, 10^{-9} М пептиду, як [описано в Bossi et al., (2013) *Oncotmmunol.* 1;2 (11):e26840]), або вони можуть природним чином презентувати вказаний пептид. Переважно, як антигенпозитивні, так і антигеннегативні клітини є клітинами людини. Переважно, антигенпозитивні клітини є раковими клітинами людини. Антигеннегативні клітини переважно включають клітини, що отримані зі здорових тканин людини.

Додатково або як альтернатива специфічність може стосуватися здатності TCR зв'язуватися з комплексом GVDGREHTV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02, а не з панеллю комплексів альтернативний пептид-HLA. Наприклад, це можна визначати за методом Біасоге з прикладу 3. Вказана панель може містити щонайменше 5 та переважно щонайменше 10 комплексів альтернативний пептид-HLA-A*02. Альтернативні пептиди можуть мати низький рівень ідентичності послідовності з SEQ ID NO: 1 та можуть бути присутніми в природних умовах. Альтернативні пептиди можуть бути отримані з білків, що експресуються в здорових тканинах людини. Зв'язування з комплексом GVDGREHTV-HLA-A*02 може щонайменше у 2 рази

перевищувати зв'язування з іншими презентованими в природних умовах комплексами пептид-HLA, більш переважно перевищувати щонайменше в 10 разів, або щонайменше в 50 разів, або щонайменше в 100 разів, ще більш переважно перевищувати щонайменше в 400 разів.

Альтернативним або додатковим підходом для визначення специфічності TCR може бути ідентифікація мотиву розпізнавання пептиду в TCR із застосуванням послідовного мутагенезу, наприклад, аланінового сканування. Залишки, що утворюють частину мотиву зв'язування, є залишками, за якими заміна неможлива. Неприпустимі заміни можуть бути визначені як такі положення пептиду, за яких афінність зв'язування TCR знижується щонайменше на 50 % або переважно щонайменше на 80 % порівняно з афінністю зв'язування з не підданим мутації пептидом. Такий підхід додатково описаний у [Cameron et al, (2013), *Sci Transl Med.* 2013 Aug 7; 5 (197): 197ra103, та у WO2014096803]. У такому випадку специфічність TCR може визначатися шляхом ідентифікації пептидів, що містять альтернативний мотив, зокрема, пептидів, що містять альтернативний мотив, в людському протеомі, та тестування цих пептидів щодо зв'язування з TCR. Зв'язування TCR з одним або декількома альтернативними пептидами може вказувати на відсутність специфічності. У такому випадку може бути необхідним додаткове тестування специфічності TCR за допомогою клітинних аналізів.

Як відомо фахівцям у даній галузі, пептиди, отримані з представників родини MAGE, можуть мати високий рівень ідентичності послідовності з пептидами, отриманими з інших представників родини MAGE. Наприклад, існують пептиди, отримані з MAGE-A8 і MAGE-B2, що відрізняються лише двома залишками з SEQ ID NO 1 (GVYDGREHTV). Вказані пептиди та клітини, що експресують вказаних представників родини MAGE, можуть бути виключені з визначення специфічності, наведеного вище, зокрема, якщо відомо, що вказані представники родини MAGE є раковими антигенами, такими як MAGE-A8 і MAGE-B2. Отже, TCR за даним винаходом можуть розпізнавати пептиди з високим відсотком ідентичності послідовності, які отримані з інших представників родини MAGE, включаючи MAGE-A8 і MAGE-B2, та представлені у контексті HLA A*02. Розпізнавання вказаних пептидів за участі TCR за даним винаходом може відбуватися на подібному або нижчому рівні, ніж розпізнавання GVDYDREHTV (SEQ ID NO: 1)-HLA-A*02.

Деякі TCR за даним винаходом можуть мати ідеальний профіль безпеки для застосування як терапевтичні реагенти. У такому випадку TCR можуть перебувати в розчинній формі та переважно можуть бути злитими з імунним ефектором. Ідеальний профіль безпеки означає, що крім демонстрування задовільної специфічності TCR за даним винаходом можуть пройти подальші доклінічні випробовування безпеки. Приклади таких тестів включають аналізи цільної крові, щоб підтвердити мінімальне вивільнення цитокінів у присутності цільної крові та, таким чином, низький рівень ризику можливого виникнення синдрому вивільнення цитокінів *in vivo*, а також тести на алореактивність, щоб підтвердити низьку ймовірність розпізнавання альтернативних типів HLA.

Деякі розчинні TCR за даним винаходом можуть бути придатними для очищення з високим виходом. Високий вихід означає вихід більше ніж 1 %, або більш переважно більше ніж 10 %, або більше.

TCR за даним винаходом можуть характеризуватися K_D щодо комплексу GVDYDREHTV-HLA-A*02, що перевищує (тобто є сильнішою за) 200 мкМ, наприклад, від 1 пМ до 200 мкМ. Деякі TCR за даним винаходом можуть мати K_D щодо комплексу, що становить від приблизно 1 пМ до приблизно 400 нМ, від приблизно 1 пМ до приблизно 200 пМ, від приблизно 1 пМ до приблизно 100 пМ. Деякі TCR за даним винаходом можуть характеризуватися K_D щодо комплексу, що становить приблизно 20-80 пМ. TCR за даним винаходом можуть мати напівперіод зв'язування ($T_{1/2}$) з комплексом в діапазоні від приблизно 1 сек. до приблизно 60 год., від 1 хв. до приблизно 60 год., від приблизно 20 хв. до приблизно 50 год. або від приблизно 2 год. до приблизно 35 год. Деякі TCR за даним винаходом може характеризуватися $T_{1/2}$ щодо комплексу, що становить від приблизно 8 год. до 35 год. TCR, які передбачені для застосування як розчинні терапевтичні препарати та/або діагностичні препарати, у разі приєднання до детекторної мітки або терапевтичного засобу, переважно характеризуються K_D щодо комплексу, що становить від приблизно 1 пМ до приблизно 100 пМ або від приблизно 20 пМ до приблизно 80 пМ, та/або напівперіодом зв'язування з комплексом, що становить від приблизно 2 год. до 60 год. або від приблизно 8 год. до приблизно 35 год. Деякі TCR за даним винаходом можуть бути придатні для видів застосування в адоптивній терапії; такі TCR можуть характеризуватися K_D щодо комплексу, що становить від приблизно 50 нМ до приблизно 200 мкМ або від приблизно 100 нМ до приблизно 1 мкМ, та/або напівперіодом зв'язування з комплексом, що становить від приблизно 3 сек. до приблизно 12 хв.

Деякі переважні TCR здатні викликати високоефективну Т-клітинну відповідь *in vitro* проти антигенпозитивних клітин, зокрема, тих клітин, на яких типовий для ракових клітин антиген

представлений на низькому рівні (тобто приблизно 50 антигенів на клітину [Bossi et al., (2013) Oncoimmunol. 1;2 (11):e26840; Purbhoo et al., (2006). J Immunol 176(12): 7308-7316.]). Такі TCR можуть перебувати в розчинній формі та бути з'єднані з імунним ефектором, таким як антитіло до CD3. Т-клітинна відповідь, яка є вимірюваною, може являти собою вивільнення маркерів активації Т-клітин, таких як інтерферон γ або гранзим В, або загибель клітин, або інший показник активації Т-клітин. Переважно, високоефективною відповіддю є відповідь зі значенням EC_{50} у пМ діапазоні, наприклад, 100 пМ або менше.

Деякі переважні TCR за даним винаходом характеризуються афінністю зв'язування та/або напівперіодом зв'язування з комплексом GVDGRENTV-HLA-A*02, що суттєво перевищують такі показники в нативного TCR. Збільшення афінності зв'язування нативного TCR часто зменшує специфічність TCR щодо його ліганду пептид/МНС, і це продемонстровано в [Zhao et al., (2007) J.Immunol, 179:9, 5845-5854]. Проте такі TCR за даним винаходом залишаються специфічними щодо комплексу GVDGRENTV-HLA-A*02, незважаючи на суттєво більш високу афінність зв'язування, ніж у нативного TCR.

Афінність зв'язування (обернено пропорційна константі рівноваги K_D) та напівперіод зв'язування (виражений як VA) можуть бути визначені із застосуванням поверхневого плазмонного резонансу (BIAcore) та/або методу Octet з прикладу 3 у даному документі. Буде зрозуміло, що внаслідок подвоєння афінності TCR вдвічі зменшується K_D . ТУг розраховується як $1/p_2$, поділений на швидкість дисоціації (k_{off}). Отже, внаслідок подвоєння VA вдвічі зменшується k_{off} . Значення K_D і k_{off} для TCR звичайно вимірюють для розчинних форм TCR, тобто таких форм, які є усіченими для видалення залишків цитоплазматичного та трансмембранного доменів. Переважно афінність зв'язування або напівперіод зв'язування даного TCR вимірюють кілька разів, наприклад, 3 або більше разів, із застосуванням однакового протоколу аналізу та беруть середнє результатів.

У випадку застосування як націлювальний засіб для доставки терапевтичних засобів у антигенпрезентувальну клітину TCR може перебувати в розчинній формі (тобто не мати трансмембранного або цитоплазматичного доменів). Для забезпечення стабільності TCR за даним винаходом і переважно розчинні ар-гетеродимерні TCR можуть мати дисульфідний зв'язок, введений між залишками відповідних константних доменів, як описано, наприклад, у WO 03/020763. Один або обидва позаклітинні константні домени, присутні в α (3-гетеродимері за даним винаходом, можуть бути усіченими з С-кінця або С-кінців, наприклад, не більше ніж на 15, або не більше ніж на 10, або не більше ніж на 8, або менше амінокислот. С-кінець позаклітинного константного домену альфа-ланцюга може бути усіченим на 8 амінокислот. Один або обидва позаклітинні константні домени можуть містити одну або декілька мутацій. Внаслідок природного поліморфізму позаклітинний константний домен альфа-ланцюга в положенні 4 може мати залишок аспарагіну (N) або лізину (K). Для застосування в адоптивній терапії α (3-гетеродимерний TCR, наприклад, можна піддавати трансфекції як повнорозмірні ланцюги, що мають як цитоплазматичний, так і трансмембранний домени. TCR для застосування в адоптивній терапії можуть містити дисульфідний зв'язок, що відповідає зв'язку, який зустрічається в природі між відповідними константними доменами альфа- та бета-ланцюгів, при цьому додатково або як альтернатива може бути присутнім ненативний дисульфідний зв'язок.

TCR за даним винаходом можуть являти собою $\alpha\beta$ -гетеродимери. TCR за даним винаходом можуть мати одноланцюговий формат. Одноланцюгові формати включають без обмеження поліпептиди $\alpha\beta$ -TCR наступних типів $V\alpha$ -L- $V\beta$, $V\beta$ -L- $V\alpha$, $V\alpha$ -C α -L- $V\beta$, $V\alpha$ -L- $V\beta$ -C β або $V\alpha$ -C α -L- $V\beta$ -C β , де $V\alpha$ і $V\beta$ являють собою варіабельні ділянки α - і β -ланцюгів TCR відповідно, C α і C β являють собою константні ділянки α - і β -ланцюгів TCR відповідно, а L являє собою лінкерну послідовність [Weidanz et al., (1998) J Immunol Methods. Dec 1;221 (1-2):59-76; Epel et al., (2002), Cancer Immunol Immunother. Nov;51(10):565-73; WO 2004/033685; WO9918129]. Один або обидва константні домени можуть бути повнорозмірними, або вони можуть бути усіченими, як описано вище, та/або можуть містити мутації. Внаслідок природного поліморфізму позаклітинний константний домен альфа-ланцюга в положенні 4 може мати залишок аспарагіну (N) або лізину (K). У деяких варіантах здійснення одноланцюгові TCR за даним винаходом можуть мати дисульфідний зв'язок, введений між залишками відповідних константних доменів, як [описано в WO 2004/033685]. Одноланцюгові TCR додатково описані в [WO2004/033685; WO98/39482; WO01/62908; Weidanz et al. (1998) J Immunol Methods 221(1-2): 59-76; Hoo et al. (1992) Proc Natl Acad Sci U S A 89(10): 4759-4763; Schodin (1996) Mol Immunol 33(9): 819-829].

Фахівцям в даній галузі буде зрозуміло, що можна здійснювати усічення наведених послідовностей на їхньому С-кінці та/або N-кінці на 1, 2, 3, 4, 5 або більше залишків, не

впливаючи суттєво на характеристики зв'язування TCR. Усі такі тривіальні варіанти охоплені даним винаходом.

Альфа-бета-гетеродимерні TCR за даним винаходом звичайно містять послідовність константного домену альфа-ланцюга TRAC та/або послідовність константного домену бета-ланцюга TRBC1 або TRBC2. Послідовності константних доменів альфа- і бета-ланцюга можуть бути модифіковані шляхом усічення або заміни з видаленням нативного дисульфідного зв'язку між Cys4 екзона 2 в TRAC та Cys2 екзона 2 в TRBC1 або TRBC2. Послідовність(ості) константних доменів альфа- та/або бета-ланцюга може бути модифікованою шляхом заміни на цистеїнові залишки Thr48 з TRAC та Ser57 з TRBC1 або TRBC2, при цьому вказані цистеїни утворюють дисульфідний зв'язок між константними доменами альфа- та бета-ланцюга TCR. TRBC1 або TRBC2 можуть додатково включати мутацію цистеїну на аланін у положенні 75 константного домену та мутацію аспарагіну на аспарагінову кислоту в положенні 89 константного домену.

Додатково або як альтернатива, константний домен може містити додаткові мутації, заміни або делеції відносно нативних послідовностей TRAC та/або TRBC1/2. Термін TRAC та TRBC1/2 охоплює натуральні поліморфні варіанти, наприклад, K замість N у положенні 4 в TRAC [Bragado et al Int Immunol. 1994 Feb;6(2):223-30].

Також в обсяг даного винаходу включені варіанти, фрагменти та похідні TCR, наведених у даному винаході.

У даному винаході також передбачені частинки, на яких представлені TCR за даним винаходом, та включення вказаних частинок у бібліотеку частинок. Такі частинки включають без обмеження фаг, дріжджові рибосоми або клітини ссавців. Спосіб отримання таких частинок та бібліотек відомий з рівня техніки [див., наприклад, WO2004/044004; WO01/48145, Chen/in et al. (2008) J. Immuno. Methods 339.2: 175-184].

У додатковому аспекті даного винаходу передбачена нуклеїнова кислота, що кодує TCR за даним винаходом. У деяких варіантах здійснення нуклеїнова кислота являє собою кДНК. У деяких варіантах здійснення даного винаходу передбачена нуклеїнова кислота, що містить послідовність, яка кодує варіабельний домен а-ланцюга TCR за даним винаходом. У деяких варіантах здійснення даного винаходу передбачена нуклеїнова кислота, що містить послідовність, яка кодує варіабельний домен (3-ланцюга TCR за даним винаходом. Нуклеїнова кислота може бути такою, що не зустрічається в природі, та/або очищеною, та/або сконструйованою. Послідовність нуклеїнової кислоти може бути піддана кодон-оптимізації відповідно до системи експресії, що застосовується.

В іншому аспекті даного винаходу передбачений вектор, який містить нуклеїнову кислоту за даним винаходом. Переважно вектор являє собою вектор експресії TCR.

У даному винаході також передбачена клітина, що несе вектор за даним винаходом, переважно вектор експресії TCR. Вектор може містити нуклеїнову кислоту за даним винаходом, що кодує альфа-ланцюг та бета-ланцюг, закодовані в одній відкритій рамці зчитування або двох окремих відкритих рамках зчитування відповідно. В іншому аспекті передбачена клітина, що несе перший вектор експресії, який містить нуклеїнову кислоту, що кодує альфа-ланцюг TCR за даним винаходом, та другий вектор експресії, який містить нуклеїнову кислоту, що кодує бета-ланцюг TCR за даним винаходом. Такі клітини особливо застосовні в адоптивної терапії. Клітини за даним винаходом можуть бути виділеними, та/або рекомбінантними, та/або такими, що не зустрічаються у природі, та/або сконструйованими.

Оскільки TCR за даним винаходом є застосовними в адоптивній терапії, даний винахід включає клітину, що не зустрічається у природі, та/або очищену, та/або сконструйовану клітину, зокрема, Т-клітину, на якій присутній TCR за даним винаходом. У даному винаході також передбачена розмножена популяція Т-клітин, на яких присутні TCR за даним винаходом. Існує низка способів, придатних для здійснення трансфекції Т-клітин нуклеїною кислотою (такою як ДНК, кДНК або РНК), що кодує TCR за даним винаходом [див., наприклад, Robbins et al., (2008) J Immunol. 180: 6116-6131]. Т-клітини, що експресують TCR за даним винаходом, будуть придатними для застосування в лікуванні раку на основі адоптивної терапії. Як відомо фахівцям в даній галузі, існує низка придатних способів, за допомогою яких можна здійснювати адоптивну терапію [див., наприклад, Rosenberg et al., (2008) Nat Rev Cancer 8(4): 299-308].

