



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 2039/5156 (2022.05); A61K 2039/5158 (2022.05); A61K 2039/625 (2022.05); A61K 38/00 (2022.05); A61K 39/0011 (2022.05); A61K 47/6898 (2022.05); C07K 1/16 (2022.05); C07K 14/36 (2022.05); C07K 16/2818 (2022.05); C07K 14/7051 (2022.05); C07K 16/2818 (2022.05); C12M 47/02 (2022.05)

(21)(22) Заявка: 2019138171, 27.04.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.04.2018Дата регистрации:
12.08.2022

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
27.04.2017 US 62/491,245

(43) Дата публикации заявки: 27.05.2021 Бюл. № 15

(45) Опубликовано: 12.08.2022 Бюл. № 23

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 27.11.2019(86) Заявка РСТ:
IB 2018/000507 (27.04.2018)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2018/197949 (01.11.2018)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ШМИДТ, Томас (DE),
ШТЕМБЕРГЕР, Кристиан (DE),
КОВСКИ, Том (US),
ПРЕНТИС, Кен (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДЖУНО ТЕРАПЬЮТИКС ГМБХ (DE)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2015158868 A2, 22.10.2015. WO
2016166568 A1, 20.10.2016. WO 2013124474 A2,
29.08.2013. LOTHAR GERMEROTH: "IBA T-
catch Cell isolation in pipette tips", INTERNET
CITATION, 23.04.2014. SKERRA A et al.
"Applications of a peptide ligand for streptavidin:
the Strep-tag", BIOMOLECULAR ENGINEER,
ELSEVIER, NEW YORK, NY, US, vol. 16, no.
1-4, (см. прод.)

(54) ОЛИГОМЕРНЫЕ РЕАГЕНТЫ В ВИДЕ ЧАСТИЦ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии. Представлены: олигомерный реагент, включая олигомерные реагенты стрептавидина или мутеина стрептавидина, где олигомерные реагенты в виде частиц содержат множество участков связывания агентов, которые мультимеризируют путем обратимого связывания с олигомерным реагентом в виде частиц, создавая таким образом мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц, имеющий

мультимеризированные на нем стимулирующие агенты, а также способ стимулирования клеток, причем способ включает инкубацию композиции клеток, содержащей клетки-мишени в присутствии мультимеризированного олигомерного реагента в виде частиц. Изобретение позволяет получить реагенты клеточной культуры с улучшенными характеристиками для стимуляции популяции клеток и дальнейшего использования в

адоптивной клеточной иммунотерапии или ил., 5 табл., 6 пр.
противораковой терапии. 4 н. и 76 з.п. ф-лы, 15

(56) (продолжение):

31.12.1999, pages 79-86. DBEL et al. "Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (scFv)", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 178, no. 2, 01.01.1995, pages 201-209.

Anonymous: "Cross-Linking Reagents Introduction to cross-linking Single-step vs. multi-step reactions", 01.01.2005. RU 2515063 C2, 10.05.2014.

R U 2 7 7 7 9 8 9 C 2

R U 2 7 7 7 9 8 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12M 1/00 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 2039/5156 (2022.05); *A61K 2039/5158* (2022.05); *A61K 2039/625* (2022.05); *A61K 38/00* (2022.05);
A61K 39/0011 (2022.05); *A61K 47/6898* (2022.05); *C07K 1/16* (2022.05); *C07K 14/36* (2022.05); *C07K*
16/2818 (2022.05); *C07K 14/7051* (2022.05); *C07K 16/2818* (2022.05); *C12M 47/02* (2022.05)

(21)(22) Application: **2019138171, 27.04.2018**(24) Effective date for property rights:
27.04.2018Registration date:
12.08.2022

Priority:

(30) Convention priority:
27.04.2017 US 62/491,245(43) Application published: **27.05.2021 Bull. № 15**(45) Date of publication: **12.08.2022 Bull. № 23**(85) Commencement of national phase: **27.11.2019**(86) PCT application:
IB 2018/000507 (27.04.2018)(87) PCT publication:
WO 2018/197949 (01.11.2018)Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**SCHMIDT, Thomas (DE),
STEMBERGER, Christian (DE),
KOWSKI, Tom (US),
PRENTICE, Ken (US)**

(73) Proprietor(s):

JUNO THERAPEUTICS GMBH (DE)(54) **OLIGOMERIC REAGENTS IN FORM OF PARTICLES AND THEIR APPLICATION METHODS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: oligomeric reagent is presented, including oligomeric reagents of streptavidin or streptavidin mutein, where oligomeric reagents in the form of particles contain a set of agent binding sites, which are multimerized by reversible binding to the oligomeric reagent in the form of particles, thus creating a multimerized oligomeric reagent in the form of particles, having stimulating agents multimerized on it. A method for stimulation of cells is also presented,

wherein the method includes incubation of a cell composition containing target cells in the presence of the multimerized oligomeric reagent in the form of particles.

EFFECT: invention allows for the production of reagents of a cell culture with improved characteristics for the stimulation of a cell population and further use in adoptive cell immunotherapy or anticancer therapy.

80 cl, 15 dwg, 5 tbl, 6 ex

C 2
6 8 9
6 7 7
2 7 7 9 8 9
R UR U
2 7 7 7 9 8 9
C 2

Ссылка на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США 62/491245, озаглавленной «OLIGOMERIC PARTICLE REAGENTS AND METHODS OF USE THEREOF» поданной 27 апреля 2017 года, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Включение списка последовательностей посредством ссылки

Настоящая заявка подана наряду со Списком последовательностей в электронном формате. Список последовательностей предоставлен в виде файла, озаглавленного 735042008540SeqList.TXT, созданного 26 апреля 2018 года, размер которого составляет 110426 битов. Информации списка последовательностей в электронном формате полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

В настоящем раскрытии представлены олигомерные реагенты, включая олигомерные реагенты стрептавидина или мутеина стрептавидина, и их композиции и способы получения олигомерных реагентов, включая способы надежного получения олигомерных реагентов в виде частиц нужного размера. В некоторых случаях реагенты представляют собой олигомерные реагенты в виде частиц, содержащие множество участков связывания агентов, и таким образом один или более агентов, например, один или более селективных агентов или стимулирующих реагентов, мультимеризируют путем обратимого связывания с олигомерным реагентом в виде частиц, например, создавая таким образом мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц, имеющий мультимеризированные на нем стимулирующие или селективные агенты. В настоящем раскрытии также представлены способы применения олигомерных реагентов для инкубации или культивирования, например, для стимуляции размножения (пролиферации), активации, костимуляции и/или выживания, композиции клеток, такой как популяция лимфоцитов. В некоторых аспектах в раскрытии представлены способы и реагенты для стимуляции, например, размножения (пролиферации), выживания или персистенции, активации, костимуляции или другого действия (например, аффинной селекции) популяций клеток, которые включают связывание агентов с молекулой на поверхности клеток, таким образом предоставляя в клетки один или более сигналов.