Розчинні TCR за даним винаходом є застосовними для доставки детектовних міток або терапевтичних засобів у антигенпрезентувальні клітини та тканини, які містять антигенпрезентувальні клітини. Отже, вони можуть бути асоційованими (ковалентно або іншим чином) з детективною міткою (маючи на меті діагностику, якщо TCR застосовують для виявлення присутності клітин, що презентують комплекс GYVDGREHTV-HLA-A*02), терапевтичним засобом або фрагментом, що модифікує РК.

Приклади фрагментів, що модифікують PK, включають без обмеження PEG [Dozier et al., (2015) *Int J Mol Sci.* Oct 28;16(10):25831-64, та Jevsevar et al., (2010) *Biotechnol J.* Jan;5(1):113-28), послідовність PAS (Schlappschy et al., (2013) *Protein Eng Des Sel.* Aug;26(8):489-501), альбумін (Dennis et al., (2002) *J Biol Chem.* Sep 20;277(38):35035-43] та/або неструктуровані поліпептиди [Schellenberger et al., (2009) *Nat Biotechnol.* Dec;27(12): 1186-90].

Детектовні мітки для діагностичних цілей включають, наприклад, флуоресцентні мітки, радіоактивні мітки, ферменти, зонди на основі нуклеїнових кислот та контрастні реагенти.

Терапевтичні засоби, які можуть бути асоційовані з TCR за даним винаходом, включають імунomodulatory, радіоактивні сполуки, ферменти (наприклад, перфорин) або хіміотерапевтичні засоби (наприклад, цисплатин). Щоб гарантувати те, що токсичні ефекти проявляються у необхідному місці, токсин може перебувати всередині ліпосоми, з'єднаної з TCR, внаслідок чого сполука вивільняється повільно. Це дозволить запобігти шкідливим ефектам під час транспорту в організмі та гарантувати максимальний ефект токсину після зв'язування TCR з релевантними антигенпрезентувальними клітинами.

Інші придатні терапевтичні засоби включають:

низькомолекулярні цитотоксичні засоби, тобто сполуки зі здатністю спричиняти лізис клітини ссавців із молекулярною масою, що становить менше ніж 700 Дальтон. Такі сполуки також можуть містити токсичні метали, здатні спричиняти цитотоксичний ефект. Крім того, слід розуміти, що такі низькомолекулярні цитотоксичні засоби також включають проліки, тобто сполуки, що розкладаються або перетворюються за фізіологічних умов із вивільненням цитотоксичних засобів. Приклади таких засобів включають цисплатин, похідні майтанзину, рахелміцин, каліхеаміцин, доцетаксел, етопозид, гемцитабін, іфосфамід, іринотекан, мелфалан, мітоксантрон, сорфімер натрійфотифрин II, темозолмід, топотекан, 21арбор21ат триметреат, ауристатин Е, вінкрисдин і доксорубіцин;

пептидні цитотоксини, тобто білки або їхні фрагменти зі здатністю спричиняти лізис клітин ссавців; Наприклад, рицин, дифтерійний токсин, бактеріальний екзотоксин А з *Pseudomonas*, ДНКаз та РНКаз;

радіонукліди, тобто нестабільні ізотопи елементів, які руйнуються з одночасною емісією однієї або декількох α - або β -частинок, або γ -променів. Наприклад, йод-131, реній-186, індій-111, ітрій-90, вісмут-210 і 213, актиній-225 та астат-213; при цьому для полегшення асоціації цих радіонуклідів з високоафінними TCR або їхніми мультимерами можна застосовувати хелатори;

імуностимулятори, тобто імунні ефекторні молекули, які стимулюють імунну відповідь; Наприклад, цитокини, такі як IL-2 і IFN- γ ;

суперантигени та їхні мутанти;

злиті молекули TCR-HLA, наприклад, злику молекулу з комплексом пептид-HLA, де вказаний пептид отриманий зі поширеного людського патогена, такого як вірус Епштейна-Барр (EBV);

хемокіни, такі як IL-8, тромбоцитарний фактор 4, білок, що стимулює ріст меланоми тощо;

антитіла або їхні фрагменти, включаючи антитіла проти детермінант Т-клітин або NK-клітин (наприклад, антитіла до CD3, антитіла до CD28 або антитіла до CD16);

альтернативні білкові каркаси з антитілоподібними характеристиками зв'язування;

активатори комплексу;

домени ксеногенних білків, домени алогенних білків, домени вірусних/бактеріальних білків, вірусні/бактеріальні пептиди.

В одному переважному варіанті здійснення передбачений TCR за даним винаходом, асоційований (зазвичай за допомогою злиття з N- або C-кінцем альфа- або бета-ланцюга) з антитілом до CD3 або функціональним фрагментом або варіантом вказаного антитіла до CD3 (такі злиті молекули TCR-антитіло до CD3 можуть називатися молекулами ImmTAC™). Як застосовується у даному документі, термін "антитіло" охоплює такі фрагменти та варіанти. Приклади антитіл до CD3 включають без обмеження OKT3, UCST-1, BMA-031 і 12F6. Фрагменти та варіанти/аналоги антитіл, які придатні для застосування у композиціях та способах, описаних у даному документі, включають, серед багатьох інших, мінітіла, Fab-фрагменти, P(ab')₂-фрагменти, dsFv- і scFv-фрагменти, Nanobodies™ (ці конструкції, які продає Ablynx (Бельгія), містять єдиний синтетичний варіабельний домен важкого ланцюга імуноглобуліну, отриманий з антитіла верблюдових (наприклад, верблюда або лам)) та доменні антитіла (від Domantis (Бельгія), що містять єдиний варіабельний домен важкого ланцюга або варіабельний домен легкого ланцюга імуноглобуліну, піддані дозріванню афінності) або альтернативні білкові каркаси, які виявляють антитілоподібні характеристики зв'язування, такі як, наприклад, Affibodies (Affibody (Швеція), що містить сконструйований каркас білка A) або Anticalin (Pieris (Німеччина)), що містять сконструйовані антикаліни).

TCR й антитіла до CD3 можна сполучати за допомогою ковалентного або нековалентного зв'язку. Ковалентний зв'язок може бути прямим або опосередкованим через лінкерну послідовність. Лінкерні послідовності зазвичай є гнучкими, оскільки вони складаються, головним чином, з таких амінокислот, як гліцин, аланін і серин, які не мають великих бічних ланцюгів, які можуть обмежувати гнучкість. Можна легко визначити зручну або оптимальну довжину лінкерних послідовностей. Часто довжина лінкерної послідовності становитиме менше ніж приблизно 12, наприклад, менше ніж 10 амінокислот або 2-10 амінокислот. Придатні лінкери, які можна застосовувати в TCR за даним винаходом, включають без обмеження: GGGGS (SEQ ID NO: 30), GGGSG (SEQ ID NO: 31), GSGGG (SEQ ID NO: 32), GSGGG (SEQ ID NO: 33), GSGGGP (SEQ ID NO: 34), GGEPS (SEQ ID NO: 35), GGEPP (SEQ ID NO: 36) та GGEPPG (SEQ ID NO: 37) (як описано в WO2010/133828).

Специфічні варіанти здійснення конструкцій злитих молекул антитіла до CD3-TCR за даним винаходом включають такі пари альфа- та бета-ланцюгів, в яких альфа-ланцюг складається з варіабельного домену, що містить амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 16-24 або 46-64, та/або бета-ланцюг складається з варіабельного домену, що містить амінокислотну послідовність під SEQ ID NO: 25-29 або 65-81. Вказані альфа- та бета-ланцюги можуть додатково містити константну ділянку, що містить ненативний дисульфідний зв'язок. N- або C-кінець альфа- та/або бета-ланцюга може бути злитим з scFv фрагментом антитіла проти CD3 через лінкер, вибраний з SEQ ID NO: 30-37. Деякі переважні варіанти здійснення таких конструкцій зливої молекули антитіла до CD3-TCR наведені нижче:

Таблиця 7

Альфа-ланцюг, SEQ ID NO	Бета-ланцюг, SEQ ID NO
38	42
38	43
39	44
40	45
41	45

Кожний лінкер під SEQ ID NO: 30-37 можна застосовувати з кожним або будь-яким з переважних варіантів здійснення конструкцій злита молекула антитіла до CD3-TCR. Наприклад, злита молекула антитіла до CD3-TCR, що містить альфа-ланцюг під SEQ ID NO: 24 та бета-ланцюг під SEQ ID NO: 29, де бета-ланцюг злитий з scFv антитіла до CD3 через лінкер під будь-якою з SEQ ID NO: 31-37, є включеним у даний винахід.

Для деяких цілей TCR за даним винаходом можуть бути зібрані у комплекс, що містить декілька TCR, з утворенням мультівалентного комплексу TCR. Існує низка людських білків, що містять домен мультимеризації, який можна застосовувати в одержанні мультівалентних комплексів TCR. Наприклад, домен тетрамеризації з p53, який був застосований для одержання тетрамерів із scFv-фрагментів антитіла, які демонстрували підвищену стійкість у сироватці та значно знижену швидкість дисоціації порівняно з мономерним scFv фрагментом [Willuda et al. (2001) J. Biol. Chem. 276 (17) 14385-14392]. Гемоглобін також має домен тетрамеризації, який можна використовувати для цього виду застосування. Мультівалентний комплекс з TCR за даним винаходом може характеризуватися посиленою здатністю до зв'язування з комплексом GVYDGRENTV-HLA-A*02 порівняно з немультимерним гетеродимером Т-клітинного рецептору дикого типу або гетеродимером за даним винаходом. Таким чином, мультівалентні комплекси TCR за даним винаходом також включені в даний винахід. Такі мультівалентні комплекси TCR за даним винаходом є особливо застосовними для відстеження або націлювання на клітини, що презентують конкретні антигени *in vitro* або *in vivo*, і також є застосовними як проміжні сполуки для отримання додаткових мультівалентних комплексів TCR, що мають такі застосування.

Як добре відомо з рівня техніки, TCR можуть піддаватися післятрансляційним модифікаціям. Глікозилювання являє собою одну таку модифікацію, яка передбачає ковалентне приєднання олігосахаридних фрагментів до певних амінокислот в ланцюзі TCR. Наприклад, добре відомими місцями для приєднання олігосахаридів є аспарагінові залишки або серинові/треонінові залишки. Статус глікозилювання конкретного білка залежить від низки факторів, включаючи послідовність білка, конформацію білка та доступність деяких ферментів. Крім того, статус глікозилювання (тобто тип олігосахариду, ковалентний зв'язок та загальна кількість приєднаних фрагментів) може впливати на функцію білка. Отже, під час отримання рекомбінантних білків часто є бажаним контроль глікозилювання. Контрольоване глікозилювання застосовували для

поліпшення терапевтичних препаратів на основі антитіл. [Jefferis et al., (2009) Nat Rev Drug Discov Mar;8(3):226-34]. Для розчинних TCR за даним винаходом глікозилювання можна контролювати *in vivo*, наприклад, шляхом застосування конкретних ліній клітин, або *in vitro* за допомогою хімічної модифікації. Такі модифікації є бажаними, оскільки глікозилювання може поліпшувати фармакокінетичні показники, знижувати імуногенність та краще імітувати нативний людський білок [Sinclair and Elliott, (2005) Pharm Sci. Aug; 94(8): 1626-35].

Для здійснення введення пацієнтам TCR за даним винаходом (переважно асоційовані з детективною міткою або терапевтичним засобом, або експресовані на трансфектованій Т-клітині), злиті молекули TCR-антитіло до CD3, нуклеїнові кислоти, вектори експресії або клітини за даним винаходом можуть забезпечуватися у фармацевтичній композиції разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними носіями або допоміжними речовинами. Терапевтичні або візуалізаційні TCR або клітини за даним винаходом звичайно забезпечують як частину стерильної фармацевтичної композиції, яка в нормі буде включати фармацевтично прийнятний носій. Така фармацевтична композиція може мати будь-яку придатну форму (залежно від необхідного способу її введення пацієнту). Вона може забезпечуватися в одиничній дозованій формі, при цьому у більшості випадків вона буде забезпечуватися в герметично закритому контейнері та може забезпечуватися як частина набору. Такий набір, як правило (хоча не обов'язково), включатиме інструкції із застосування. Він може включати декілька вказаних одиничних дозованих форм.

Фармацевтичну композицію можна адаптувати для введення за допомогою будь-якого придатного шляху, такого як парентеральний (включаючи підшкірний, внутрішньом'язовий або внутрішньовенний), ентеральний (включаючи пероральний або ректальний), інгаляційний або інтраназальний шляхи. Такі композиції можна отримувати будь-яким способом, відомим у галузі фармацевтики, наприклад, шляхом змішування активного інгредієнта з носієм(ями) або допоміжною речовиною(ами) в стерильних умовах.

Дозування речовин за даним винаходом можуть варіювати у широких межах залежно від захворювання або порушення, що підлягає лікуванню, віку та стану індивідуума, що підлягає лікуванню тощо, при цьому придатний діапазон доз для розчинного TCR за даним винаходом, асоційованого з антитілом до CD3, може становити від 25 нг/кг до 50 мкг/кг. У кінцевому підсумку лікар визначатиме придатні дози для застосування.

TCR, фармацевтичні композиції, вектори, нуклеїнові кислоти та клітини за даним винаходом можуть забезпечуватися у практично чистій формі, наприклад, з чистотою, що становить щонайменше 80 %, щонайменше 85 %, щонайменше 90 %, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % або 100 %.

Також у даному винаході передбачені:

TCR, злита молекула TCR-антитіло до CD3, нуклеїнова кислота, фармацевтична композиція або клітина за даним винаходом для застосування у медицині, переважно для застосування у способі лікування раку або пухлини;

застосування TCR, зливої молекули TCR-антитіло до CD3, нуклеїнової кислоти, фармацевтичної композиції або клітини за даним винаходом у виготовленні медикаменту для лікування раку або пухлини;

спосіб лікування раку або пухлини у пацієнта, що включає введення пацієнту TCR, зливої молекули TCR-антитіло до CD3, нуклеїнової кислоти, фармацевтичної композиції або клітини за даним винаходом;

ін'єкційний склад для введення суб'єкту-людині, що містить TCR, злилу молекулу TCR-антитіло до CD3, нуклеїнову кислоту, фармацевтичну композицію або клітину за даним винаходом.

Рак може являти собою рак молочної залози, стравоходу, голови та шиї, легені, яєчника або сечового міхура. Пухлина може експресувати MAGE A4 та/або може являти собою солідну пухлину. TCR, злилу молекулу TCR-антитіло до CD3, нуклеїнову кислоту, фармацевтичну композицію або клітину за даним винаходом можна вводити шляхом ін'єкції, такої як внутрішньовенна або пряма внутрішньопухлинна ін'єкція. Суб'єкт-людина може мати молекули субтипу HLA-A*02.

Переважні ознаки кожного аспекту даного винаходу є такими самими, як у кожному з інших аспектів *mutatis mutandis*. Документи попереднього рівня техніки, згадані у даному документі, включені в найповнішому обсязі, дозволеному законом.

Опис графічних матеріалів

На фіг. 1 наведена амінокислотна послідовність позаклітинних ділянок альфа- та бета-ланцюгів нативного TCR для MAGE A4.

На фіг. 2 наведена амінокислотна послідовність позаклітинних ділянок альфа- та бета-ланцюгів розчинного нативного TCR для MAGE A4.

На фіг. 3 наведений приклад амінокислотних послідовностей варіабельних ділянок підданого мутації альфа-ланцюга TCR для MAGE A4.

5 На фіг. 4 наведений приклад амінокислотних послідовностей варіабельних ділянок підданого мутації бета-ланцюга TCR для MAGE A4.

На фіг. 5 наведений приклад амінокислотних послідовностей альфа-ланцюга злитих молекул TCR для MAGE A4-антитіло до CD3.

10 На фіг. 6 наведений приклад амінокислотних послідовностей бета-ланцюга злитих молекул TCR для MAGE A4-антитіло до CD3.

На фіг. 7 наведені дані клітинного аналізу, що демонструють активність і специфічність злитих молекул TCR для MAGE A4-антитіло до CD3.

На фіг. 8 наведені дані клітинного аналізу, що демонструють активність і специфічність додаткових злитих молекул TCR для MAGE A4-антитіло до CD3.

15 На фіг. 9 наведений додатковий доказ специфічності злитих молекул TCR для MAGE A4-антитіло до CD3.

На фіг. 10 наведені додаткові дані щодо специфічності злитих молекул TCR для MAGE A4-антитіло до CD3.

20 На фіг. 11 наведений додатковий доказ того, що злиті молекули TCR для MAGE A4-антитіло до CD3 призводить до загибелі ракових клітин.

Даний винахід додатково описаний у наступних необмежувальних прикладах.