Уровень техники

Существуют разные стратегии стимуляции популяций Т клеток *in vitro*, в том числе для размножения антиген-специфических Т клеток *in vitro* для использования в адоптивной клеточной иммунотерапии или противораковой терапии, в которых было показано, что инфузии таких Т-клеток обладают противоопухолевой активностью у опухоленесущего реципиента или для использования для лечения вирусных инфекций. Для размножения популяций клеток *in vitro*, в том числе для исследовательских, диагностических и терапевтических целей, необходимы улучшенные стратегии.

Сущность Изобретения

В данном документе представлены олигомерные реагенты в виде частиц, содержащие множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина, при этом размер олигомерного реагента в виде частиц представляет собой i) радиус, например, гидродинамический радиус больше чем 25 нм, ii) молекулярную массу по меньшей мере 5×10^6 г/моль; и/или (iii) по меньшей мере 100 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина на олигомерный реагент в виде частиц.

В конкретных вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, молекулы стрептавидина или мутеина

стрептавидина связываются или способны связываться с биотином, аналогом биотина (например, дестиобиотином, иминобиотином) или со стрептавидин-связывающим пептидом (например, Strep-tagII (WSHPQFEK, SEQ ID NO:8)). В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина обратимо связываются или способны обратимо связываться с биотином, аналогом биотина или со стрептавидин-связывающим пептидом (например, Strep-tagII (WSHPQFEK, SEQ ID NO:8)). В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, олигомерный реагент в виде частиц содержит множество молекул мутеина стрептавидина, при этом молекулы мутеина стрептавидина содержат аминокислотную последовательность Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ или Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ в позициях последовательности, соответствующих позициям 44-47 со ссылкой на позиции в стрептавидине в последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 1.

В конкретных вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина связываются или способны связываться с биотином, авидином, аналогом или мутеином биотина, аналогом или мутеином авидина и/или их биологически активным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина обратимо связываются или способны обратимо связываться с биотином, авидином, аналогом или мутеином биотина, аналогом или мутеином авидина и/или их биологически активным фрагментом. В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, олигомерный реагент в виде частиц содержит множество молекул мутеина стрептавидина, при этом молекулы мутеина стрептавидина содержат аминокислотную последовательность Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ или Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ в позициях последовательности, соответствующих позициям 44-47 со ссылкой на позиции в стрептавидине в последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 1.

В конкретных вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, олигомерный реагент в виде частиц содержит множество молекул мутеина стрептавидина, которые содержат: а) последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 3-6, 27, 28, 60 или 61; б) последовательность аминокислот, которые демонстрируют по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с любой SEQ ID NO: 3-6, 27, 28, 60 или 61 и содержат аминокислотную последовательность, соответствующую Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ или Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷, и/или обратимо связываются с биотином, аналогом биотина или стрептавидин-связывающим пептидом; и/или последовательность аминокислот, которые демонстрируют по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с любой SEQ ID NO: 3-6, 27, 28, 60 или 61 и содержат аминокислотную последовательность, соответствующую Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ или Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷, и/или связывается с биотином или его биологически активной формой, аналогом или мутеином биотина или их биологически активным фрагментом или стрептавидин-связывающим пептидом, функциональный фрагмент а) или б), который

связывается с биотином или его биологически активной формой, аналогом или мутеином биотина или их биологически активным фрагментом или стрептавидин-связывающим пептидом и/или обратимо связываются с биотином, аналогом биотина или стрептавидин-связывающим пептидом; или с) функциональный фрагмент а) или б), который

5 связывается с биотином, аналогом биотина или стрептавидин-связывающим пептидом. В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, олигомерный реагент в виде частиц содержит множество молекул мутеина стрептавицина, которые содержат последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 6 или 61. В некоторых вариантах

10 осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, молекула мутеина стрептавицина дополнительно содержит аминокислотную замену или замены в позиции, соответствующей 117, 120 и/или 121 со ссылкой на позиции в стрептавидине в последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 1.

15 В конкретных вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе: аминокислотную замену или замены выбирают из Glu117, Asp117, Arg117, Ser120, Ala120, Gly120, Trp121, Tyr121 или Phe121; или аминокислотную замену или замены выбирают из одного или более из Glu117, Gly120 или Tyr121; или аминокислотные замены выбирают из Glu117, Gly120 или Tyr121.

20 В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, олигомерный реагент в виде частиц содержит множество молекул мутеина стрептавицина, которые содержат: а) последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 27 или 28; б) последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%,

25 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 28 и содержит аминокислотную последовательность, соответствующую Val⁴⁴, Thr⁴⁵, Ala⁴⁶, Arg⁴⁷, Glu¹¹⁷, Gly¹²⁰ и Tyr¹²¹, и/или связывается с биотином или биологически активным фрагментом, аналогом или мутеином биотина или их биологически активным

30 фрагментом или стрептавидин-связывающим пептидом; или с) функциональный фрагмент а) или б), который связывается с биотином или биологически активным фрагментом, аналогом или мутеином биотина или их биологически активным фрагментом или стрептавидин-связывающим пептидом.

В конкретных вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде

35 частиц, представленных в данном документе: аминокислотную замену или замены выбирают из Glu117, Asp117, Arg117, Ser120, Ala120, Gly120, Trp121, Tyr121 или Phe121; или аминокислотную замену или замены выбирают из одного или более из Glu117, Gly120 или Tyr121; или аминокислотные замены выбирают из Glu117, Gly120 или Tyr121.

40 В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, олигомерный реагент в виде частиц содержит множество молекул мутеина стрептавицина, которые содержат: а) последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 27 или 28; б) последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ

45 ID NO: 28 и содержит аминокислотную последовательность, соответствующую Val⁴⁴, Thr⁴⁵, Ala⁴⁶, Arg⁴⁷, Glu¹¹⁷, Gly¹²⁰ и Tyr¹²¹ и/или обратимо связывается с биотином, аналогом биотина или стрептавидин-связывающим пептидом; или с) функциональный фрагмент а) или б), который обратимо связывается с биотином, аналогом биотина или

стрептавидин-связывающим пептидом.

В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, олигомерный реагент в виде частиц связан или способен связываться с одним или более агентами посредством партнера по связыванию, причем один или более агентов содержат партнера по связыванию, такой как биотин, аналог биотина или стрептавидин-связывающий пептид. В конкретных вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, один или более агентов содержат партнера по связыванию, при этом партнер по связыванию способен связываться с одним или более участком связывания на олигомерном реагенте в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, партнер по связыванию содержит стрептавидин-связывающий пептид или биотин или аналог биотина. В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, партнер по связыванию содержит стрептавидин-связывающий пептид, выбираемый из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19). В конкретных вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, один или более агентов связывается или способен дополнительно связываться с молекулой, экспрессированной на поверхности клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, один или более агентов содержит антитело, необязательно Fab или нанотело®, например, однодоменное антитело (sdAb).

В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, один или более агентов представляет собой рецептор-связывающий агент, который связывается или способен связываться с рецептором, экспрессированным на поверхности клетки-мишени. В конкретных вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент представляет собой или содержит стимулирующий агент, способный связываться с молекулой на поверхности клетки-мишени, таким образом индуцируя или модулируя сигнал в клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент способен инициировать связанный с комплексом TCR/CD3 сигнал в Т-клетках, связывается с элементом комплекса TCR/CD3; и/или специфически связывается с CD3. В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, стимулирующий агент представляет собой первый рецептор-связывающий агент, а олигомерный реагент в виде частиц содержит второй рецептор-связывающий агент, при этом второй рецептор-связывающий агент способен специфически связываться со второй молекулой на поверхности клетки-мишени, причем это связывание со второй молекулой необязательно способно индуцировать или модулировать сигнал в клетках-мишенях.