Приклади

Приклад 1. Експресія, рефолдинга очищення розчинних TCR

Спосіб

25 Послідовності ДНК, що кодують позаклітинні ділянки альфа- і бета-ланцюгів розчинних TCR за даним винаходом, клонували окремо у плазміді експресії на основі pGMT7 із застосуванням стандартних способів [як описано в Sambrook, et al. Molecular cloning. Vol. 2. (1989) New York: Cold spring harbour laboratory press]. Плазміді експресії трансформували окремо у штам Rosetta E. coli (BL21pLysS), та одиночні стійкі до ампіциліну колонії вирощували за 37 °C у середовищі
30 TYP (+ 100 мкг/мл ампіциліну) до OD₆₀₀, що становила ~0,6-0,8, перед тим, як здійснювати індукцію експресії білка за допомогою 0,5 mM IPTG. Клітини збирали шляхом центрифугування через три години після здійснення індукції. Клітинні осади лізували реагентом для екстракції білків BugBuster (Merck Millipore) згідно з інструкціями виробника. Осади тілець включення одержували шляхом центрифугування. Осади промивали двічі у буфері Triton (50 mM Tris-HCl, pH 8,1, 0,5 % Triton-X100, 100 mM NaCl, 10 mM NaEDTA) і наприкінці повторно суспендували у
35 буфері без поверхнево-активних речовин (50 mM Tris-HCl, pH 8,1, 100 mM NaCl, 10 mM NaEDTA). Вихід білка тілець включення визначали кількісно шляхом солюбілізування за допомогою 6 M гуанідину-HCl та вимірювання OD₂₈₀. Потім розраховували концентрацію білка із застосуванням коефіцієнта екстинкції. Чистоту тілець включення вимірювали шляхом
40 солюбілізування за допомогою 8 M сечовини та завантаження ~2 мкг на 4-20 % SDS-PAGE за відновлювальних умов. Потім чистоту оцінювали або розраховували із застосуванням програмного забезпечення для денситометрії (Chemidoc, Biorad). Тільця включення зберігали за +4 °C у випадку короткого терміну зберігання і за -20 °C або -70 °C у випадку більш тривалого терміну зберігання.

45 Для рефолдингу розчинного TCR тільця включення, що містять α- і β-ланцюги, спочатку змішували та розводили в 10 мл буфера для солюбілізування/денатурації (6 M гуанідину гідрохлориду, 50 mM Tris HCl, pH 8,1, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 20 mM DTT) з подальшою інкубацією протягом 30 хвилин за 37 °C. Потім ініціювали рефолдинг шляхом подальшого розведення в 1 л буфера для рефолдингу (100 mM Tris, pH 8,1, 400 mM L-аргініну HCl, 2 mM
50 EDTA, 4 M сечовини, 10 mM цистаміну гідрохлориду та 2,5 mM цистаміну дигідрохлориду) та розчин добре перемішували. Суміш, яку піддавали рефолдингу, діалізували проти 10 л H₂O протягом 18-20 годин за 5 °C±3 °C. Після цього діалізний буфер двічі міняли на 10 mM Tris, pH 8,1 (10 л) та діаліз тривав ще 15 годин. Суміш, яку піддавали рефолдингу, потім фільтрували крізь 0,45 мкм целюлозні фільтри.

55 Очищення розчинних TCR ініціювали шляхом застосування діалізного рефолдингу в аніонообмінній колонці POROS® 50HQ та елюювання зв'язаного білка за допомогою градієнта 0-500 mM NaCl в 20 mM Tris, pH 8,1, за допомогою 50 об'ємів колонки, із застосуванням очисника Akta® (GE Healthcare). Пікові фракції TCR ідентифікували за допомогою SDS PAGE, а потім об'єднували та концентрували. Потім концентрований зразок вносили в гель-фільтраційну
60 колонку Superdex® 75HR (GE Healthcare), попередньо урівноважену за допомогою PBS буфера

Дульбекко. Пікові фракції TCR об'єднували та концентрували, а також розраховували кінцевий вихід очищеного матеріалу.

Приклад 2. Експресія, рефолдинг та очищення молекул ImmTAC (злитих молекул розчинний TCR-антитіло до CD3)

5 Спосіб

Одержання ImmTAC здійснювали, як описано в прикладі 1, за винятком того, що бета-ланцюг TCR зливали за допомогою лінкера з одноланцюговим антитілом до CD3. Крім того, під час очищення після аніонного обміну виконували стадію катіонного обміну. У цьому випадку пікові фракції з колонки для аніонного обміну розбавляли в 20 разів у 20 mM MES (pH 6,5) та вносили у катіонообмінну колонку POROS® 50HS. Зв'язаний білок елюювали за допомогою градієнта 0-500 mM NaCl у 20 mM MES. Пікові фракції ImmTAC об'єднували та регулювали за допомогою 50 mM Tris, pH 8,1, а потім концентрували та наносили безпосередньо на гель-фільтраційну матрицю, як описано в прикладі 1.

Приклад 3. Визначення характеристик зв'язування

Аналіз зв'язування очищених розчинних TCR та молекул ImmTAC з відповідним комплексом пептид-HLA виконували за допомогою поверхневого плазмонного резонансу із застосуванням пристрою Biacore 3000 або Biacore T200 або за допомогою інтерферометри біошарів із застосуванням пристрою ForteBio Octet). Біотинільовані молекули HI_A-A*02 класу I піддавали рефолдингу з пептидом, що представляє інтерес, та очищали із застосуванням способів, відомих фахівцям даної галузі [O'Callaghan et al. (1999). Anal Biochem 266(1): 9-15; Garboczi, et al. (1992). Proc Natl Acad Sci USA 89(8): 3429-3433]. Усі вимірювання виконували за 25 °C в PBS буфері Дульбекко, доповненому за допомогою 0,005 % P20.

Спосіб Biacore

Біотинільовані мономери пептид-HLA іммобілізували на сенсорних чипах CM-5 зі зв'язаним стрептавідином. Рівноважні константи зв'язування визначали із застосуванням серійних розведень розчинного TCR/ImmTAC, які вводили за константної швидкості потоку 30 мкл хв.⁻¹ через проточну кювету, вкриту ~200 одиницями відповіді (RU) комплексу пептид-HI-A-A*02. Рівноважні відповіді нормалізували для кожної концентрації TCR шляхом віднімання відповіді на об'єм буфера у контрольній проточній кюветі, що містить невідповідний пептид-HLA. Значення K_D отримували за допомогою апроксимації нелінійної кривої із застосуванням програмного забезпечення Prism та ізотерми зв'язування Лангмюра, зв'язування = $C \cdot \text{Max} / (C + K_D)$, де "зв'язування" означає рівноважне зв'язування в RU за введеної концентрації TCR C, а Max означає максимальне зв'язування.

У випадку високоафінних взаємодій параметри зв'язування визначали за допомогою одного аналізу кінетики реакції. П'ять різних концентрацій розчинного TCR/ImmTAC вводили в проточну кювету, вкриту -100-200 RU комплексу пептид-HLA, із застосуванням швидкості потоку 50-60 мкл хв.⁻¹. Як правило, вводили 60-120 мкл розчинного TCR/ImmTAC за найбільшої концентрації 100-200 nM, при цьому для інших чотирьох введень застосовували послідовні 2-кратні розведення. Першою вводили найнижчу концентрацію. Потім для вимірювання фази дисоціації вводили буфер, доки не досягали дисоціації ≥ 10 %, як правило, протягом 1-3 годин. Параметри кінетики реакції розраховували із застосуванням програмного забезпечення BIAevaluation®. Фази дисоціації апроксимували до рівняння одного експоненціального розпаду, що дозволяє розраховувати напівперіод. На основі $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ розраховували рівноважну константу K_D .

Спосіб Octet

Біотинільовані мономери пептид-HLA захоплювали до концентрації 1 nM на стрептавідинових (SA) біосенсорах (Pall ForteBio), з попередньо іммобілізованим стрептавідином. Сенсори блокували за допомогою вільного біотину (2 мкМ) протягом 2 хвилин. Рівноважні константи зв'язування визначали шляхом занурення завантажених біосенсорів в розчинний TCR/ImmTAC, серійно розведений в 96-лунковому або 384-лунковому планшеті для зразків. Струшування планшета здійснювали за 1000 об./хв. У випадку низькоафінних взаємодій (діапазон мкМ) застосовували короткий час асоціації (-2 хвилини) та короткий час дисоціації (~2 хвилини). Криві зв'язування обробляли шляхом віднімання подвійного еталону із застосуванням еталонних біосенсорів, завантажених невідповідним pHLA, із застосуванням програмного забезпечення Octet Data Analysis (Pall ForteBio). Рівноважні відповіді (нМ) застосовували, щоб оцінити значення K_D за графіками стаціонарного стану, апроксимованих до рівняння: Відповідь = $R_{\text{max}} \cdot \text{KOHM} / (K_D + \text{конц.})$, де "відповідь" означає рівноважне зв'язування в нМ для кожної концентрації TCR (конц.), а R_{max} означає максимальну відповідь зв'язування за умови насичення pHLA.

У випадку високоафінних взаємодій (діапазон нМ - пМ) параметри кінетики реакції визначали на основі кривих зв'язування, побудованих за S3 концентраціями TCR/ImmTAC, як

правило, 10 нМ, 5 нМ і 2,5 нМ. Час асоціації становив 30 хвилин, а час дисоціації становив 1-2 години. Криві зв'язування обробляли шляхом віднімання подвійного еталону із застосуванням еталонних біосенсорів, завантажених невідповідним pHLA та блокованих біотином. Параметри кінетики реакції k_{on} і k_{off} розраховували шляхом загальної апроксимації безпосередньо до кривих зв'язування із застосуванням програмного забезпечення Octet Data Analysis (Pall ForteBio). Kd вираховували на основі k_{off}/k_{on} , а напівперіод дисоціації на основі $t_{1/2}=0,693/k_{off}$.

Приклад 4. Визначення характеристик зв'язування нативного TCR

Розчинний нативний TCR одержували згідно зі способом, описаним у прикладі 1, а зв'язування з pHLA аналізували згідно з прикладом 3. Амінокислотні послідовності альфа- і бета-ланцюгів відповідали послідовностям, показаним на фіг. 2. Розчинний біотинільований HI_A-A*02 одержували з пептиду MAGE A4, GVYDGRENTV, та іммобілізували на сенсорному чипі BIAcore.

Результати

Зв'язування визначали за різних концентрацій, та визначили, що значення K_D для взаємодії становить 142 мкМ. Перехресну реактивність (специфічність) оцінювали за панеллю з 15 невідповідних комплексів пептид-HI_A-A*02 із застосуванням рівноважного способу BIAcore з прикладу 3. 15 невідповідних pHLA об'єднували у три групи та завантажували в одну з трьох проточних кювет, щоб отримати приблизно 1000 RU кожного pHLA на проточну кювету. В усі проточні кювети вводили по 20 мкл розчинного TCR дикого типу за концентрації 73 мкМ зі швидкістю 20 мкл/хв. За будь-якої концентрації не виявлено значного зв'язування, що вказує на те, що нативний TCR є специфічним щодо комплексу GVYDGRENTV-HLA-A*02.

Ці дані вказують на те, що цей TCR зв'язується з мішенню за придатної афінності та специфічності й, отже, надає застосовну вихідну послідовність для терапевтичних TCR.

Приклад 5. Визначення характеристик зв'язування розчинних підданих мутації TCR та молекул ImmTAC за даним винаходом

Розчинні піддані мутації TCR та молекули ImmTAC одержували на основі послідовностей, наведених на фіг. 2. Зразки одержували, як описано в прикладах 1 і 2, а характеристики зв'язування визначали згідно з прикладом 3.

Результати

Виявили, що єдина точкова мутація з заміною цистеїну на валін у положенні 19 альфа-ланцюга (SEQ ID NO: 6), поліпшує рефолдинг та вихід під час очищення, не впливаючи на афінність або специфічність (зарєєстрували K_D , що становить 145 мкМ, та не спостерігали перехресної реактивності у відношенні тієї ж панелі з 15 комплексів альтернативний пептид-HLA, які тестували з WT).

Ідентифікували альфа- та/або бета-ланцюги TCR, що містили мутації щонайменше в одній ділянці CDR відносно послідовностей CDR, показаних на фіг. 2 (SEQ ID NO: 4 і 5). Такі послідовності TCR розпізнавали комплекс GVYDGRENTV-HLA-A*02 із особливою придатною афінністю та/або напівперіодом зв'язування. У деяких випадках ідентифікували додаткові мутації, які поліпшували стабільність та/або вихід TCR, включаючи мутацію K1A в альфа-ланцюзі (із посиленням на нумерацію за SEQ ID NO: 4). Амінокислотні послідовності деяких варіабельних ділянок альфа- і бета-ланцюгів підданого мутації TCR за даним винаходом представлені на фігурах 4 і 5 відповідно. В таблиці нижче наведені характеристики зв'язування для розчинних TCR або молекул ImmTAC (злитих молекул розчинний TCR-антитіло до CD3), що містять позначені варіабельні ділянки альфа- і бета-ланцюгів.

Таблиця 9

Альфа-ланцюг (SEQ ID NO)	Бета-ланцюг (SEQ ID NO)	Формат (розчинний TCR або ImmTAC)	Спосіб (Biacore/Octet)	Параметри зв'язування	
				KD	T _{1/2}
WTc19v(16)	b1 (25)	Розчинний TCR	Biacore	330 нМ	>2хв.
a7(17)	b1 (25)	Розчинний TCR	Octet	nd	24 хв.
a12 (18)	b1 (25)	Розчинний TCR	Octet	nd	24 хв.
a13 (19)	b1 (25)	Розчинний TCR	Octet	nd	144 хв.
a19 (21)	b1 (25)	Розчинний TCR	Octet	nd	7,2 год.
WTc19v(16)	b14(26)	Розчинний TCR	Octet	nd	10 хв.
WTc19v(16)	b21 (28)	Розчинний TCR	Octet	nd	23 хв.
a13 (19)	b21 (28)	Розчинний TCR	Biacore	nd	13 год.
a13 (19)	b14 (26)	Розчинний TCR	Octet	nd	4,1 год.
a19(21)	b14 (26)	Розчинний TCR	Octet	nd	9,1 год.

Таблиця 9

Альфа-ланцюг (SEQ ID NO)	Бета-ланцюг (SEQ ID NO)	Формат (розчинний TCR або ImmTAC)	Спосіб (Biacore/Octet)	Параметри зв'язування	
				KD	T _{1/2}
a7(17)	b21 (28)	ImmTAC	Octet	155 nM	5,4 год.
a19ka(22)	b1 (25)	ImmTAC	Octet	159 nM	4,5 год.
a19ka(22)	b21 (28)	ImmTAC	Octet	53 nM	16,9 год.
a13ka(20)	b21 (28)	ImmTAC ³	Biacore	58,6 nM	13,8 год.
a19ka(22)	b14 (26)	ImmTAC ⁰	Biacore	32,3 nM	27,6 год.
a19ka(22)	b14L (27)	ImmTAC ⁰	Octet	75,1 nM	13,7 год.
a13kaLQ(24)	b21L(29)	ImmTAC ⁴	Biacore	74 nM	15,6 год.
a13kaLS(23)	b21L(29)	ImmTAC ⁶	Biacore	62,6 nM	8,9 год.

nd = не визначали

^a Відповідає ImmTAC3 з прикладу 6, послідовності повнорозмірних альфа- і бета-ланцюгів наведені під SEQ ID NO: 39 і SEQ ID NO: 44 відповідно. Значення базуються на середньому за 7 незалежними вимірюваннями.

^b Відповідає ImmTAC1 з прикладу 6, послідовності повнорозмірних альфа- і бета-ланцюгів наведені під SEQ ID NO: 38 і SEQ ID NO: 42 відповідно. Значення базуються на середньому за 7 незалежними вимірюваннями.

^c Відповідає ImmTAC2 з прикладу 6, послідовності повнорозмірних альфа- і бета-ланцюгів наведені під SEQ ID NO: 38 і SEQ ID NO: 43 відповідно.

^d Відповідає ImmTAC4 з прикладу 6, послідовності повнорозмірних альфа- і бета-ланцюгів наведені під SEQ ID NO: 40 і SEQ ID NO: 45 відповідно. Значення базуються на середньому за 4 незалежними вимірюваннями.

^e Відповідає ImmTAC5 з прикладу 6, послідовності повнорозмірних альфа- і бета-ланцюгів наведені під SEQ ID NO: 41 і SEQ ID NO: 45 відповідно.

Додаткові комбінації варіабельних ділянок альфа- та бета ланцюгів, що містять мутації за даним винаходом, тестували щодо зв'язування з комплексом GVDGRENTV-HI_A-A*02. Дані, представлені в таблиці нижче, отримували із застосуванням Biacore, як описано вище.