В конкретных вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, второй рецептор-связывающий агент

специфически связывается с костимулирующей молекулой, вспомогательной молекулой, молекулой иммунной контрольной точки, представляет собой член семейства TNF или рецептор семейства TNF, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор или представляет собой или содержит молекулу адгезии или фактор, который вызывает
5 выработку цитокина, выработку хемокина и/или экспрессию молекулы адгезии. В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент специфически связывается с костимулирующей молекулой, вспомогательной молекулой, молекулой иммунной контрольной точки, представляет собой член семейства TNF или рецептор
10 семейства TNF, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор или представляет собой или содержит молекулу адгезии или фактор, который вызывает выработку цитокина, выработку хемокина и/или экспрессию молекулы адгезии.

В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент (второй
15 рецептор-связывающий агент) связывается с костимулирующей или вспомогательной молекулой, а костимулирующую или вспомогательную молекулу выбирают из CD28, CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 или HVEM. В конкретных вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент
20 (второй рецептор-связывающий агент) специфически связывается с цитокиновым рецептором, а цитокиновый рецептор выбирают из IL-2R, IL-1R, IL-15R, IFN-гаммаR, TNF-альфаR, IL-4R, IL-10R, IFNR I типа, IL-12R, IL-15R, IL-17R, TNFR1 и TNFR2. В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент (второй рецептор-
25 связывающий агент) специфически связывается с хемокиновым рецептором, а хемокиновый рецептор выбирают из CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR9, CXCR1, CXCR3 и CXCR4.

В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент (второй
30 рецептор-связывающий агент) представляет собой фактор, который вызывает выработку цитокина или хемокина, а фактор представляет собой лиганд, который специфически связывается с рецептором цитокина или хемокина.

В конкретных вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент (второй
35 рецептор-связывающий агент) представляет собой лиганд, который специфически связывается с цитокиновым рецептором, при этом лиганд специфически связывает IL-2R, IL-1R, IL-15R, IFN-гаммаR, TNF-альфаR, IL-4R, IL-10R, IFNR I типа, IL-12R, IL-15R, IL-17R, TNFR1 и TNFR2; и/или лиганд выбирают из IL-2, IL-1, IL-15, IFN-гамма, TNF-альфа, IL-4, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17 и TNF, или он представляет собой их биологически
40 активный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент (второй
рецептор-связывающий агент) представляет собой лиганд, который специфически
связывается с хемокиновым рецептором, при этом лиганд специфически связывается с
45 хемокиновым рецептором, выбираемым из CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR9, CXCR1, CXCR3 и CXCR4; или лиганд выбирают из CXCL9, CXCL10, CCL19, CCL21 и CCL25, или он представляет собой их биологически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц,

представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой молекулу адгезии, и молекулу адгезии выбирают из CD44, CD31, CD18/CD11a (LFA-1), CD29, CD54 (ICAM-1), CD62L (L-селектина) и CD29/CD49d (VLA-4), CD106 (VCAM-1), или она представляет собой их биологически активный

5 фрагмент.

В конкретных вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, один или более агентов представляет собой селективный агент, при этом селективный агент связывается или способен связываться с селективным маркером, который экспрессируется на поверхности клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, клеткой-мишенью является иммунная клетка. В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, клетка-мишень представляет собой лимфоцит или антигенпредставляющую клетку. В конкретных вариантах осуществления

10 любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, клетка-мишень представляет собой Т-клетку, В-клетку, НК-клетку, макрофаг или дендритную клетку. В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, клетка-мишень представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления любого из

15 олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, селективным маркером является CD25, CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO.

В конкретных вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, олигомерный реагент в виде частиц имеет

25 радиус больше чем 25 нм, больше чем 50 нм, больше чем 60 нм, больше чем 70 нм, больше чем 80 нм или больше чем 90 нм. В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, олигомерный реагент в виде частиц имеет радиус между 25 нм и 150 нм, между 50 нм и 150 нм, между 75 нм и 125 нм, между 80 нм и 115 нм или между 90 нм и 110 нм,

30 включительно, или $90 \text{ нм} \pm 15 \text{ нм}$ или $95 \text{ нм} \pm 20\text{-}25 \text{ нм}$. В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, олигомерный реагент в виде частиц имеет радиус менее чем 150 нм. В конкретных вариантах осуществления, радиус представляет собой гидродинамический радиус.

В конкретных вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, олигомерный реагент в виде частиц имеет молекулярную массу по меньшей мере 1×10^7 г/моль, по меньшей мере 5×10^7 г/моль или по меньшей мере 1×10^8 г/моль. В некоторых вариантах осуществления любого из

40 олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, олигомерный реагент в виде частиц имеет молекулярную массу между 1×10^6 г/моль и 1×10^{10} г/моль, между 1×10^7 г/моль и 1×10^9 г/моль, между 5×10^7 г/моль и 5×10^8 г/моль, между 1×10^8 г/моль и 5×10^8 г/моль или между 1×10^8 г/моль и 2×10^8 г/моль. В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц,

45 представленных в данном документе, олигомерный реагент в виде частиц содержит по меньшей мере 100 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, по меньшей мере 500 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, по меньшей мере 1000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, по меньшей мере 1500 тетрамеров

стрептавидина или мутеина стрептавидина или по меньшей мере 2000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина.

В конкретных вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в данном документе, олигомерный реагент в виде частиц
5 содержит между 100 и 50000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, между 1000 и 20000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, между 1000 и 10000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина или между 2000 и 5000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления любого из олигомерных реагентов в виде частиц, представленных в
10 данном документе, множество молекул стрептавидина или мутеинов стрептавидина содержат лизиновые остатки, при этом менее чем 20%, 10%, 5%, 1% лизиновых остатков содержат N-замещенный иминотиолан.

В данном документе представлена композиция, содержащая один или более олигомерных реагентов в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления любой
15 из композиций, представленных в данном документе, один или более олигомерных реагентов в виде частиц представляет собой множество олигомерных реагентов в виде частиц. В конкретных вариантах осуществления любой из композиций, представленных в данном документе, множество олигомерных реагентов в виде частиц имеют i) средний
20 радиус больше чем 70 нм; ii) среднюю молекулярную массу по меньшей мере 1×10^8 г/моль; и/или iii) среднее количество стрептавидина или тетрамеров стрептавидина на олигомерный реагент в виде частиц по меньшей мере 2000 и/или iv) распределение размеров радиуса, в котором по меньшей мере 95% множества олигомерных реагентов в виде частиц имеют радиус между 10 нм и 150 нм. В некоторых вариантах осуществления
25 распределение размеров радиуса представляет собой гидродинамическое распределение размеров радиуса.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, представленных в данном документе, множество олигомерных реагентов в виде частиц имеют средний радиус больше чем 25 нм, больше чем 50 нм, больше чем 60 нм, больше чем 70 нм,
30 больше чем 80 нм, больше чем 90 нм или больше чем 100 нм. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, представленных в данном документе, множество олигомерных реагентов в виде частиц имеют средний радиус между 25 нм и 150 нм, между 50 нм и 150 нм, между 75 нм и 125 нм, между 80 нм и 110 нм или между 90 нм и 110 нм, включительно, или $90 \text{ нм} \pm 15 \text{ нм}$ или $95 \text{ нм} \pm 20\text{-}25 \text{ нм}$. В конкретных вариантах осуществления любой из композиций, представленных в данном документе, по меньшей
35 мере 95% множества олигомерных реагентов в виде частиц имеют радиус между 50 и 150 нм, между 70 нм и 140 нм, между 80 нм и 120 нм, между 80 нм и 115 нм, между 80 нм и 100 нм, между 90 нм и 110 нм и/или между 100 нм и 120 нм.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, представленных в данном документе, по меньшей мере 95% олигомерных реагентов в виде частиц имеют
40 радиус в пределах $\pm 50\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$ и/или $\pm 5\%$ среднего и/или медианного радиуса множества олигомерных реагентов в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, представленных в данном документе, множество олигомерных реагентов в виде частиц имеют средний радиус между 80 нм
45 и 115 нм, и, при этом по меньшей мере 95% олигомерных реагентов в виде частиц имеют радиус в пределах $\pm 25\%$ среднего радиуса. В конкретных вариантах осуществления любой из композиций, представленных в данном документе, множество частиц имеют среднюю молекулярную массу между 1×10^8 г/моль и 5×10^8 г/моль или между 1×10^8 г/

моль и 2×10^8 г/моль, включительно.

В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, представленных в данном документе, множество олигомерных реагентов в виде частиц содержит среднее количество стрептавидина или тетрамеров стрептавидина на олигомерный реагент в виде частиц по меньшей мере 100, по меньшей мере 500, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 1500 или по меньшей мере 2000. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, представленных в данном документе, множество олигомерных реагентов в виде частиц содержит среднее количество стрептавидина или тетрамеров стрептавидина на олигомерный реагент в виде частиц между 100 и 50000, между 1000 и 20000, между 1000 и 10000 или между 2000 и 5000, всегда включительно.

В конкретных вариантах осуществления любой из композиций, представленных в данном документе, средний радиус множества олигомерных частиц не увеличивается больше чем на 25% при хранении приблизительно при или ниже -80°C , приблизительно при или ниже -20°C и/или приблизительно при или ниже 4°C в течение по меньшей мере 1 недели. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, представленных в данном документе, средний радиус множества олигомерных частиц не увеличивается больше чем на 10% при хранении приблизительно при или ниже 4°C в течение по меньшей мере одной недели. В некоторых вариантах осуществления любой из композиций, представленных в данном документе, средний радиус множества олигомерных частиц не увеличивается больше чем на 10% при хранении приблизительно при или ниже 4°C в течение по меньшей мере 3 недель. В конкретных вариантах осуществления любой из композиций, представленных в данном документе, средний радиус множества олигомерных частиц не увеличивается больше чем на 10% при хранении приблизительно при или ниже 4°C в течение по меньшей мере 9 недель, по меньшей мере 27 недель или по меньшей мере 46 недель. В конкретных вариантах осуществления средний радиус множества олигомерных частиц не увеличивается больше чем на 10% при хранении приблизительно при или ниже -20°C , -30°C , -40°C , -50°C , -60°C , -70°C или -80°C в течение по меньшей мере 1 недели, 3 недель, 9 недель, 27 недель или 46 недель.

В данном документе представлены способы получения олигомерного реагента в виде частиц, содержащего стрептавидин или мутеин стрептавидина, причем способ включает: инкубацию множества активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина, содержащих тиол-реактивную функциональную группу, способную реагировать с тиоловой функциональной группой, и множество тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина, содержащих одну или более тиоловую функциональную группу, с созданием таким образом олигомерных частиц стрептавидина или мутеина стрептавидина; отделение олигомерных частиц от мономерных и/или меньших олигомерных молекул; и введение олигомерных частиц в контакт со стабилизирующим агентом, получая таким образом олигомерный реагент в виде частиц.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, множество активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина создают путем инкубации первого множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с активирующим агентом, который способен преобразовывать один или более аминов в тиол-реактивную функциональную группу. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, множество тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина создают путем инкубации второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с тиолирующим агентом, который добавляет или способен

добавлять тиоловую функциональную группу к одному или более лизиновому остатку.

Также в данном документе представлена способ получения олигомерных реагентов в виде частиц, причем способ включает: (а) инкубацию первого множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с активирующим агентом в условиях для преобразования одного или более аминов в тиол-реактивную группу, способную реагировать с тиоловой функциональной группой, с созданием таким образом множества активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина; (b) инкубацию второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с тиолирующим агентом, который добавляет или способен добавлять тиоловую функциональную группу к одному или более лизиновому остатку, с созданием таким образом множества тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина; и (с) инкубацию множества активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с множеством тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с получением таким образом композиции частиц, содержащей олигомерные реагенты в виде частиц; при этом способ осуществляют в условиях, в которых во время начала инкубации в (с) множество тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина таковы, что в среднем по меньшей мере 60% лизинов содержат тиоловую функциональную группу, и/или в среднем по меньшей мере 10 лизинов на тиолированный тетрамер стрептавидина или мутеина стрептавидина содержат тиоловую функциональную группу.

Некоторые варианты осуществления дополнительно включают в себя отделение олигомерных реагентов в виде частиц от мономерных и/или меньших олигомерных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, инкубацию первого множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с активирующим агентом проводят при молярном отношении стрептавидина или мутеина стрептавидина к активирующему реагенту между 1:1 и 1:10. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, инкубацию первого множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с активирующим агентом проводят при молярном отношении стрептавидина или мутеина стрептавидина к активирующему реагенту $1:2 \pm 2\%$. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, активирующий агент содержит гетеробифункциональное сшивающее средство. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, активирующий агент содержит сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо SMCC) и/или сукцинимидил-6-[(β -малеимидопропионамидо)гексаноат (SMPH). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, тиол-реактивная функциональная группа представляет собой галоацетильную группу, малеимидную группу, азиридиновую группу, акрилоиловую группу, арилирующий агент, винилсульфоновую группу, пиридилдисульфид, TNB-тиол или дисульфидный восстанавливающий агент. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, тиол-реактивная функциональная группа представляет собой малеимидную группу. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, первое множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и активирующий агент инкубируют при нейтральном pH.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, первое множество молекул стрептавидина или мутеина

стрептавидина и активирующий агент инкубируют при рН между 6,8 и 7,5. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, первое множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и активирующий агент инкубируют при рН между 7,0 и 7,4, необязательно при или приблизительно при 7,2. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, первое множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и активирующий агент инкубируют при температуре между 4°C и 39°C. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, первое множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и активирующий агент инкубируют при комнатной температуре, необязательно между 20°C и 25°C, необязательно при приблизительно 23°C или приблизительно 24°C.