5 Зазначені послідовності варіабельних доменів альфа- та бета-ланцюгів одержували як молекули ImmTAC.

Таблиця 10

Альфа-ланцюг (SEQ ID NO)	Бета-ланцюг (SEQ ID NO)	KD	T _{1/2}
a36 (SEQ ID NO: 46)	b21L(SEQIDNO:29)	210 nM	9,2 год.
a37 (SEQ ID NO: 47)	b21L(SEQIDNO:29)	24 nM	47,0 год.
a38 (SEQ ID NO: 48)	b21 (SEQ ID NO: 29)	233 nM	10,0 год.
a39 (SEQ ID NO: 49)	b21 (SEQ ID NO: 29)	3013 nM	0,6 год.
a40 (SEQ ID NO: 50)	b21 (SEQ ID NO: 29)	176 nM	4,5 год.
a41 (SEQ ID NO: 51)	b21 (SEQ ID NO: 29)	429 nM	2,7 год.
a13ka(SEQ ID NO:)	b41 (SEQ ID NO: 65)	45 nM	25,1 год.
a13kaL_Q(SEQIDNO:24)	b42 (SEQ ID NO: 66)	424 nM	2,1 год.
a13kaLQ(SEQ ID NO: 24)	b43 (SEQ ID NO: 67)	150 nM	8,0 год.
a13kaLQ(SEQ ID NO: 24)	b44 (SEQ ID NO: 68)	132 nM	9,0 год.
a13kaL_Q(SEQIDNO: 24)	b45 (SEQ ID NO: 69)	704 nM	1,9 год.
a13kaLQ(SEQIDNO:24)	b46 (SEQ ID NO: 70)	1913 nM	0,9 год.
a30 (SEQ ID NO: 52)	b14 (SEQ ID NO: 26)	103 nM	17год.
a42 (SEQ ID NO: 53)	b14 (SEQ ID NO: 26)	21 nM	46,4 год.
a31 (SEQ ID NO: 54)	b14 (SEQ ID NO: 26)	182 nM	9 год.
a43 (SEQ ID NO: 55)	b14 (SEQ ID NO: 26)	258 nM	6,0 год.
a32 (SEQ ID NO: 56)	b14 (SEQ ID NO: 26)	179 nM	12год.
a44 (SEQ ID NO: 57)	b14 (SEQ ID NO: 26)	88 nM	19,0 год.
a33 (SEQ ID NO: 58)	b14 (SEQ ID NO: 26)	947 nM	1,2 год.
a45 (SEQ ID NO: 59)	b14 (SEQ ID NO: 26)	74 nM	11,8 год.

Таблиця 10

Альфа-ланцюг (SEQ ID NO)	Бета-ланцюг (SEQ ID NO)	KD	T _{1/2}
a34 (SEQ ID NO: 60)	b14 (SEQ ID NO: 26)	167 пМ	8,7 год.
a19ka(SEQIDNO:22)	b32 (SEQ ID NO: 71)	37,0 пМ	30,9 год.
a19ka(SEQIDNO:22)	B33 (SEQ ID NO: 72)	33 пМ	35,9 год.
a19ka(SEQ ID NO: 22)	b34 (SEQ ID NO: 73)	54 пМ	21,2 год.
a19ka (SEQ ID NO: 22)	b35 (SEQ ID NO: 74)	28 пМ	37,4 год.
a19ka(SEQIDNO:22)	b36 (SEQ ID NO: 75)	11 пМ	58 год.
a19ka(SEQIDNO:22)	b37 (SEQ ID NO: 76)	47 пМ	24,9 год.
a19ka(SEQIDNO: 22)	b38 (SEQ ID NO: 77)	597 пМ	2,3 год.
a19ka(SEQIDNO:22)	b39 (SEQ ID NO: 78)	923 пМ	1,1 год.
a19ka(SEQIDNO: 22)	b40 (SEQ ID NO: 79)	143 пМ	7,9 год.
aM50L (SEQ ID NO: 62)	bWT (SEQ ID NO: 5)	31,3 мкМ	nd
aS95A (SEQ ID NO: 63)	bWT (SEQ ID NO: 5)	3,5 мкМ	nd
aS98L (SEQ ID NO: 64)	bWT (SEQ ID NO: 5)	39,1 мкМ	nd
aWTka(SEQ ID NO: 61)	bl_96D (SEQ ID NO: 80)	71,4 мкМ	nd
aWTka(SEQIDNO:61)	bM97Q (SEQ ID NO: 81)	27,5 мкМ	nd

nd - не визначали

Дані, представлені в таблицях 9 і 10, вказують на те, що деякі послідовності варіабельних ділянок TCR за даним винаходом мають високу афінність зв'язування та тривалий напівперіод зв'язування для комплексу GGYDGRENTV-HLA-A*02 й, отже, є особливо придатними для застосування як розчинні терапевтичні реагенти.

Крім зв'язування з когнатним комплексом GGYDGRENTV-HLA-A*02 TCR за даним винаходом також оцінювали щодо зв'язування з подібними пептидами, отриманими з MAGE A8 і MAGE B2 та презентованими за допомогою HLA-A*02. Числа у таблиці нижче представляють дані зв'язування Віасоге для трьох молекул ImmTAC, що містять зазначені послідовності варіабельних доменів альфа- і бета-ланцюгів. Усі три молекули ImmTAC розпізнають пептид MAGE-A8 на рівні, подібному розпізнаванню когнатного пептиду, а пептид MAGE-B2 на більш слабкому рівні.

Таблиця 11

Альфа-ланцюг (SEQ ID NO)	Бета-ланцюг (SEQ ID NO)	MAGE-A8		MAGE-B2	
		KD	T _{1/2}	KD	T _{1/2}
a19ka(22)	b14 (26) ^a	62,8 пМ	17,5 год.	468 пМ	7,7 год.
a13ka(20)	b21 (28) ^b	99,2 пМ	8,7 год.	847 пМ	4,2 год.
a13ka Q(24)	b21L(29) ^c	155 пМ	9,6 год.	1532 пМ	3,27 год.

^a Відповідає ImmTAC1 з прикладу 6, послідовності повнорозмірних альфа- і бета-ланцюгів наведені під SEQ ID NO: 38 і SEQ ID NO: 42 відповідно.

^b Відповідає ImmTAC3 з прикладу 6, послідовності повнорозмірних альфа- і бета-ланцюгів наведені під SEQ ID NO: 39 і SEQ ID NO: 44 відповідно.

^c Відповідає ImmTAC4 з прикладу 6, послідовності повнорозмірних альфа- і бета-ланцюгів наведені під SEQ ID NO: 40 і SEQ ID NO: 45 відповідно.

Приклад 6. Активне та специфічне переадресування Т-клітин молекулами ImmTAC

Молекули ImmTAC, що містять послідовності підданих мутації варіабельних ділянок альфа- і бета-ланцюгів з особливо високою афінністю щодо цільового антигена, тестували на їхню здатність опосередковувати активне та специфічне переадресування CD3+ Т-клітин за допомогою аналізу ELISPOT із застосуванням секреції інтерферону-γ (IFN-γ як показник активації Т-клітин.

У даному прикладі послідовність варіабельної ділянки альфа-ланцюга вибирали з SEQ ID NO: 20-24, а послідовність варіабельної ділянки бета-ланцюга вибирали з SEQ ID NO: 26-29. Послідовності варіабельного домену піддавали злиттю з відповідними послідовностями позаклітинного константного домену альфа- або бета-ланцюга, які містили ненативний

дисульфідний зв'язок. У кожному випадку бета-ланцюг зливали за допомогою лінкера з scFv-антитілом до CD3; при цьому лінкер вибирали з SEQ ID NO: 30-37. Повнорозмірні послідовності молекул ImmTAC, які піддавали тестуванню, наведені під SEQ ID NO, викладеними у наступній таблиці:

5

Таблиця 12

	Альфа-ланцюг, SEQ ID NO	Бета-ланцюг, SEQ ID NO
ImmTAC1	38	42
ImmTAC2	38	43
ImmTAC3	39	44
ImmTAC4	40	45
ImmTAC5	41	45

Спосіб

Аналізи виконували із застосуванням набору ELISPOT для аналізу на IFN-у людини (BD Biosciences). Цільові клітини готували за щільності 1×10^6 /мл в середовищі для аналізу (RPMI 1640, що містить 10 % термоінактивованої FBS та 1 % пеніциліну-стрептоміцину-L-глутаміну) та висівали з розрахунку 50000 клітин на лунку в об'ємі 50 мкл. Як ефекторні клітини застосовували моноклеарні клітини периферичної крові (PBMC), виділені зі свіжої крові донора, та їх висівали з розрахунку 10000-50000 клітин на лунку в об'ємі 50 мкл (точна кількість клітин, які застосовують у кожному експерименті, залежить від донора та може бути відрегульована для забезпечення відповіді в межах діапазону, придатного для аналізу). Застосовували перемінні концентрації ImmTAC, що охоплюють передбачуваний клінічно релевантний діапазон, та додавали до лунки в об'ємі 50 мкл.

Планшети готували згідно з інструкціями виробника. У релевантні лунки додавали цільові клітини, ефекторні клітини та молекули ImmTAC та кінцевий об'єм доводили до 200 мкл за допомогою середовища для аналізу. Усі реакції виконували у трьох повторностях. Також готували контрольні лунки без додавання ImmTAC, ефекторних клітин або цільових клітин. Потім планшети інкубували протягом ночі (37 °C/5 % CO₂). Наступного дня планшети тричі промивали буфером для промивання (саше з 1xPBS, що містить 0,05 % P20, розведене в деіонізованій воді). Потім у кожен лунку додавали первинне детекторне антитіло в об'ємі 50 мкл. Планшети інкубували за кімнатної температури протягом 2 годин, а потім знову тричі промивали. Вторинне виявлення виконували шляхом додавання в кожен лунку 50 мкл розбавленого стрептавідину-HRP та інкубування за кімнатної температури протягом 1 години та стадію промивання повторювали. Не більше ніж за 15 хв. до застосування додавали одну краплю (20 мкл) хромогену АЕС на кожний 1 мл субстрату АЕС, змішували та по 50 мкл додавали в кожен лунку. Появу плям контролювали через однакові проміжки часу та планшети промивали у водопровідній воді для припинення ходу реакції. Потім планшети залишали сушитися за кімнатної температури протягом щонайменше 2 годин, а потім підраховували плями із застосуванням аналізатора CTL із програмним забезпеченням Immunospot (Cellular Technology Limited).

Результати

Дані, представлені на фігурах 7 і 8, верхні панелі, показують, що молекули ImmTAC 1-2 і 3-5 відповідно, здатні опосередковувати активне (тобто з EC₅₀, меншою за 100 пМ) переадресування Т-клітин на ракові клітини, що експресують цільовий антиген (NCI-H1703 - клітинна лінія раку легені людини). Активації Т-клітин проти антигеннегативних ракових клітин (клітинної лінії папілярної аденокарциноми людини NCI-H441 у випадку молекул ImmTAC 1-2 та клітинної лінії раку молочної залози людини CAMA-1 у випадку молекул ImmTAC 3-5) в межах клінічно релевантного діапазону концентрацій (≤ 1 нМ) не виявляли, що демонструє специфічність відповіді.

Молекули ImmTAC тестували на специфічність із застосуванням клітин, що отримані з нормальних тканин здорової людини, як цільових клітин. На нижній панелі фігури 7 продемонстровано, що молекули ImmTAC 1-2 характеризуються мінімальною реактивністю щодо клітин судин шкіри людини за клінічно релевантною концентрації. Подібним чином, на нижніх панелях фігури 8 продемонстровано, що молекули ImmTAC 3-5 характеризуються мінімальною реактивністю щодо клітин судин шкіри людини та клітин нирки людини за клінічно релевантною концентрації.

Молекули ImmTAC 1 і 3 додатково тестували на специфічність із застосуванням панелі клітин людини, отриманих із нормальних здорових тканин, застосовуючи той самий метод

ELISPOT, що описаний вище. Дані, представлені на фігурі 9, показують обмежену активацію Т-клітин у межах клінічно релевантного діапазону концентрацій (≤ 1 нМ) щодо здорових тканин, включаючи тканини судин шкіри, серця, скелетних м'язів, печінки та легені.

Крім того, молекули ImmTAC 1 і 4 тестували на реактивність із застосуванням розширеної панелі, що включала >10 типів нормальних клітин, із застосуванням того самого методу ELISPOT, що описаний вище, та діапазон концентрацій ImmTAC з меншими значеннями (0,01 нМ, 0,1 нМ, 0,2 нМ, 0,3 нМ, 0,5 нМ і 1 нМ). На фігурі 10 представлені репрезентативні дані, отримані для клітин скелетних м'язів, серця та нирок. У кожному випадку антигенпозитивні клітини (NCI-H1703) й антигеннегативні клітини (NCI-H441) включали як контролю. Дані демонструють незначну реактивність щодо нормальних клітин порівняно з антигенпозитивними клітинами в межах клінічно релевантного діапазону концентрацій (≤ 1 нМ).

Ці дані вказують на те, що молекули ImmTAC демонструють високий рівень активності та специфічності й, отже, є особливо придатними для терапевтичного застосування.

Приклад 7. Активна загибель пухлинних клітин під дією Т-клітин, переадресованими за допомогою ImmTAC

Здатність молекул ImmTAC за даним винаходом опосередковувати активну загибель антигенпозитивних пухлинних клітин під дією переадресованих Т-клітин досліджували із застосуванням платформи IncuCyte (Essen BioScience). Цей аналіз забезпечує можливість виявлення вивільнення каспази-3/7, маркера апоптозу, за допомогою мікроскопії у режимі реального часу.

Спосіб

Аналізи виконували із застосуванням набору для аналізу апоптозу за вивільненням каспази-3/7 із застосуванням 96-лункового формату CellPlayer (Essen BioScience, № за каталогом 4440) та виконували його згідно з протоколом виробника. Коротко, цільові клітини (NCI-H1703 - антиген $^{+ve}$ HLA A*02 $^{+ve}$ та NCI-H441 – антиген $^{-ve}$ HLA A*02 $^{+ve}$) висівали із розрахунку 5000 клітин на лунку та інкубували протягом ночі, щоб забезпечити їхнє прилипання. Готували розчини ImmTAC з концентраціями від 0,5 нМ до 0,01 нМ та по 25 мкл кожної концентрації додавали у відповідну лунку. Ефекторні клітини застосовували з розрахунку відношення ефектори/цільові клітини 10:1 (50000 клітин на лунку). Також готували контрольний зразок без ImmTAC. Реагент для аналізу NucView готували за концентрації 30 мкМ та 25 мкл додавали в кожну лунку, а кінцевий об'єм доводили до 150 мкл (з одержанням кінцевої концентрації 5 мкМ). Планшет розміщали у пристрої IncuCyte та отримували зображення через кожні 2 години (1 зображення на лунку) протягом 3 діб. Визначали кількість апоптозних клітин на кожному зображенні та реєстрували число апоптозних клітин на мм². Аналізи виконували у трьох повторностях.

Результати

Дані, представлені на фігурі 11, показують загибель пухлинних клітин під дією Т-клітин, переадресованих за допомогою ImmTAC, у режимі реального часу. Результати представлені для ImmTAC1 і ImmTAC4. У випадку обох молекул ImmTAC з концентрацією 0,01 нМ продемонстрована загибель антигенпозитивних пухлинних клітин під дією переадресованих Т-клітин. Загибель антигеннегативних клітин не спостерігали навіть за найвищої концентрації (0,5 нМ).