В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, первое множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и активирующий агент инкубируют в течение от 15 минут до 6 часов или от 30 минут до 2 часов, всегда включительно. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, первое множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и активирующий агент инкубируют в течение от 45 минут до 1,5 часов, включительно, необязательно в течение или приблизительно в течение 1 часа.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, инкубацию второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с тиолирующим агентом проводят при молярном отношении тиолирующего реагента к каждому первичному амину между 10:1 и 1:1, включительно, на молекулу стрептавидина или мутеина стрептавидина. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, инкубацию второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с тиолирующим агентом проводят при молярном отношении стрептавидина или мутеина стрептавидина к тиолирующему агенту между 1:50 и 1:500, включительно. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, инкубацию второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с тиолирующим агентом проводят при молярном отношении стрептавидина или мутеина стрептавидина к активирующему реагенту, составляющем или приблизительно 1:100. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, тиолирующий агент представляет собой или содержит 2-иминотиолан.

В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, второе множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолирующего агента инкубируют при рН 7,0 или более, необязательно между 7,0 и 8,0, включительно. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, второе множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолирующего агента инкубируют при рН приблизительно 7,7. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, инкубацию второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолирующего агента начинают в присутствии буфера с рН 8,0 или более, необязательно между 8,0 и 9,0, включительно. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, инкубацию второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолирующего агента начинают в присутствии буфера с рН или приблизительно 8,5. В некоторых вариантах осуществления любого из способов,

представленных в данном документе, буфер содержит борат. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, буфер содержит 10 мМ-200 мМ бората или 50 мМ-100 мМ борат, всегда включительно, необязательно приблизительно 100 мМ бората.

5 В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, второе множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолирующего агента инкубируют при температуре между 4°C и 39°C. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, второе множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолирующего агента инкубируют при комнатной температуре, необязательно между 10 20°C и 25°C, необязательно при или приблизительно при 23°C или при или приблизительно при 24°C. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, второе множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолирующего агента инкубируют в течение от 15 минут до 15 2 часов или от 15 минут до 1,5 часов. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, второе множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолирующего агента инкубируют в течение от 15 минут до 2 часов или от 25 минут до 1 часа, всегда включительно. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, второе множество молекул стрептавидина и тиолирующего агента инкубируют в течение или приблизительно в течение 1 часа.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, второе множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолирующего агента инкубируют в течение или приблизительно в 25 25 минут. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, молярное отношение множества активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина к множеству тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина в процессе инкубации составляет X:1, при этом X представляет собой количество лизиновых остатков, доступных для 30 тиолирования, на молекулу стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, молярное отношение составляет от 1:1 до 8:1 или от 2:1 до 6:1, необязательно при или приблизительно при 4:1. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение составляет от 1:1 до 1:8 или от 1:2 до 1:6, необязательно равно или приблизительно 35 равно 1:4.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, множество активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и множество тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина инкубируют при pH между 6,8 и 7,5, включительно. В конкретных 40 вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, множество активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и множество тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина инкубируют при pH между 7,0 и 7,4, включительно. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, множество активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и множество тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина инкубируют при pH или приблизительно 45 7,2.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в

данном документе, множество активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и множество тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина инкубируют при температуре между 4°C и 39°C, включительно. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, множество активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и множество тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина инкубируют при комнатной температуре, необязательно между 20°C и 25°C, включительно, необязательно при или приблизительно при 23°C или при или приблизительно при 24°C. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, множество активированных молекул стрептавидина и множество тиолированных молекул стрептавидина инкубируют в течение от 15 минут до 6 часов или от 30 минут до 2 часов, всегда включительно. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, множество активированных молекул стрептавидина и множество тиолированных молекул стрептавидина инкубируют в течение от 45 минут до 1,5 часов, включительно, необязательно в течение или приблизительно в течение 1 часа. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, инкубацию активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина заканчивают путем введения молекул в контакт с N-этилмалеимидом (NEM).

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, по меньшей мере часть инкубации первого множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с активирующим агентом и по меньшей мере часть инкубации второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с тиолирующим агентом осуществляют отдельно в одно и то же время. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, инкубацию первого множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с активирующим агентом и инкубацию второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с тиолирующим агентом осуществляют в течение по существу одного и того же периода времени и/или выполняют по существу в одно и то же время. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, перед инкубацией тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина, способ включает (i) удаление активирующего агента из композиции, содержащей активированные молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина; и/или (ii) удаление тиолирующего агента из композиции, содержащей тиолированные молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, при этом инкубацию множества активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и множества тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина начинают в пределах 15 минут после окончания инкубации второго множества молекул стрептавидина с тиолирующим агентом и/или после удаления тиолирующего агента из композиции, содержащей тиолированные молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина.

В данном документе представлены способы получения олигомерных реагентов в виде частиц, включающие: инкубацию первого множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с сукцинимидил-6-[(β-малеимидопропионамидо)гексаноатом (SMPH) в течение или приблизительно в течение 1 часа при pH равном или

приблизительно равном 7,2 с созданием таким образом множества активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина, содержащих малеимидную реагирующую с тиолом функциональную группу; инкубацию второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с 2-иминотиололаном в течение или
5 приблизительно в течение 1 часа при рН между 7,5 и 8,5, включительно, с созданием таким образом множества тиолированных молекул стрептавидина, содержащих одну или более тиоловых функциональных групп; и инкубацию множества активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с множеством тиолированных молекул стрептавидина в течение или приблизительно в течение 1 часа при рН равном
10 или приблизительно равном 7,2 с получением таким образом композиции, содержащей олигомерные реагенты в виде частиц; при этом инкубацию множества активированных молекул стрептавидина с множеством тиолированных молекул стрептавидина начинают в пределах 10 минут после инкубации второго множества молекул стрептавидина с 2-иминотиололановыми концами.

15 В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, способ дополнительно включает введение олигомерных реагентов в виде частиц в контакт со стабилизирующим агентом. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, стабилизирующий агент снижает количество N-замещенного иминотиолана,
20 присутствующего на лизиновых остатках олигомерных реагентов в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, стабилизирующий агент снижает количество N-замещенного иминотиолана, присутствующего на лизиновых остатках олигомерных реагентов в виде частиц по меньшей мере на 25%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере
25 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, стабилизирующий агент содержит гидроксилламин.

В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, олигомерные реагенты в виде частиц имеют радиус менее чем 150
30 нм. Некоторые варианты осуществления любого из способов, представленных в данном документе, дополнительно включают в себя фильтрующую стерилизацию олигомерных реагентов в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, олигомерные реагенты в виде частиц отделяют от мономерных или меньших олигомерных молекул стрептавидина или мутеина
35 стрептавидина с помощью эксклюзионной хроматографии. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, эксклюзионный предел составляет более или приблизительно более 100 кДа, 500 кДа, 750 кДа, 1000 кДа или 2000 кДа. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, эксклюзионный предел составляет от
40 или приблизительно от 500 кДа до 1000 кДа. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, эксклюзионный предел составляет или приблизительно составляет 750 кДа.

Отдельные варианты осуществления любого из способов, представленных в данном документе, включают в себя сбор одной или более фракций, содержащих свободный
45 объем, с отделением таким образом олигомерных реагентов в виде частиц от мономерных или меньших олигомерных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают хранение олигомерных реагентов в виде частиц при температуре

приблизительно при или ниже 4°C, приблизительно при или ниже -20°C или приблизительно или ниже -80°C. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают смешивание олигомерных реагентов в виде частиц с одним или более агентами в условиях для обратимого связывания одного или более агентов с олигомерными реагентами в виде частиц.

Также в данном документе представлены способы мультимеризации одного или более агентов с олигомерным реагентом в виде частиц, причем способ включает смешивание олигомерного реагента в виде частиц, полученного с помощью способов, представленных в данном документе, с одним или более агентами в условиях для обратимого связывания одного или более агентов с олигомерными реагентами в виде частиц. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, один или более агентов содержат партнера по связыванию, при этом партнер по связыванию способен связываться с одним или более участком связывания на олигомерном реагенте в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, партнер по связыванию содержит стрептавидин-связывающий пептид.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, партнер по связыванию содержит стрептавидин-связывающий пептид, выбираемый из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19).

В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, один или более агентов связывается или способен связываться с молекулой, экспрессированной на поверхности клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, один или более агентов содержат антитело, необязательно Fab. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, один или более агентов представляет собой рецептор-связывающий агент, который связывается или способен связываться с рецептором, экспрессированным на поверхности клетки-мишени. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент представляет собой или содержит стимулирующий агент, способный связываться с молекулой на поверхности клетки-мишени, индуцируя или модулируя таким образом сигнал в клетке-мишени.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент способен инициировать связанный с комплексом TCR/CD3 сигнал в Т-клетках, связывается с элементом комплекса TCR/CD3; и/или специфически связывается с CD3. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, стимулирующий агент представляет собой первый рецептор-связывающий агент, а способ дополнительно включает обратимое связывание с олигомерным реагентом в виде частиц второго рецептор-связывающего агента, при этом второй рецептор-связывающий агент способен специфически связываться со второй молекулой на поверхности клетки-мишени, причем это связывание со второй молекулой необязательно способно индуцировать или модулировать сигнал в клетках-мишенях.

В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в

данном документе, второй рецептор-связывающий агент специфически связывается с костимулирующей молекулой, вспомогательной молекулой, молекулой иммунной контрольной точки, представляет собой член семейства TNF или рецептор семейства TNF, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор или представляет собой или
5 содержит молекулу адгезии или фактор, который вызывает выработку цитокина, выработку хемокина и/или экспрессию молекулы адгезии. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент специфически связывается с костимулирующей молекулой, вспомогательной молекулой, молекулой иммунной контрольной точки, представляет
10 собой член семейства TNF или рецептор семейства TNF, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор или представляет собой или содержит молекулу адгезии или фактор, который вызывает выработку цитокина, выработку хемокина и/или экспрессию молекулы адгезии.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в
15 данном документе, рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) связывается с костимулирующей или вспомогательной молекулой, а костимулирующую или вспомогательную молекулу выбирают из CD28, CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 или HVEM. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе,
20 рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) специфически связывается с цитокиновым рецептором, а цитокиновый рецептор выбирают из IL-2R, IL-1R, IL-15R, IFN-гаммаR, TNF-альфаR, IL-4R, IL-10R, IFNR I типа, IL-12R, IL-15R, IL-17R, TNFR1 и TNFR2. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) специфически связывается с хемокиновым рецептором, а
25 хемокиновый рецептор выбирают из CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR9, CXCR1, CXCR3 и CXCR4.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в
данном документе, рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент)
30 представляет собой фактор, который вызывает выработку цитокина или хемокина, а фактор представляет собой лиганд, который специфически связывается с рецептором цитокина или хемокина. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой лиганд, который специфически связывается с
35 цитокиновым рецептором, при этом лиганд специфически связывает IL-2R, IL-1R, IL-15R, IFN-гаммаR, TNF-альфаR, IL-4R, IL-10R, IFNR I типа, IL-12R, IL-15R, IL-17R, TNFR1 и TNFR2; и/или лиганд выбирают из IL-2, IL-1, IL-15, IFN-гамма, TNF-альфа, IL-4, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17 и TNF, или он представляет собой их биологически активный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в
данном документе, рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент)
представляет собой лиганд, который специфически связывается с хемокиновым
рецептором, при этом лиганд специфически связывается с хемокиновым рецептором,
выбираемым из CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR9, CXCR1, CXCR3 и CXCR4;
45 или лиганд выбирают из CXCL9, CXCL10, CCL19, CCL21 и CCL25, или он представляет собой их биологически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой молекулу адгезии, и

молекулу адгезии выбирают из CD44, CD31, CD18/CD11a (LFA-1), CD29, CD54 (ICAM-1), CD62L (L-селектина) и CD29/CD49d (VLA-4), CD106 (VCAM-1), или она представляет собой их биологически активный фрагмент.

В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, один или более агентов представляет собой селективный агент, при этом селективный агент связывается или способен связываться с селективным маркером, который экспрессируется на поверхности клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, клеткой-мишенью является иммунная клетка. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, клетка-мишень представляет собой лимфоцит или антигенпредставляющую клетку. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, клетка-мишень представляет собой Т-клетку, В-клетку, НК-клетку, макрофаг или дендритную клетку. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, клетка-мишень представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, селективным маркером является CD25, CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO.

Отдельные варианты осуществления направлены на композицию, содержащую олигомерные реагенты в виде частиц, полученные с помощью способа согласно любому варианту осуществления, представленному в данном документе. Отдельные варианты осуществления направлены на композицию, содержащую множество олигомерных реагентов в виде частиц, полученных с помощью способа согласно любому варианту осуществления, представленному в данном документе. Некоторые варианты осуществления направлены на готовое изделие, содержащее олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления, представленных в данном документе, или композицию согласно любому из вариантов осуществления, представленных в данном документе.

В данном документе представлены способы модулирования клеток, причем способ включает инкубацию композиции клеток, содержащей клетки-мишени, в присутствии олигомерного реагента в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления, представленных в данном документе, или в присутствии композиции согласно любому из вариантов осуществления, представленных в данном документе, модулируя таким образом клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, модулирование клеток-мишеней включает активацию, обогащение и/или размножение клеток-мишеней.

В данном документе представлены способы культивирования клеток, причем способ включает инкубацию композиции клеток, содержащей клетки-мишени, в присутствии олигомерного реагента в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления, представленных в данном документе, или в присутствии композиции согласно любому из вариантов осуществления, представленных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, олигомерный реагент в виде частиц содержит обратимую связь с одним или более агентами. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, один или более агентов связывается или способен связываться с молекулой, экспрессированной на поверхности клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, один или более агентов содержат антитело, необязательно Fab.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, один или более агентов представляет собой рецептор-связывающий агент, который связывается или способен связываться с рецептором, экспрессированным на поверхности клетки-мишени. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент представляет собой или содержит стимулирующий агент, способный связываться с молекулой на поверхности клетки-мишени, индуцируя или модулируя таким образом сигнал в клетке-мишени.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент способен инициировать связанный с комплексом TCR/CD3 сигнал в Т-клетках, связывается с элементом комплекса TCR/CD3; и/или специфически связывается с CD3. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, стимулирующий агент представляет собой первый рецептор-связывающий агент, а способ дополнительно включает обратимое связывание с олигомерным реагентом в виде частиц второго рецептор-связывающего агента, при этом второй рецептор-связывающий агент способен специфически связываться со второй молекулой на поверхности клетки-мишени, причем это связывание со второй молекулой необязательно способно индуцировать или модулировать сигнал в клетках-мишенях.