Ці дані підтверджують, що ImmTAC1 і ImmTAC4 опосередковують активну загибель антигенпозитивних пухлинних клітин під дією переадресованих Т-клітин.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ИМУНОКОР ЛІМІТЕД

<120> Т-клітинні рецептори

<130> P101450WO

<150> 1606009.7

<151> 2016-04-08

<160> 81

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 10
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

5 <400> 1

Gly Val Tyr Asp Gly Arg Glu His Thr Val

1 5 10

10 <210> 2
 <211> 207
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

15 <400> 2

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

1 5 10 15

Lys Asn Cys Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Met Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn His Ser Gly

85 90 95

Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His
100 105 110

Pro Tyr Ile Gln Lys Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser
115 120 125

Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln
130 135 140

Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys
145 150 155 160

Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val
165 170 175

Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn
180 185 190

Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
195 200 205

- 5 <210> 3
<211> 246
<212> Білок
<213> Homo sapiens

- 10 <400> 3

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met

20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35 40 45

Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Phe Leu

85 90 95

Met Thr Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala

115 120 125

Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr

130 135 140

Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser

145 150 155 160

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro

165 170 175

Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu

180 185 190

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn

195 200 205

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu

210 215 220

Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu

225 230 235 240

Ala Trp Gly Arg Ala Asp

245

<210> 4

5 <211> 207

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 4

10

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

1 5 10 15

Lys Asn Cys Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Met Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn His Ser Gly

85 90 95

Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro Tyr Ile Gln Lys Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser

115 120 125
 Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln
 130 135 140
 Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys
 145 150 155 160
 Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val
 165 170 175
 Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn
 180 185 190
 Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
 195 200 205

5 <210> 5
 <211> 246
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

10 <400> 5

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met
20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe
35 40 45

Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr
50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser
65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Phe Leu
85 90 95

Met Thr Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
100 105 110

Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala
115 120 125

Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
130 135 140

Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser
145 150 155 160

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro
165 170 175

Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu
180 185 190

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn
195 200 205

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
210 215 220

Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
225 230 235 240

Ala Trp Gly Arg Ala Asp
245

5 <210> 6
<211> 6
<212> Білок
<213> Homo sapiens

10 <400> 6

Val Ser Pro Phe Ser Asn
1 5

15 <210> 7
<211> 7
<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Thr Phe Ser Glu Asn Thr

1 5

5

<210> 8

<211> 13

<212> Білок

10 <213> Homo sapiens

<400> 8

Val Val Asn His Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe

1 5 10

15

<210> 9

<211> 17

<212> Білок

<213> Homo sapiens

20

<400> 9

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

1 5 10 15

Ile

25

<210> 10

<211> 34

<212> Білок

<213> Homo sapiens

30

<400> 10

Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln

1 5 10 15

Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr

20 25 30

Ile Cys

<210> 11

<211> 5

5 <212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Asp His Glu Asn

1 5

10

<210> 12

<211> 6

<212> Білок

15 <213> Homo sapiens

<400> 12

Ser Tyr Asp Val Lys Met

1 5

20

<210> 13

<211> 16

<212> Білок

<213> Homo sapiens

25

<400> 13

Ala Ser Ser Phe Leu Met Thr Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe

1 5 10 15

30

<210> 14

<211> 17

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr

1 5 10 15

5 Phe

<210> 15

<211> 37

<212> Білок

10 <213> Homo sapiens

<400> 15

Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys

1 5 10 15

Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr

20 25 30

Ser Met Tyr Leu Cys

35

15

<210> 16

<211> 113

<212> Білок

20 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Мутантний альфа-ланцюг (c19v)

25 <400> 16

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

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Met Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn His Ser Gly

85 90 95

Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

- 5 <210> 17
<211> 113
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

- 10 <220>
<223> Мутантний альфа-ланцюг (a7)

<400> 17

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

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Leu Asp Tyr Ala Ile Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn His Ser Gly

85 90 95

Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

5

<210> 18

<211> 113

<212> Білок

10 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Мутантний альфа-ланцюг (α12)

<400> 18

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

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Met Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Arg Ala Asp

85 90 95

5

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

<210> 19

<211> 113

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

10

<220>

<223> Мутантний альфа-ланцюг (α13)

<400> 19

5

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

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Met Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Ser Ala Asn

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

10

<210> 20

<211> 113

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Мутантний альфа-ланцюг (a13ka)

5

<400> 20

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Met Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Ser Ala Asn

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

10

<210> 21

<211> 113

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

5 <223> Мутантний альфа-ланцюг (a19)

<400> 21

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

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Leu Asp Tyr Ala Ile Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

10

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Arg Ala Asp

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

<210> 22

<211> 113
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

5 <220>
 <223> Мутантний альфа-ланцюг(а19ка)
 <400> 22

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

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn
 20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr
 35 40 45

10

Ile Leu Asp Tyr Ala Ile Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala
 50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser
 65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Arg Ala Asp
 85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His
 100 105 110

Pro

<210> 23
 <211> 113
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

5

<220>
 <223> Мутантний альфа-ланцюг (a13kaLS)

10

<400> 23

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Leu Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Ser Ala Ser
85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His
100 105 110

Pro

- 5 <210> 24
<211> 113
<212> Білок
<213> Штучна послідовність
- 10 <220>
<223> Мутантний альфа-ланцюг (a13kaLQ)
<400> 24

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

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn
20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr
35 40 45

Ile Leu Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala
50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Ser Ala Gln

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

- <210> 25
- <211> 116
- <212> Білок
- <213> Штучна послідовність

<220>

- <223> Мутантний бета-ланцюг (b1)
- <400> 25

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met

20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35 40 45

Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr
 50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser
 65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Asp
 85 90 95

Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
 100 105 110

Leu Thr Val Thr
 115

- 5 <210> 26
- <211> 116
- <212> Білок
- <213> Штучна послідовність
- 10 <220>
- <223> Мутантний бета-ланцюг (ЫІ4)
- <400> 26

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Ala Pro Leu Ser Lys Met

20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35 40 45

Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Thr

115

- 5
- <210> 27
 - <211> 116
 - <212> Білок
 - <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Мутантний бета-ланцюг (b14L)

5 <400> 27

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Ala Pro Leu Ser Lys Met

20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35 40 45

Ser Tyr Asp Val Lys Leu Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Thr

115

10

<210> 28

<211> 116

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

5

<220>

<223> Мутантний бета-ланцюг (b21)

<400> 28

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met

20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35 40 45

Ser Arg Phe Ala Thr Gly Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50 55 60

10

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Thr

115

<210> 29

<211> 116

5 <212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

10 <223> Мутантний бета-ланцюг (b21L)

<400> 29

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1

5

10

15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Leu Asp His Glu Asn Met

20

25

30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35

40

45

Ser Arg Phe Ala Thr Gly Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50

55

60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Thr

115

5

<210> 30

<211> 5

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

10

<220>

<223> Лінкерна послідовність

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

15

<210> 31

<211> 5

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

20

<220>

<223> Лінкерна послідовність

<400> 31

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

25

<210> 32

<211> 5

<212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 5 <223> Лінкерна послідовність
 <400> 32

Gly Gly Ser Gly Gly

1 5

10
 <210> 33
 <211> 5
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 15
 <220>
 <223> Лінкерна послідовність
 <400> 33

20
 Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 34
 <211> 6
 25 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Лінкерна послідовність
 30
 <400> 34

Gly Ser Gly Gly Gly Pro

1 5

35
 <210> 35
 <211> 5
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 40
 <220>
 <223> Лінкерна послідовність
 <400> 35

Gly Gly Glu Pro Ser

1 5

45

5 <210> 36
 <211> 7
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Лінкерна послідовність

10 <400> 36
 Gly Gly Glu Gly Gly Gly Pro
 1 5

15 <210> 37
 <211> 12
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Лінкерна послідовність

20 <400> 37
 Gly Gly Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

25 <210> 38
 <211> 199
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

30 <220>
 <223> Альфа-ланцюг(а19ка)
 <400> 38

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Leu Asp Tyr Ala Ile Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Arg Ala Asp

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His
 100 105 110

Pro Tyr Ile Gln Lys Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser
 115 120 125

Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln
 130 135 140

Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys
 145 150 155 160

Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val
 165 170 175

Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn
 180 185 190

Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr
 195

- 5 <210> 39
- <211> 199
- <212> Білок
- <213> Штучна послідовність
- 10 <220>
- <223> Альфа-ланцюг (a13ka)
- <400> 39

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Met Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Ser Ala Asn

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100

105

110

Pro Tyr Ile Gln Lys Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser

115

120

125

Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln

130

135

140

Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys

145

150

155

160

Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val

165

170

175

Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn

180

185

190

Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr

195

5

<210> 40

<211> 199

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

10

<220>

<223> Альфа-ланцюг(a13kal_0)

<400> 40

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Leu Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Ser Ala Gln

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro Tyr Ile Gln Lys Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser
115 120 125

Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln
130 135 140

Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys
145 150 155 160

Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val
165 170 175

Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn
180 185 190

Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr
195

5 <210> 41
<211> 199
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Альфа-ланцюг(a13kal_8)

<400> 41

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Leu Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Ser Ala Ser

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro Tyr Ile Gln Lys Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser

115

120

125

Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln

130

135

140

Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys

145

150

155

160

Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val

165

170

175

Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn

180

185

190

Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr

195

5

<210> 42

<211> 504

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

10

<220>

<223> Бета-ланцюг (b14).

<400> 42

Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
145 150 155 160

Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn
180 185 190

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn
195 200 205

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe
225 230 235 240

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg
 260 265 270

Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Ala Pro Leu Ser
 275 280 285

Lys Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile
 290 295 300

Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu
 305 310 315 320

Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu
 325 330 335

Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser
 340 345 350

Ser Asp Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly
 355 360 365

Thr Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu
 370 375 380

Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys

385 390 395 400

Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu

405 410 415

Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr

420 425 430

Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr

435 440 445

Ala Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro

450 455 460

Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn

465 470 475 480

Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser

485 490 495

Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp

500

- 5 <210> 43
<211> 504
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

- 10 <220>
<223> Бета-панцюг(b14L).

<400> 43

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

5

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe

145 150 155 160

Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

165 170 175

Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn

180 185 190

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn

195 200 205

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

210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe

225 230 235 240

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

245 250 255

Gly Ser Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg
 260 265 270

Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Ala Pro Leu Ser
 275 280 285

Lys Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile
 290 295 300

Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Leu Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu
 305 310 315 320

Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu
 325 330 335

Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser
 340 345 350

Ser Asp Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly
 355 360 365

Thr Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu
 370 375 380

Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys

385 390 395 400

Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu

405 410 415

Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr

420 425 430

Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr

435 440 445

Ala Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro

450 455 460

Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn

465 470 475 480

Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser

485 490 495

Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp

500

5 <210> 44
<211> 504
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Бета-панцюг(b21).

<400> 44

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp

85 90 95

5

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 145 150 155 160

Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 165 170 175

Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn
 180 185 190

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn
 195 200 205

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe
225 230 235 240

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg
260 265 270

Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu
275 280 285

Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile
290 295 300

Tyr Phe Ser Arg Phe Ala Thr Gly Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu
305 310 315 320

Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu
325 330 335

Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser
340 345 350

Ser Asp Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly
 355 360 365

Thr Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu
 370 375 380

Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys
 385 390 395 400

Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu
 405 410 415

Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr
 420 425 430

Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr
 435 440 445

Ala Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro
 450 455 460

Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn
 465 470 475 480

Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser

485

490

495

Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp

500

<210> 45

<211> 504

5 <212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

10 <223> Бета-панцюг(b21L).

<400> 45

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

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr

20

25

30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
145 150 155 160

Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
165 170 175

Glu Trp Val Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn
 180 185 190

Gln Lys Phe Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn
 195 200 205

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe
 225 230 235 240

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 245 250 255

Gly Ser Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg
 260 265 270

Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Leu Asp His Glu
 275 280 285

Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile
 290 295 300

Tyr Phe Ser Arg Phe Ala Thr Gly Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu
305 310 315 320

Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu
325 330 335

Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser
340 345 350

Ser Asp Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly
355 360 365

Thr Arg Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu
370 375 380

Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys
385 390 395 400

Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu
405 410 415

Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr
420 425 430

Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr
 435 440 445

Ala Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro
 450 455 460

Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn
 465 470 475 480

Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser
 485 490 495

Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp
 500

- 5 <210> 46
- <211> 113
- <212> Білок
- <213> Штучна послідовність
- 10 <220>
- <223> Мутантний альфа-ланцюг (α36)
- <400> 46

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Met Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Ser Ala Gln

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

5 <210> 47
<211> 113
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Мутантний альфа-ланцюг (a37)
<400> 47

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Leu Thr Tyr Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Ser Ala Gln

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

5

<210> 48

<211> 113

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

10

<220>

<223> Мутантний альфа-ланцюг (α38)

<400> 48

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Leu Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

5 50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn His Ala Gln

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

<210> 49

<211> 113

10 <212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Мутантний альфа-ланцюг (α39)

<400> 49

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

5

Ile Leu Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Ser Ser Gln

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

<210> 50

<211> 113

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

10

<220>

<223> Мутантний альфа-ланцюг (а40)

<400> 50

5

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Leu Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Ser Ala Gly

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

10

<210> 51

<211> 113

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Мутантний альфа-ланцюг (а41)

<400> 51

5

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Leu Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Ser Ala Gln

85 90 95

Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

10

<210> 52

<211> 113

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Мутантний альфа-ланцюг (α30)

<400> 52

5

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Met Asp Tyr Ala Ile Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Arg Ala Asp

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

10

<210> 53

<211> 113

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

15

<220>

<223> Мутантний альфа-ланцюг (α42)

<400> 53

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Leu Thr Tyr Ala Ile Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

5

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Arg Ala Asp

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

<210> 54

<211> 113
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

5 <220>
 <223> Мутантний альфа-ланцюг (α31)
 <400> 54

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

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn
 20 25 30

10

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr
 35 40 45

Ile Leu Asp Phe Ala Ile Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala
 50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser
 65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Arg Ala Asp
 85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His
 100 105 110

Pro

<210> 55

<211> 113

<212> Білок

5 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Мутантний альфа-ланцюг (α43)

10 <400> 55

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Leu Asp Tyr Ser Ile Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Arg Ala Asp

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

15

<210> 56

<211> 113
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

5 <220>
 <223> Мутантний альфа-ланцюг (α32)

<400> 56

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Leu Asp Tyr Ala Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Arg Ala Asp

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

<210> 57

<211> 113

<212> Білок

5 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Мутантний альфа-ланцюг (α44)

10 <400> 57

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Leu Asp Tyr Ala Ile Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn His Ala Asp

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

- <210> 58
 <211> 113
 <212> Білок
 5 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Мутантний альфа-ланцюг (α33)

 10 <400> 58

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Leu Asp Tyr Ala Ile Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Arg Ser Asp

85

90

95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100

105

110

Pro

<210> 59

<211> 113

5 <212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

10 <223> Мутантний альфа-ланцюг (α45)

<400> 59

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1

5

10

15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20

25

30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35

40

45

Ile Leu Asp Tyr Ala Ile Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala
50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser
65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Arg Ala Gly
85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His
100 105 110

Pro

- 5 <210> 60
- <211> 113
- <212> Білок
- <213> Штучна послідовність
- 10 <220>
- <223> Мутантний альфа-ланцюг (α34)
- <400> 60

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Leu Asp Tyr Ala Ile Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn Arg Ala Asp

85 90 95

Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

5 <210> 61
<211> 113
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> Мутантний альфа-ланцюг (aWTka)

<400> 61

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Met Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn His Ser Gly

85 90 95

Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

5

<210> 62

<211> 113

<212> Білок

10

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Мутантний альфа-ланцюг (αM50L)

<400> 62

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Leu Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn His Ser Gly

85 90 95

Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

5

<210> 63

<211> 113

<212> Білок

10 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Мутантний альфа-ланцюг (αS95A)

<400> 63

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

5

Ile Met Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn His Ala Gly

85 90 95

Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

<210> 64

<211> 113

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

10

<220>

<223> Мутантний альфа-ланцюг (αS98L)

<400> 64

5

Ala Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asn Val Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser Asn

20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu Thr

35 40 45

Ile Met Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr Ala

50 55 60

Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala Ser

65 70 75 80

Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Asn His Ser Gly

85 90 95

Gly Leu Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His

100 105 110

Pro

10

<210> 65

<211> 116

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Мутантний бета-ланцюг (b41)

5 <400> 65

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met

20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35 40 45

Ser Arg Phe Ala Thr Gly Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Thr

115

10

<210> 66

<211> 116
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

5 <220>
 <223> Мутантний бета-ланцюг (b42)
 <400> 66

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Leu Asp His Glu Asn Met
 20 25 30

10 Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe
 35 40 45

Ser Tyr Phe Ala Thr Gly Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr
 50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser
65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Asp
85 90 95

Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
100 105 110

Leu Thr Val Thr
115

<210> 67

<211> 116

5

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Мутантний бета-ланцюг (b43)

10

<400> 67

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Leu Asp His Glu Asn Met

20

25

30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35

40

45

Ser Arg Asp Ala Thr Gly Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50

55

60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65

70

75

80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85

90

95

Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100

105

110

Leu Thr Val Thr

115

5

<210> 68

<211> 116

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

10

<220>

<223> Мутантний бета-ланцюг (b44)

<400> 68

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Leu Asp His Glu Asn Met

20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35 40 45

Ser Arg Phe Val Thr Gly Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Thr

115

5

<210> 69

<211> 116

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

10

<220>

<223> Мутантний бета-ланцюг (b45)

15

<400> 69

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Leu Asp His Glu Asn Met

20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35 40 45

Ser Arg Phe Ala Lys Gly Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Thr

115

5

<210> 70

<211> 116

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

10

<220>

<223> Мутантний бета-ланцюг (b46)

<400> 70

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Leu Asp His Glu Asn Met

20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35 40 45

Ser Arg Phe Ala Thr Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65 70 75 80

5

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Thr

115

<210> 71

<211> 116

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

10

<220>

<223> Мутантний бета-ланцюг (b32)

5 <400> 71

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Pro Leu Ser Lys Met

20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35 40 45

Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Thr

115

10

<210> 72

<211> 116

<212> Білок

15

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Мутантний бета-ланцюг (b33)

<400> 72

5

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Ala Asp Leu Ser Lys Met

20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35 40 45

Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Thr

115

10

<210> 73

<211> 116

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Мутантний бета-ланцюг (b34)