В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, второй рецептор-связывающий агент специфически связывается с костимулирующей молекулой, вспомогательной молекулой, молекулой иммунной контрольной точки, представляет собой член семейства TNF или рецептор семейства TNF, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор или представляет собой или содержит молекулу адгезии или фактор, который вызывает выработку цитокина, выработку хемокина и/или экспрессию молекулы адгезии. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент специфически связывается с костимулирующей молекулой, вспомогательной молекулой, молекулой иммунной контрольной точки, представляет собой член семейства TNF или рецептор семейства TNF, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор или представляет собой или содержит молекулу адгезии или фактор, который вызывает выработку цитокина, выработку хемокина и/или экспрессию молекулы адгезии.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) связывается с костимулирующей или вспомогательной молекулой, а костимулирующую или вспомогательную молекулу выбирают из CD28, CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 или HVEM. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) специфически связывается с цитокиновым рецептором, а цитокиновый рецептор выбирают из IL-2R, IL-1R, IL-15R, IFN-гаммаR, TNF-альфаR, IL-4R, IL-10R, IFNR I типа, IL-12R, IL-15R, IL-17R, TNFR1 и TNFR2. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) специфически связывается с хемокиновым рецептором, а хемокиновый рецептор выбирают из CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR9, CXCR1, CXCR3 и CXCR4.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в

данном документе, рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой фактор, который вызывает выработку цитокина или хемокина, а фактор представляет собой лиганд, который специфически связывается с рецептором цитокина или хемокина. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой лиганд, который специфически связывается с цитокиновым рецептором, при этом лиганд специфически связывает IL-2R, IL-1R, IL-15R, IFN-гаммаR, TNF-альфаR, IL-4R, IL-10R, IFNR I типа, IL-12R, IL-15R, IL-17R, TNFR1 и TNFR2; и/или лиганд выбирают из IL-2, IL-1, IL-15, IFN-гамма, TNF-альфа, IL-4, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17 и TNF, или он представляет собой их биологически активный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой лиганд, который специфически связывается с хемокиновым рецептором, при этом лиганд специфически связывается с хемокиновым рецептором, выбираемым из CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR9, CXCR1, CXCR3 и CXCR4; или лиганд выбирают из CXCL9, CXCL10, CCL19, CCL21 и CCL25, или он представляет собой их биологически активный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой молекулу адгезии, и молекулу адгезии выбирают из CD44, CD31, CD18/CD11a (LFA-1), CD29, CD54 (ICAM-1), CD62L (L-селектина) и CD29/CD49d (VLA-4), CD106 (VCAM-1), или она представляет собой их биологически активный фрагмент.

В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, один или более агентов представляет собой селективный агент, при этом селективный агент связывается или способен связываться с селективным маркером, который экспрессируется на поверхности клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, клеткой-мишенью является иммунная клетка. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, клетка-мишень представляет собой лимфоцит или антигенпредставляющую клетку. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, клетка-мишень представляет собой Т-клетку, В-клетку, НК-клетку, макрофаг или дендритную клетку. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, клетка-мишень представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, селективным маркером является CD25, CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO. В некоторых вариантах осуществления клетки-мишени включают в себя кровяные клетки, лейкоциты, лимфоциты, В-клетки, популяцию В-клеток, Т-клеток, популяцию Т-клеток, НК-клеток, дендритных клеток и/или макрофагов. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, клетки-мишени экспрессируют рекомбинантный рецептор. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, клетки-мишени экспрессируют рекомбинантный Т-клеточный рецептор и/или химерный антигенный рецептор (CAR).

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, клетки-мишени экспрессируют CAR, который связывается с антигеном, связанным с заболеванием и/или раком. В конкретных вариантах

осуществления любого из способов, представленных в данном документе, антигеном является $\alpha\upsilon\beta 6$ интегрин ($\alpha\upsilon\beta 6$ интегрин), В-клеточный антиген созревания (BCMA), B7-Н6, карбоангидраза 9 (CA9, также, известная как CAIX или G250), раково-тестикулярный антиген, раково-тестикулярный антиген 1В (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), раково-эмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин А2, С-С мотив хемокиновый лиганд 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, хондроитинсульфат протеогликан 4 (CSPG4), белок эпидермального фактора роста (EGFR), укороченный белок эпидермального фактора роста (tEGFR), мутация рецептора эпидермального фактора роста III типа (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфрин-В2, эфринный рецептор А2 (EPHa2), эстрогеновый рецептор, Fc-рецептор-подобный белок 5 (FCRL5; также известный как Fc-рецептор гомолог 5 или FCRH5), эмбриональный ацетилхолиновый рецептор (эмбриональный AchR), фолат-связывающий белок (FBP), рецептор фолиевой кислоты альфа, эмбриональный ацетилхолиновый рецептор, ганглиозид GD2, О-ацетилированный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), сопряженный с G-белком рецептор 5D (GPCR5D), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), erbB димеры, человеческий меланома-ассоциированный антиген с высокой молекулярной массой (HMW-MAA), поверхностный антиген вируса гепатита В, человеческий лейкоцитарный антиген А1 (HLA-AI), человеческий лейкоцитарный антиген А2 (HLA-A2), альфа-рецептор IL-22 (IL-22Ra), альфа-рецептор 2 IL-13 (IL-13Ra2), рецептор, содержащий домен вставки киназы (kdr), легкая цепь каппа, молекула клеточной адгезии L1 (L1CAM), эпитоп CE7 L1-CAM, содержащий богатый лейцином повтор член А семейства 8 (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-А1, MAGE-А3, MAGE-А6, мезотелин, с-Met, мышинный цитомегавирус (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды членов D 2 группы естественных киллеров (NKG2D), melan A (MART-1), молекула адгезии нервных клеток (NCAM), онкоэмбриональный антиген, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), прогестероновый рецептор, простат-специфический антиген, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), простат-специфический мембранный антиген (PSMA), подобный рецепторной тирозинкиназе орфановый рецептор 1 (ROR1), сурвивин, трофобластический гликопротеин (TPBG также известный как 5T4), опухоль-ассоциированный гликопротеин 72 (TAG72), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), ген опухоли Вильмса (WT-1), патоген-специфический антиген или антиген, ассоциированный с универсальной меткой, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

Некоторые варианты осуществления любого из способов, представленных в данном документе, дополнительно включают в себя нарушение обратимого связывания между одним или более агентами и олигомерным реагентом в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, указанный разрыв включает введение в клетки-мишени композиции, содержащей вещество, способное перевернуть связь между одним или более агентами и олигомерным реагентом в виде частиц. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, веществом является свободный партнер по связыванию и/или конкурентный агент.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, указанный разрыв завершает или ослабляет сигнал, индуцированный

или модулированный одним или более агентами в клетках-мишенях, необязательно Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, вещество содержит стрептавидин-связывающий пептид, биотин или биологически активный фрагмент, необязательно D-биотин, или аналог биотина

5 (или биологически активный фрагмент).