5

<400> 73

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Ala Pro His Ser Lys Met

20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35 40 45

Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Thr

115

10

<210> 74
 <211> 116
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

5

<220>
 <223> Мутантний бета-ланцюг (b35)

<400> 74

10

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Ala Pro Leu Glu Lys Met

20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35 40 45

Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100

105

110

Leu Thr Val Thr

115

<210> 75

<211> 116

5

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Мутантний бета-ланцюг (b36)

10

<400> 75

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1

5

10

15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Ala Pro Leu Ser Asn Met

20

25

30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35

40

45

Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50

55

60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65

70

75

80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85

90

95

Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100

105

110

Leu Thr Val Thr

115

<210> 76

<211> 116

5 <212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

10 <223> Мутантний бета-ланцюг (b37)

<400> 76

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1

5

10

15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Ala Pro Leu Ser Lys Met

20

25

30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35

40

45

Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Phe Asp

85 90 95

Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Thr

115

5

<210> 77

<211> 116

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

10

<220>

<223> Мутантний бета-ланцюг (b38)

<400> 77

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Ala Pro Leu Ser Lys Met

20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35 40 45

Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Leu

85 90 95

Gln Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Thr

115

5 <210> 78
<211> 116
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

10 <220>

<223> Мутантний бета-ланцюг (b39)

<400> 78

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Ala Pro Leu Ser Lys Met

20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35 40 45

5

Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Met Asn Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Thr

115

<210> 79

<211> 116

<212> Білок

10

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Мутантний бета-ланцюг (b40)

5

<400> 79

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Ala Pro Leu Ser Lys Met

20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35 40 45

Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Gln Thr Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Thr

115

10

<210> 80
 <211> 116
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

5

<220>
 <223> Мутантний бета-ланцюг (bL96D)

10

<400> 80

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met

20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe

35 40 45

Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr

50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Phe Asp

85 90 95

Met Thr Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Thr

115

15

<210> 81

<211> 116
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

5 <220>
 <223> Мутантний бета-ланцюг (bM97Q)
 <400> 81

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met
 20 25 30

10 Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe
 35 40 45

Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr
 50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser
 65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Phe Leu
 85 90 95

Gln Thr Ser Gly Asp Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100

105

110

Leu Thr Val Thr

115

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Т-клітинний рецептор (TCR), який характеризується властивістю зв'язування з комплексом GVDYDGRENTV (SEQ ID NO: 1)-HLA-A*02 і містить варіабельний домен альфа-ланцюга TCR та варіабельний домен бета-ланцюга TCR, де
 - (a) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 28;
 - 10 (b) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 25;
 - (c) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 28;
 - 15 (d) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 20; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 28;
 - 20 (e) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 26;
 - (f) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27;
 - 25 (g) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;
 - (h) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 23; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;
 - 30 (i) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 46; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;
 - 35 (j) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 47; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;
 - (k) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;
 - 40 (l) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;
 - (m) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;
 - 45 (n) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;

- [illegible]

(ii) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 76;

5 (jj) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 77;

(kk) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 78; або

10 (ll) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 79.

2. TCR за п. 1, де варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29.

3. TCR за п. 1, де варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 26.

20 4. TCR, що зв'язується з комплексом GVDGREHTV (SEQ ID NO: 1)-HLA-A*02 з афінністю більше ніж 200 μ M, де у варіабельному домені альфа-ланцюга послідовність амінокислотних залишків 27-32, 50-56 і 91-103 вибрана з наступних:

Залишки 27-32 (CDR1)	Залишки 50-56 (CDR2)	Залишки 91-103 (CDR3)
VSPFSN	MTFSENT	VVNHSGGSYIPTF
VSPFSN	MTFSENT	VVNSANGLYIPTF
VSPFSN	MTFSENT	VVNRADGLYIPTF
VSPFSN	LDYAIN	VVNHSGGSYIPTF
VSPFSN	LDYAIN	VVNRADGLYIPTF
VSPFSN	LTFSENT	VVNSASGLYIPTF
VSPFSN	LTFSENT	VVNSAQGLYIPTF

і де у варіабельному домені бета-ланцюга послідовність амінокислотних залишків 27-31, 49-54 і 92-107 вибрана з наступних:

Залишки 27-31 (CDR1)	Залишки 49-54 (CDR2)	Залишки 92-107 (CDR3)
MDHEN	SYDVKM	ASSFLMTSGDPYEQYF
MDHEN	SRFATG	ASSSDQNSGDPYEQYF
MDHEN	SYDVKM	ASSSDQNSGDPYEQYF
LDHEN	SRFATG	ASSSDQNSGDPYEQYF
APLSK	SYDVKM	ASSSDQNSGDPYEQYF
APLSK	SYDVKL	ASSSDQNSGDPYEQYF

25 5. TCR за п. 4, де послідовність амінокислотних залишків 27-32, 50-56 і 91-103 варіабельного домену альфа-ланцюга та послідовність амінокислотних залишків 27-31, 49-54 і 92-107 варіабельного домену бета-ланцюга вибрані з наступних:

Альфа-ланцюг			Бета-ланцюг		
27-32	50-56	91-103	27-31	49-54	92-107
VSPFSN	LDYAIN	VVNRADGLYIPTF	APLSK	SYDVKM	ASSSDQNSGDPYEQYF
VSPFSN	LDYAIN	VVNRADGLYIPTF	APLSK	SYDVKL	ASSSDQNSGDPYEQYF
VSPFSN	MTFSENT	VVNSANGLYIPTF	MDHEN	SRFATG	ASSSDQNSGDPYEQYF
VSPFSN	LTFSENT	VVNSAQGLYIPTF	LDHEN	SRFATG	ASSSDQNSGDPYEQYF
VSPFSN	LTFSENT	VVNSASGLYIPTF	LDHEN	SRFATG	ASSSDQNSGDPYEQYF

6. TCR за будь-яким із попередніх пунктів, який являє собою альфа-бета-гетеродимер з послідовністю константного домену альфа-ланцюга TRAC та послідовністю константного домену бета-ланцюга TRBC1 або TRBC2.

30 7. TCR за п. 6, де послідовності константних доменів альфа- і бета-ланцюгів модифіковані шляхом усичення або заміни з видаленням нативного дисульфідного зв'язку між Cys4 екзона 2 в TRAC та Cys2 екзона 2 в TRBC1 або TRBC2.

8. TCR за п. 6 або п. 7, де послідовність (послідовності) константного домену альфа- та/або бета-ланцюга модифікована шляхом заміни на цистеїнові залишки Thr48 з TRAC та Ser57 з TRBC1 або TRBC2, при цьому вказані цистеїни утворюють ненативний дисульфідний зв'язок між константними доменами альфа- та бета-ланцюгів TCR.

9. TCR за будь-яким із попередніх пунктів, який має одноланцюговий формат з типом V V α -L-V β , V β -L-V α , V α -C α -L-V β , V α -L-V β -C β , де V α та V β являють собою варіабельні ділянки α - та β -ланцюгів TCR, відповідно, C α та C β являють собою константні ділянки α - та β -ланцюгів TCR, відповідно, а L являє собою лінкерну послідовність.
- 5 10. TCR за будь-яким із попередніх пунктів, асоційований з детективною міткою, терапевтичним засобом або фрагментом, що модифікує PK.
11. TCR за п. 10, де антитіло до CD3 є ковалентно з'єднаним з C- або N-кінцем альфа- або бета-ланцюга TCR.
- 10 12. TCR за п. 11, де антитіло до CD3 є ковалентно з'єднаним з C- або N-кінцем бета-ланцюга TCR за допомогою лінкерної послідовності.
13. TCR за п. 12, де лінкерна послідовність вибрана з групи, що складається з GGGGS (SEQ ID NO: 30), GGGSG (SEQ ID NO: 31), GSGGG (SEQ ID NO: 32), GSGGG (SEQ ID NO: 33), GSGGGP (SEQ ID NO: 34), GGEPS (SEQ ID NO: 35), GGEGGGP (SEQ ID NO: 36) та GGEGGGSEGGGS (SEQ ID NO: 37).
- 15 14. Злита молекула TCR-антитіло до CD3, де
- (a) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 28;
- 20 (b) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 25;
- (c) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 28;
- 25 (d) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 20; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 28;
- (e) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 26;
- 30 (f) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27;
- (g) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;
- 35 (h) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 23; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;
- 40 (i) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 46; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;
- (j) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 47; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;
- 45 (k) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;
- (l) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;
- 50 (m) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;
- 55 (n) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 29;
- (o) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 20; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 65;
- 60

- [illegible]

- (jj) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 77;
- 5 (kk) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 78; або
- (ll) варіабельний домен альфа-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22; і варіабельний домен бета-ланцюга TCR містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 79, та
- 10 де антитіло до CD3 ковалентно з'єднане з N-кінцем або C-кінцем бета-ланцюга TCR за допомогою лінкерної послідовності, вибраної з послідовностей під SEQ ID NO: 30-37.
- 15 15. Злита молекула TCR-антитіло до CD3 за п. 14, що містить:
- (a) амінокислотну послідовність альфа-ланцюга, що відповідає SEQ ID NO: 38, та амінокислотну послідовність бета-ланцюга, що відповідає SEQ ID NO: 42;
- (b) амінокислотну послідовність альфа-ланцюга, що відповідає SEQ ID NO: 38, та амінокислотну послідовність бета-ланцюга, що відповідає SEQ ID NO: 43;
- (c) амінокислотну послідовність альфа-ланцюга, що відповідає SEQ ID NO: 39, та амінокислотну послідовність бета-ланцюга, що відповідає SEQ ID NO: 44;
- 20 (d) амінокислотну послідовність альфа-ланцюга, що відповідає SEQ ID NO: 40, та амінокислотну послідовність бета-ланцюга, що відповідає SEQ ID NO: 45; або
- (e) амінокислотну послідовність альфа-ланцюга, що відповідає SEQ ID NO: 41, та амінокислотну послідовність бета-ланцюга, що відповідає SEQ ID NO: 45.
- 25 16. Злита молекула TCR-антитіло до CD3 за п. 15, що містить амінокислотну послідовність альфа-ланцюга TCR SEQ ID NO: 40 і амінокислотну послідовність бета-ланцюга TCR SEQ ID NO: 45.
17. Злита молекула TCR-антитіло до CD3 за п. 15, що містить амінокислотну послідовність альфа-ланцюга TCR SEQ ID NO: 38 і амінокислотну послідовність бета-ланцюга TCR SEQ ID NO: 42.
- 30 18. Нуклеїнова кислота, що кодує альфа-ланцюг TCR та бета-ланцюг TCR, визначені у будь-якому із попередніх пунктів.
19. Вектор експресії, що містить нуклеїнову кислоту за п. 18.
20. Клітина, що несе:
- (a) вектор експресії за п. 19, що кодує альфа- і бета-ланцюги TCR, визначені у будь-якому із пп. 1-17, в одній відкритій рамці зчитування або в двох окремих відкритих рамках зчитування; або
- 35 (b) перший вектор експресії, який містить нуклеїнову кислоту, що кодує альфа-ланцюг TCR, визначений у будь-якому із пп. 1-17, та другий вектор експресії, який містить нуклеїнову кислоту, що кодує бета-ланцюг TCR, визначений у будь-якому із пп. 1-17.
21. Клітина, що не зустрічається у природі, та/або є очищеною, та/або сконструйованою, зокрема Т-клітина, на якій представлений TCR за будь-яким із пп. 1-13.
- 40 22. Фармацевтична композиція, що містить TCR за будь-яким із пп. 1-13, злилу молекулу TCR-антитіло до CD3 за будь-яким із пп. 14-17, нуклеїнову кислоту за п. 18 та/або клітину за п. 20 або 21 разом із одним або декількома фармацевтично прийнятними носіями або допоміжними речовинами.
23. Спосіб лікування суб'єкта-людини, що потребує цього, який включає введення вказаному суб'єкту фармацевтично ефективної дози фармацевтичної композиції за п. 22.
- 45 24. Спосіб за п. 23, який додатково включає введення окремо, у комбінації або послідовно антинеопластичного засобу.
25. Спосіб за п. 23 або 24, який **відрізняється** тим, що людина має рак або пухлину.
26. Спосіб за будь-яким із пп. 23-25, який **відрізняється** тим, що людина має пухлину, що експресує MAGE A4.
- 50 27. Спосіб за будь-яким із пп. 23-26, який **відрізняється** тим, що пухлина є солідною пухлиною.
28. Спосіб за будь-яким із пп. 23-27, який **відрізняється** тим, що людина має підтип HLA-A*02.
29. Спосіб за будь-яким із пп. 23-28, який **відрізняється** тим, що композицію вводять шляхом ін'єкції.
- 55 30. Спосіб за п. 29, який **відрізняється** тим, що композицію вводять внутрішньовенно.
31. Спосіб за п. 29, який **відрізняється** тим, що композицію вводять шляхом безпосередньої внутрішньопухлинної ін'єкції.
32. Ін'єкційний склад для введення суб'єкту-людині, що містить TCR за будь-яким із пп. 1-13 або злилу молекулу TCR-антитіло до CD3 за будь-яким із пп. 14-17.

33. Спосіб одержання TCR за будь-яким із пп. 1-13 або зливої молекули TCR-антитіло до CD3 за будь-яким із пп. 14-17, що включає а) підтримування клітини за п. 20 за умов, оптимальних для експресії ланцюгів TCR, та б) виділення ланцюгів TCR.

SEQ ID NO: 2. Амінокислотна послідовність позаклітинної ділянки нативного альфа-ланцюга. Варіабельна ділянка містить залишки 1-113. CDR підкреслені, та CDR1, 2, 3 позначені як SEQ ID NO: 8, 7 і 8 відповідно. Ділянки FR2 і FR3 виділені жирним шрифтом та позначені як SEQ ID NO: 9 і 10 відповідно. Константна ділянка показана курсивом.

KNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPFVSLTIMTFGENTKSNGRY
TATLDADTKQSSHLITASQLSDSASYICVNVHSGGSYIPTFGRGTSLIVHPYIQKPDPAVYQ
LKDSKSSDESVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDETVDNRSMDFKSNNSAVANSNKSDFAQ
ANAFNNSIIPEDTFFPSFESS

SEQ ID NO: 3. Амінокислотна послідовність позаклітинної ділянки нативного бета-ланцюга. Варіабельна ділянка містить залишки 1-116. CDR підкреслені та позначені як SEQ ID NO: 11, 12 і 13 відповідно. Ділянки FR2 і FR3 виділені жирним шрифтом та позначені як SEQ ID NO: 14 і 15 відповідно. Константна ділянка показана курсивом.

DVEVTQSSRYLVKRTGEEKVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSDVEMKEKGDIFE
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSFLMTSGDPYEQYFCFGTBLTVTEDLKNVFP
EEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYFDHVELSWVNGKEVHSGVSTDFQFLKEQFALN
DSRYCLSSRLKVSATFWQNPRNHFRCCVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTOIVSAEAWGRAD

Fig. 1

SEQ ID NO: 4. Амінокислотна послідовність позаклітинної ділянки альфа-ланцюга розчинного нативного TCR. CDR підкреслені. Константна ділянка показана курсивом, а ненативний залишок цистеїну показаний жирним шрифтом (у положенні 48 константної ділянки).

KNQVSGSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPFVSLTIMTPSENTKSNGEY
TATLDADTKQSSLNHTASQLSDSEASYICVVNHSCGSIIFTFCRGTSLIVHPYIQKPDFAVYQ
LRDSKSSDKSVCLFTDFDQGTNVSGSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFAC
ANAFNNSLIFEDTFPPSPSS

SEQ ID NO: 5. Амінокислотна послідовність позаклітинної ділянки бета-ланцюга розчинного нативного TCR. CDR підкреслені. Константна ділянка показана курсивом, а ненативний залишок цистеїну показаний жирним шрифтом (у положенні 57 константної ділянки). Додаткові ненативні амінокислоти у положенні 75 та положенні 89 константної ділянки також показані жирним шрифтом.

DVKVTQSSRYLVKRTGEEKVFLECVQDMDHENMFWRQDPGLGLELIYFSYDVKMKKXGDIPE
GYSVSRKKBRFSLILESASTNQTSMYLCASSFLMTSGDFYEQYFGPGTRLITVTEDLKNVFF
FEVAVFERPSEAEISHTQKATLVCLATGFYFDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALN
DSRYALSSRLRVSATFWQDFRNHFRCCQVQFYGLSENDEWTQDRAKFVTQIVSABAWGRAD

Fig. 2

Амінокислотні послідовності варіабельних ділянок альфа-ланцюга підданого мутації TCR. CDR підкреслені, а мутації позначені жирним шрифтом.

SEQ ID NO: 16. Мутантний альфа-ланцюг (c19y)

KNQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNVTVSFFSNLRWYKQDTGRGPFVSLTIMTFSENTESNGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNHSCGGSYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 17. Мутантний альфа-ланцюг (a7)

KNQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNVTVSFFSNLRWYKQDTGRGPFVSLTIL**LDY**AINTESENGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNHSCGGSYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 18. Мутантний альфа-ланцюг (a12)

KNQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNVTVSFFSNLRWYKQDTGRGPFVSLTIMTFSENTESNGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNH**ADGLY**IPTEFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 19. Мутантний альфа-ланцюг (a13)

KNQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNVTVSFFSNLRWYKQDTGRGPFVSLTIMTFSENTESNGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNS**ANGLY**IPTEFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 20. Мутантний альфа-ланцюг (a12ka)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNVTVSFFSNLRWYKQDTGRGPFVSLTIMTFSENTESNGRY
TATLDADTKQSELHITASQLSDSASYICVVNS**ANGLY**IPTEFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 21. Мутантний альфа-ланцюг (a19)

KNQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNVTVSFFSNLRWYKQDTGRGPFVSLTIL**LDY**AINTESENGRY
TATLDADTKQSELHITASQLSDSASYICVVNH**ADGLY**IPTEFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 22. Мутантний альфа-ланцюг (a19ka)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNVTVSFFSNLRWYKQDTGRGPFVSLTIL**LDY**AINTESENGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNH**ADGLY**IPTEFGRGTS LIVHP

Fig. 3

SEQ ID NO: 23. Мутантний альфа-панцир (a13kaLS)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLOCNVTVSPPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTKSNORY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSASGLYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 24. Мутантний альфа-панцир (a13kaLQ)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLOCNVTVSPPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTKSNORY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 46. Мутантний альфа-панцир (a36)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLOCNVTVSPPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSENTKSNORY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 47. Мутантний альфа-панцир (a37)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLOCNVTVSPPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTYSENTKSNORY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 48. Мутантний альфа-панцир (a38)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLOCNVTVSPPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTKSNORY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 49. Мутантний альфа-панцир (a39)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLOCNVTVSPPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTKSNORY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 50. Мутантний альфа-панцир (a40)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLOCNVTVSPPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTKSNORY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRGTS LIVHP

SEQ ID NO: 51. Мутантний альфа-панцир

(a41)ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLOCNVTVSPPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTESN
GRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQSSYIPTFGRGTS LIVHP

(продовження)
Фіг. 3

SEQ ID NO: 52. Мутантний альфа-панцюр (a30)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNVTVSPPFSNLRWYKQDTGEGPVSLTILMDYAINTKSNGRY
TATLDADTKQSSSLHITASQLSDSASYICVVNRADGLYIPTFGRGTSILVHP

SEQ ID NO: 53. Мутантний альфа-панцюр (a42)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNVTVSPPFSNLRWYKQDTGEGPVSLTILTYAINTKSNRGY
TATLDADTKQSSSLHITASQLSDSASYICVVNRADGLYIPTFGRGTSILVHP

SEQ ID NO: 54. Мутантний альфа-панцюр (a31)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNVTVSPPFSNLRWYKQDTGEGPVSLTILDFAINTKSNGRY
TATLDADTKQSSSLHITASQLSDSASYICVVNRADGLYIPTFGRGTSILVHP

SEQ ID NO: 55. Мутантний альфа-панцюр (a43)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNVTVSPPFSNLRWYKQDTGEGPVSLTILDYSINTKSNRGY
TATLDADTKQSSSLHITASQLSDSASYICVVNRADGLYIPTFGRGTSILVHP

SEQ ID NO: 56. Мутантний альфа-панцюр (a32)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNVTVSPPFSNLRWYKQDTGEGPVSLTILDYAENTKSNRGY
TATLDADTKQSSSLHITASQLSDSASYICVVNRADGLYIPTFGRGTSILVHP

SEQ ID NO: 57. Мутантний альфа-панцюр (a44)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNVTVSPPFSNLRWYKQDTGEGPVSLTILDYAINTKSNRGY
TATLDADTKQSSSLHITASQLSDSASYICVVNRADGLYIPTFGRGTSILVHP

SEQ ID NO: 58. Мутантний альфа-панцюр (a33)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNVTVSPPFSNLRWYKQDTGEGPVSLTILDYAINTKSNRGY
TATLDADTKQSSSLHITASQLSDSAGYICVVNRADGLYIPTFGRGTSILVHP

SEQ ID NO: 59. Мутантний альфа-панцюр (a45)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNVTVSPPFSNLRWYKQDTGEGPVSLTILDYAINTKSNRGY
TATLDADTKQSSSLHITASQLSDSASYICVVNRAGGLYIPTFGRGTSILVHP

(продовження)
Фіг. 3

SEQ ID NO: 60. Мутантний альфа-ланцюг (a34)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLCNYTVSPFNSLRWYKQDTGRGPVSLTILDYAINTKSNGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNRRADGSSYIPTFGRGTSILVHF

SEQ ID NO: 61. Мутантний альфа-ланцюг (aVTka)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLCNYTVSPFNSLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSENTKSNGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNHSCGSSYIPTFGRGTSILVHF

SEQ ID NO: 62. Мутантний альфа-ланцюг (aM56L)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLCNYTVSPFNSLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTKSNGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNHSCGSSYIPTFGRGTSILVHF

SEQ ID NO: 63. Мутантний альфа-ланцюг (aS95A)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLCNYTVSPFNSLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSENTKSNGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNHACGSSYIPTFGRGTSILVHF

SEQ ID NO: 64. Мутантний альфа-ланцюг (aS98L)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLCNYTVSPFNSLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSENTKSNGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNHSCGLYIPTFGRGTSILVHF

(продовження)

Fig. 3

Амінокислотні послідовності варіабельних ділянок бета-ланцюга підданого мутації TCR. CDR підкреслені, а мутації позначені жирним шрифтом.

SEQ ID NO: 25. Мутантний бета-ланцюг (b1)

DVKVTQSSRYLVKRTGKVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKKKGDIPE
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 26. Мутантний бета-ланцюг (b14)

DVKVTQSSRYLVKRTGKVFLECVQDAPLSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKKKGDIPE
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTELTVT

SEQ ID NO: 27. Мутантний бета-ланцюг (b14L)

DVKVTQSSRYLVKRTGKVFLECVQDAPLSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKKKGDIPE
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 28. Мутантний бета-ланцюг (b21)

DVKVTQSSRYLVKRTGKVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSSRFATGKKKKGDIPE
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTELTVT

SEQ ID NO: 29. Мутантний бета-ланцюг (b21L)

DVKVTQSSRYLVKRTGKVFLECVQDLDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSSRFATGKKKKGDIPE
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 65. Мутантний бета-ланцюг (b41)

DVKVTQSSRYLVKRTGKVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSSRFATGKKKKGDIPE
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 66. Мутантний бета-ланцюг (b42)

DVKVTQSSRYLVKRTGKVFLECVQDLDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYFATGKKKKGDIPE
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

Fig. 4

SEQ ID NO: 67. Мутантний бета-ланцюг (b43)

DVKVTQSSRYLVKRTGEEKVFLECVQDLDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRDATAGKEKGDIFE
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 68. Мутантний бета-ланцюг (b44)

DVKVTQSSRYLVKRTGEEKVFLECVQDLDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRFVTGKEKGDIFE
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 69. Мутантний бета-ланцюг (b45)

DVKVTQSSRYLVKRTGEEKVFLECVQDLDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRFAKGKEKGDIFE
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 70. Мутантний бета-ланцюг (b46)

DVKVTQSSRYLVKRTGEEKVFLECVQDLDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRFATMKEKGDIFE
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 71. Мутантний бета-ланцюг (b32)

DVKVTQSSRYLVKRTGEEKVFLECVQDPLSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMEEKGDIFE
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 72. Мутантний бета-ланцюг (b33)

DVKVTQSSRYLVKRTGEEKVFLECVQDADLSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKERGDIFE
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 73. Мутантний бета-ланцюг (b34)

DVKVTQSSRYLVKRTGEEKVFLECVQDAPHSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMEEKGDIFE
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 74. Мутантний бета-ланцюг (b35)

DVKVTQSSRYLVKRTGEEKVFLECVQDAPLSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKERGDIFE
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

(продовження)
Fig. 4

SEQ ID NO: 75. Мутантний бета-панцюр (b36)

DVKVTQSSRYLVKRTGEEKVFLECVQDAAPLSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIPF
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 76. Мутантний бета-панцюр (b37)

DVKVTQSSRYLVKRTGEEKVFLECVQDAAPLSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIPF
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSFDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 77. Мутантний бета-панцюр (b38)

DVKVTQSSRYLVKRTGEEKVFLECVQDAAPLSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIPF
GYEVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSSLQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 78. Мутантний бета-панцюр (b39)

DVKVTQSSRYLVKRTGEEKVFLECVQDAAPLSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIPF
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDMNSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 79. Мутантний бета-панцюр (b40)

DVKVTQSSRYLVKRTGEEKVFLECVQDAAPLSKMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIPF
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSSDQTSQDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 80. Мутантний бета-панцюр (bL96D)

DVKVTQSSRYLVKRTGEEKVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIPF
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSFDMTSGDPYEQYFGPGTRLTVT

SEQ ID NO: 81. Мутантний бета-панцюр (bM97Q)

DVKVTQSSRYLVKRTGEEKVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIPF
GYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSFLQTSQDPYEQYFGPGTRLTVT

(продовження)

Фіг. 4

Амінокислотні послідовності альфа-ланцюгів злитих молекул TCR- антитіло до CD3

SEQ ID NO: 38. Альфа-ланцюг (a19ka)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNYTVSPFSNLRWYEQDTGRGPVSLTILDYAINTKSNGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNRADGLYIPTFGRGTS LIVHPYIQEPDPAVYQ
LRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFAC
ANAFNNSIIPEDT

SEQ ID NO: 39. Альфа-ланцюг (a13ka)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSENTKSNGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSANGLYIPTFGRGTS LIVHPYIQEPDPAVYQ
LRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFAC
ANAFNNSIIPEDT

SEQ ID NO: 40. Альфа-ланцюг (a13kaLO)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTKSNGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRGTS LIVHPYIQEPDPAVYQ
LRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFAC
ANAFNNSIIPEDT

SEQ ID NO: 41. Альфа-ланцюг (a13kaLS)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNYTVSPFSNLRWYEQDTGRGPVSLTILTFSENTKSNGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSASGLYIPTFGRGTS LIVHPYIQEPDPAVYQ
LRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSNKSDFAC
ANAFNNSIIPEDT

Fig. 5

Амінокислотні послідовності бета-ланцюгів злитих молекул TCR-антитілом до CD3

SEQ ID NO: 42. Бета-ланцюг (b14). scFv-антитіло до CD3 показано жирним шрифтом, а лінкер показаний курсивом

AIQMTQSPSSLSASVGDEVTITCRASQDIRNYLNWYQOKPKGKAPKLLIYYTSELESQVPSRF
SGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTVEIKGGGSGGGGSGGGGSGG
GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYK
GVSTYNQKPKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYGDSWDWYFDVWGQGTLL
VTVSSGGGGSDVEVTQSSRYLVKRTGEEKVFLSCVQDAPLSKMPWYRQDPGLGLRLIYFSYDV
KMEKQDIPFGYSVEREKKERFSLILEASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGFGTRLT
VTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDP
QPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPFNHFRCCVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTDIVS
AEAWGRAD

SEQ ID NO: 43. Бета-ланцюг (b14L). scFv-антитіло до CD3 показано жирним шрифтом, а лінкер показаний курсивом

AIQMTQSPSSLSASVGDEVTITCRASQDIRNYLNWYQOKPKGKAPKLLIYYTSELESQVPSRF
SGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTVEIKGGGSGGGGSGGGGSGG
GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYK
GVSTYNQKPKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYGDSWDWYFDVWGQGTLL
VTVSSGGGGSDVKVTQSSRYLVKRTGEEKVFLSCVQDAPLSKMPWYRQDPGLGLRLIYFSYDV
KLKEKQDIPFGYSVEREKKERFSLILEASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGFGTRLT
VTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDP
QPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPFNHFRCCVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTDIVS
AEAWGRAD

Fig. 6

SEQ ID NO: 44. Бета-панцог (b21). scFv-антитіло до CD3 показано жирним шрифтом, а лінкер показаний курсивом

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQOKPKGKAPKLLIYYTSRLESQVPSRF
SGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGG
GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYK
GVSTYNQKPKDEFRTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSWDWYFDVWGQGTLL
VTVSSGGGGSDVYVTOSSRYLVKRTGKVFLECVQDMNDHENMFWRQDPGLGLRLIYFSRFA
TGKKGDIPEGYSVSREKKERFSLILEASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTGLT
VTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYEDHVELSNWVNGKEVHSGVCTDP
QPLKEQPALNDSRYALSSRLKVSATFWQDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTOIVS
AEAWGRAD

SEQ ID NO: 45. Бета-панцог (b21L). scFv-антитіло до CD3 показано жирним шрифтом, а лінкер показаний курсивом

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQOKPKGKAPKLLIYYTSRLESQVPSRF
SGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGG
GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYK
GVSTYNQKPKDEFRTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSWDWYFDVWGQGTLL
VTVSSGGGGSDVYVTOSSRYLVKRTGKVFLECVQDLDHENMFWRQDPGLGLRLIYFSRFA
TGKKGDIPEGYSVSREKKERFSLILEASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTGLT
VTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYEDHVELSNWVNGKEVHSGVCTDP
QPLKEQPALNDSRYALSSRLKVSATFWQDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTOIVS
AEAWGRAD

(продовження)

Фіг. 6

Активне та специфічне розпізнавання антигенпозитивних ракових клітин за допомогою злитих молекул I TCR для MAGE A4-антигену до CD3

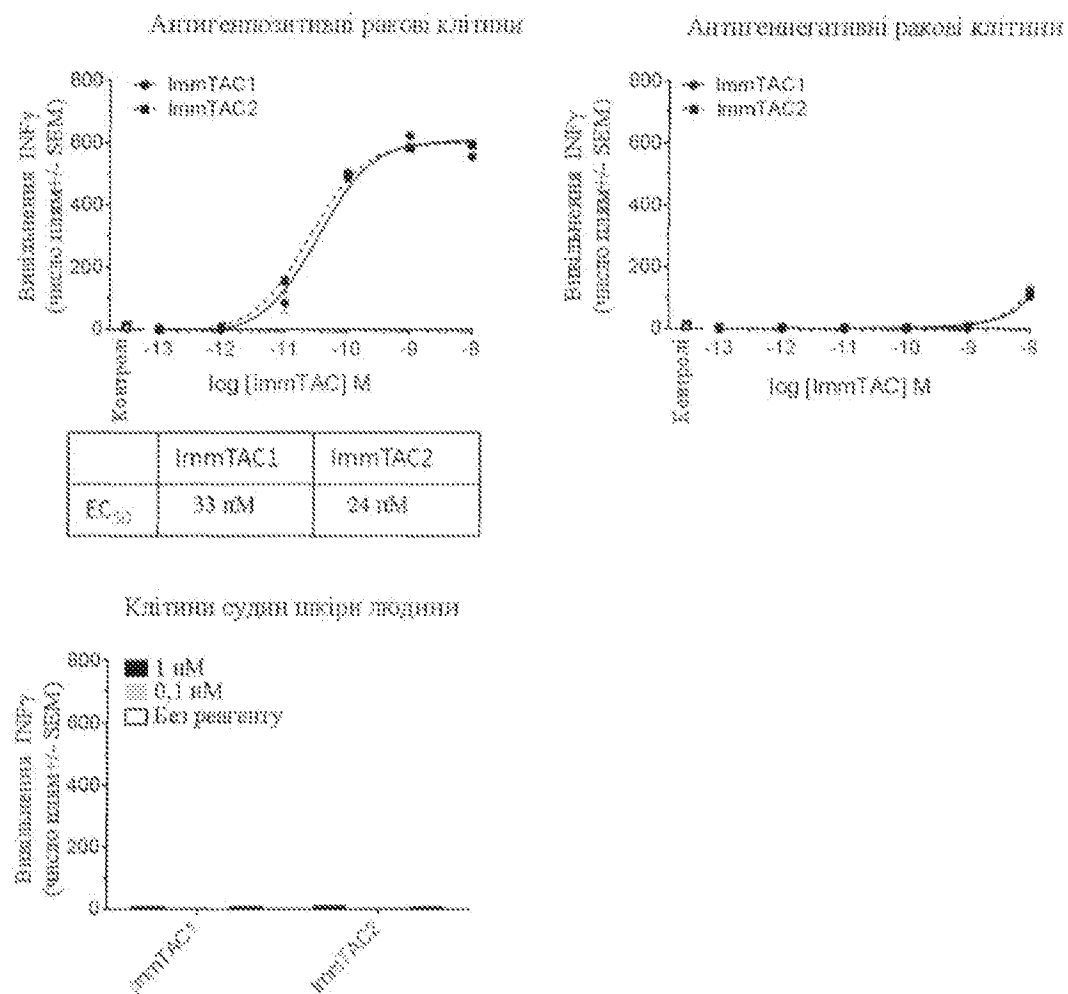


Fig. 7

Активне та специфічне розпізнавання антигенпозитивних ракових клітин злитими молекулами II TCR для MAGE A4-антитіло до CD3

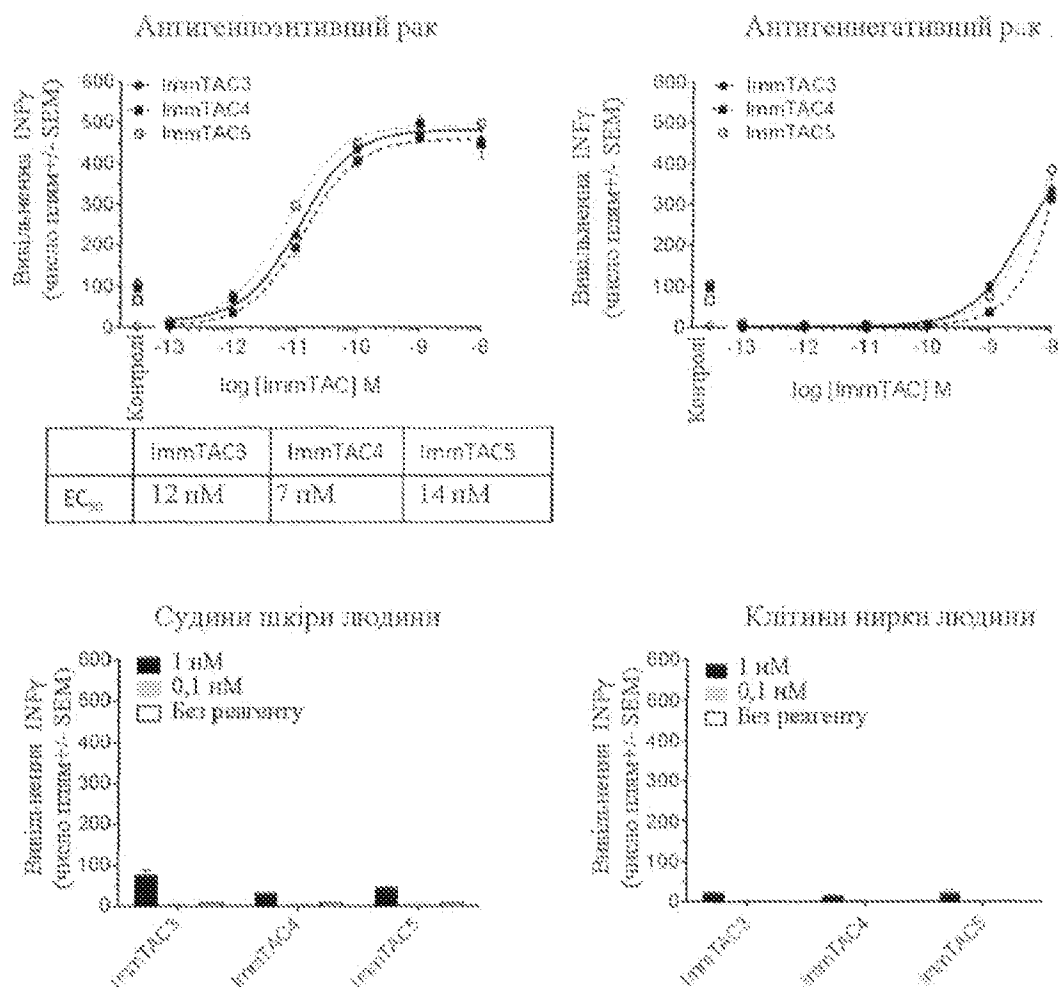
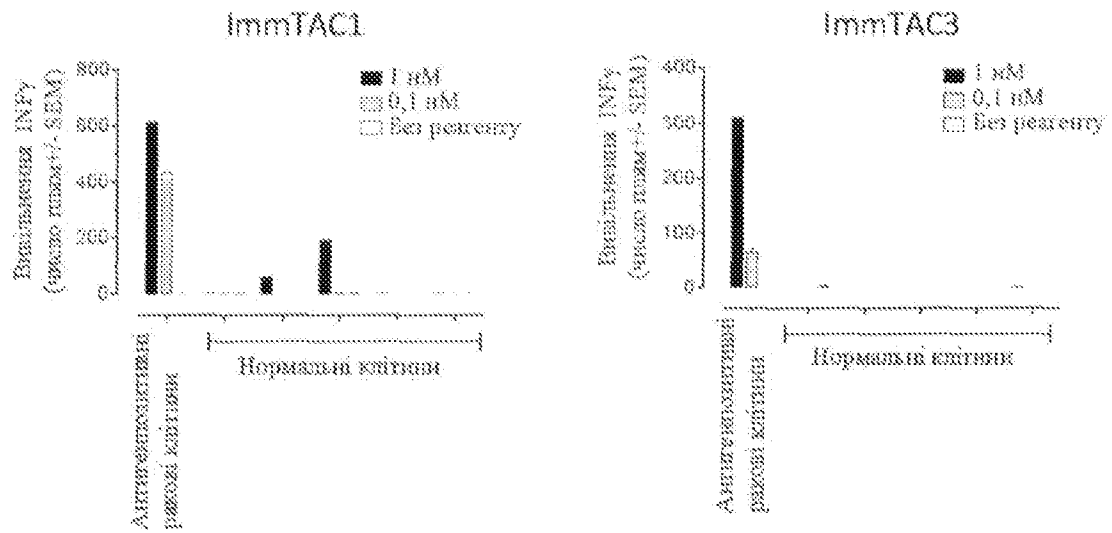


Fig. 8



Фіг. 9

Додаткові тести щодо специфічності апітих молекул II TCR для MAGE A4-антитіло до CD3

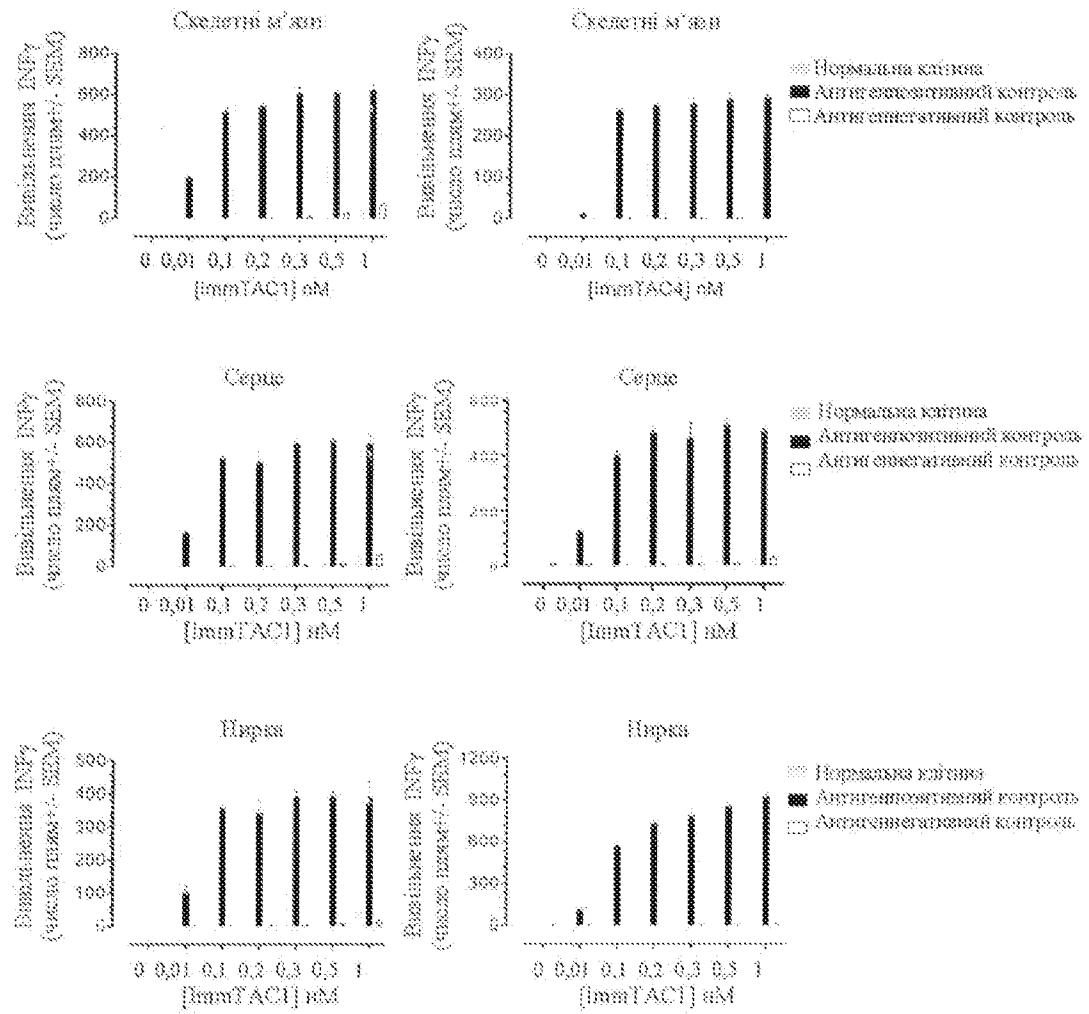
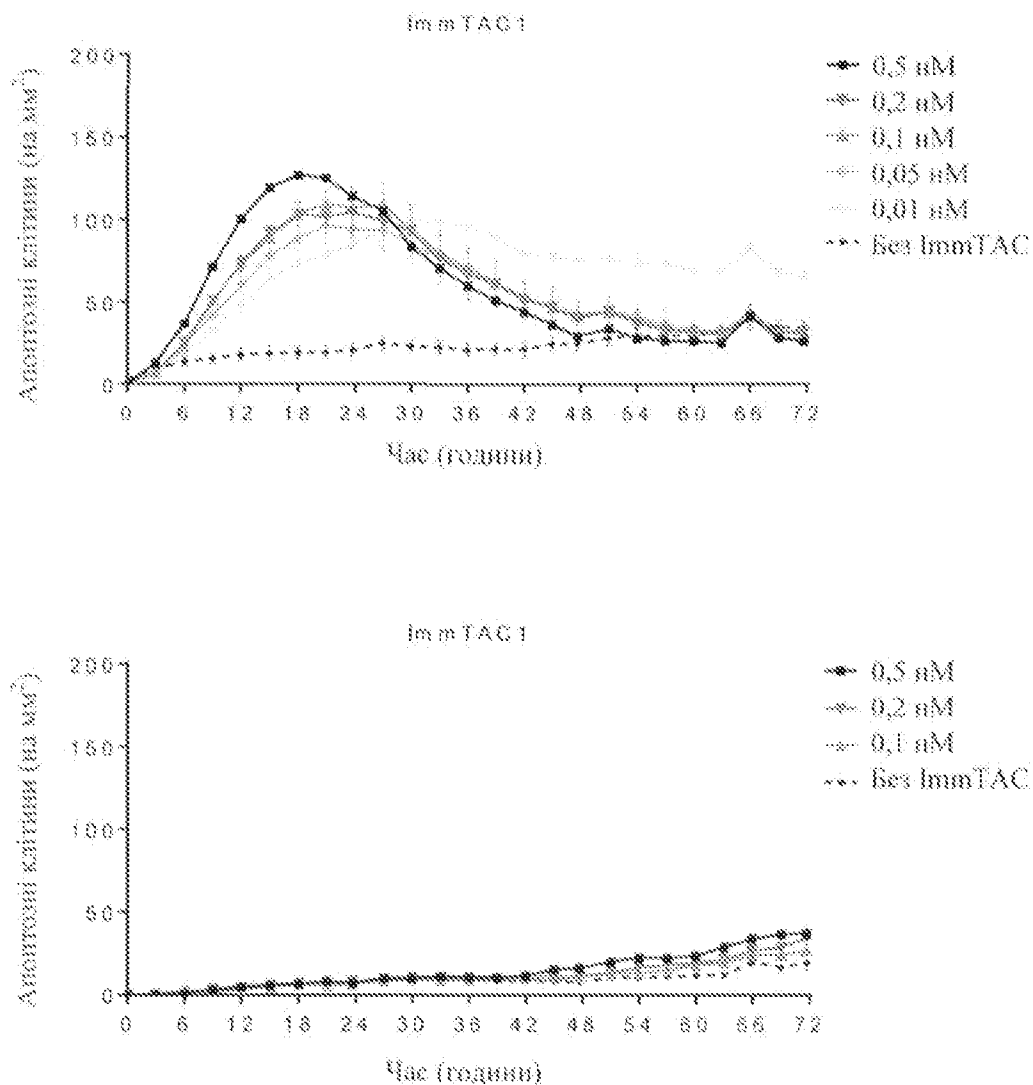


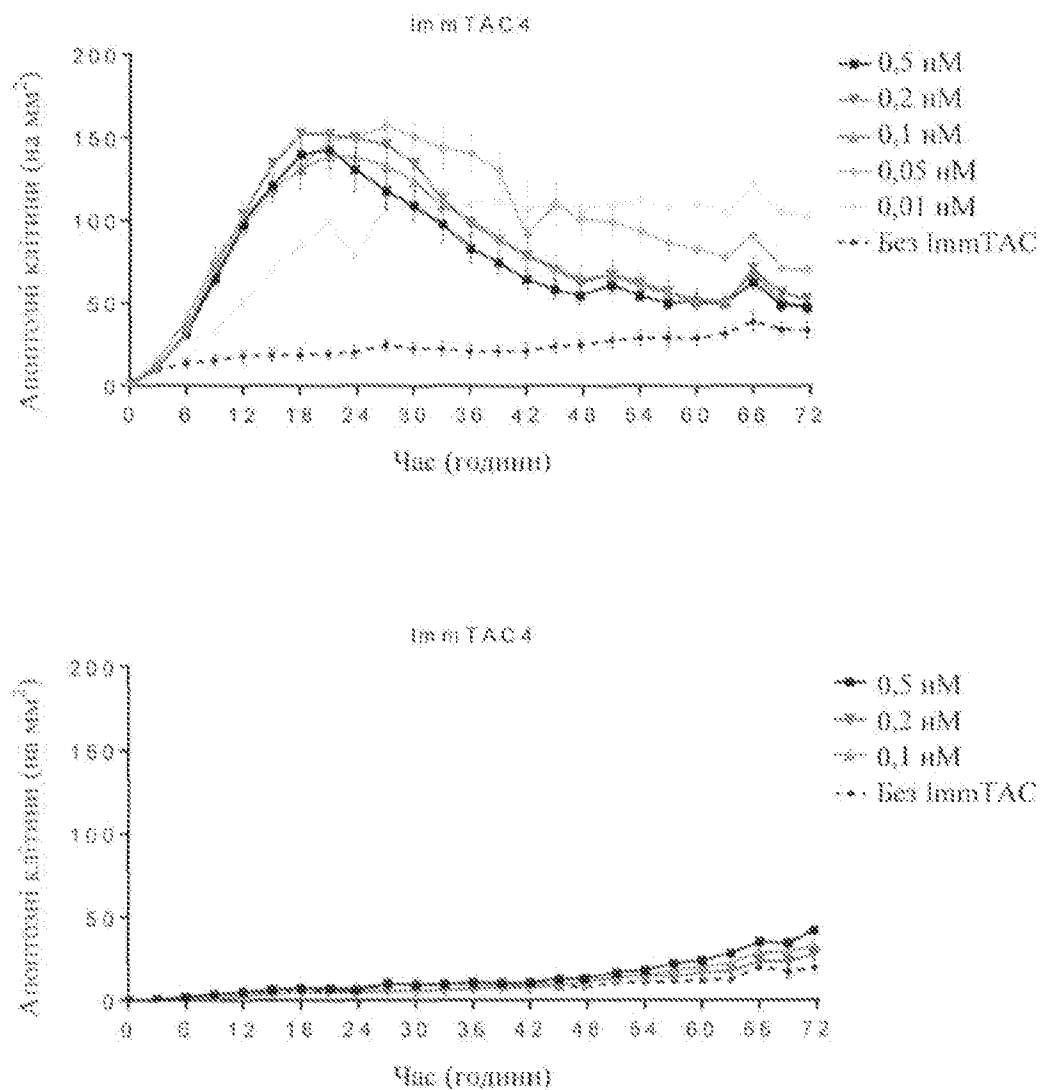
Fig. 10

Відповідь у режимі реального часу, що полягає в загибелі антигенпозитивних клітин (верхня панель) та антигеннегативних клітин (нижня панель), на дію злитих молекул TCR для MAGE A4-антитіло до CD3



Фіг. 11а

Відповідь у режимі реального часу, що полягає в загибелі антигенпозитивних клітин (верхня панель) та антигеннегативних клітин (нижня панель), на дію злитих молекул TCR для MAGE A4-антитіла до CD3



Фіг. 11b