В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, веществом является стрептавидин-связывающий пептид, его выбирают из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID

10 NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19). В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, разрыв осуществляют в пределах 5 дней после начала указанной инкубации.

15 Краткое Описание чертежей

На фиг. 1 представлены уровни тиоловых функциональных групп, соединенных с тетрамерами мутеина стрептавидина во время инкубации иллюстративного мутеина стрептавидина STREP-TACTIN® M2 с 2-иминотиололаном в присутствии 100 мМ бората.

20 На фиг. 2 представлен график, отображающий уровни тиоловых функциональных групп, соединенных с тетрамерами мутеина стрептавидина в процессе инкубации иллюстративного мутеина стрептавидина STREP-TACTIN® M2 с 2-иминотиололаном в 25 мМ боратного буфера при pH 8,3 или 8,5.

На фиг. 3 представлены профили элюирования SEC мутеина стрептавидина, инкубированного с 2-иминотиололаном. Пики элюирования для стандартов молекулярной массы показаны в виде сплошной линии для молекулярных масс 158000 Да, 44000 Да, 17000 Да или 1350 Да. Профиль элюирования нетиолированного иллюстративного мутеина стрептавидина STREP-TACTIN® M2 показан в виде пунктирной линии. Остальные профили элюирования изображают профили элюирования разных

30 тиолированных мутеинов стрептавидина STREP-TACTIN® M2, которые инкубировали в присутствии 25 мМ боратного буфера при pH 8,3 или pH 8,5 в течение либо 10 минут, либо 50 минут, либо 390 минут. Специально показаны профили элюирования после инкубации иллюстративного мутеина стрептавидина STREP-TACTIN® M2 с 2-иминотиололаном в присутствии 25 мМ боратного буфера при pH 8,3 в течение 10 минут,

35 25 мМ боратного буфера при pH 8,3 в течение 50 минут, 25 мМ боратного буфера при pH 8,3 в течение 390 минут или 25 мМ боратного буфера при pH 8,5 в течение 10 минут, 25 мМ боратного буфера при pH 8,5 в течение 50 минут или 25 мМ боратного буфера при pH 8,5 в течение 390 минут.

На фиг. 4 представлен концентрация тиоловых функциональных групп (содержание SH) после инкубации иллюстративного мутеина стрептавидина STREP-TACTIN® M2 с 2-иминотиололаном в течение 1 часа или 3 часов с 25 мМ боратным буфером при pH 8,3, 8,5 и 8,7.

На фиг. 5 представлена потеря тиоловых функциональных групп (содержание SH) иллюстративного мутеина стрептавидина STREP-TACTIN® M2 в разные моменты

45 времени после инкубации с 2-иминотиололаном и гель-фильтрации с колонками PD10.

На фиг. 6А и 6В представлены результаты метаболического анализа WST Т-клеток от трех разных доноров, инкубированных с антителами против CD3/против CD28, мультимеризированными на разных партиях олигомерных реагентов, состоящих из

иллюстративного мутеина стрептавидина STREP-TACTIN® M2. На фиг. 6А представлена метаболическая активность WST для всех протестированных партий (объединенных) по сравнению с эталонными партиями, содержащими антитела против CD3/против CD28, мультимеризированные на олигомерном каркасе со средним гидродинамическим радиусом 36 нм или 101 нм. На фиг. 6В показана средняя метаболическая активность WST между Т-клетками от разных доноров для отдельных протестированных партий и эталонных реагентов.

На фиг. 7, которая включает в себя фиг. 7А-7Е, представлены схематичные изображения иллюстративных вариантов осуществления.

На фиг. 7А представлено схематичное изображение реагента (или его репрезентативной части), такого как олигомерный реагент стрептавидин или мутеин стрептавидина, с множеством участков связывания для обратимого связывания с агентами. В данном случае показан реагент, способный обратимо связываться с двумя агентами, каждый из которых способен специфически связываться с молекулой на клетке. Реагент имеет множество участков связывания, включая множество участков связывания, Z1, каждый из которых способен обратимо связываться с агентами. Каждый из первого и второго агентов, которые в некоторых случаях могут быть одинаковыми, на показанном схематичном изображении содержат по меньшей мере один партнер С1 по связыванию. Партнер С1 по связыванию обратимо связывается с участком Z1 связывания. Каждый из первого и второго агентов также содержит участок связывания, В2, который может специфически связываться с молекулой на поверхности клетки, которая в некоторых случаях может быть на той же клетке. В данном случае показано, что первый и второй агенты специфически связываются с молекулами на той же клетке.

На фиг. 7В представлено схематичное изображение реагента, такого как олигомерный реагент стрептавидин или мутеин стрептавидина, с множеством участков связывания, способных обратимо связываться с первым и вторым агентом, причем каждый из агентов способен специфически связываться с молекулой на первой и второй клетке, соответственно. Реагент имеет множество участков Z1 связывания, каждый из которых способен обратимо связываться с агентом. Каждый из первого и второго агентов, которые в некоторых случаях могут быть одинаковыми, содержит партнер С1 по связыванию, который обратимо связывается с участком Z1 связывания. Каждый из первого и второго агентов содержит участок В2 связывания, который может специфически связываться с молекулой на поверхности клетки, которая в некоторых случаях может быть на той же клетке или на другой клетке. В данном случае первый агент связан с молекулой на поверхности первой клетки, а второй агент связан с молекулой на поверхности второй клетки.

На фиг. 7С представлен реагент, такой как олигомерный реагент стрептавидин или мутеин стрептавидина, способный обратимо связываться с первым и вторым агентами, причем каждый из агентов способен специфически связываться с молекулой на первой и второй клетке, соответственно. Реагент имеет множество участков Z1 и Z2 связывания, которые могут быть одинаковыми или разными, каждый из которых способен обратимо связываться с одним или с обоими агентами. Первый агент содержит партнер С1 по связыванию, который обратимо связывается с Z1; второй агент содержит партнер С2 по связыванию, который может обратимо связываться с Z2. В некоторых случаях С1 и С2 разные. В некоторых случаях С1 и С2 одинаковые или по существу одинаковые. Первый агент содержит участок В1 связывания, который может специфически связываться с молекулой на поверхности клетки, а второй агент содержит по меньшей мере один участок В3 связывания, который может специфически связываться с молекулой

на поверхности клетки. Участки В1 и В3 связывания в некоторых случаях связываются с двумя разными молекулами на поверхности клетки или с разными эпитопами на одной молекуле, или с одной и той же или разными молекулами на поверхности разных клеток. В данном случае показано, что первый агент связан посредством В1 с молекулой на поверхности первой клетки, а второй агент связан с молекулой на поверхности второй клетки.

На фиг. 7D представлен реагент, такой как олигомерный реагент стрептавидин или мутеин стрептавидина, способный обратимо связываться с первым и вторым агентом, таким как селективные агенты, каждый из которых способен специфически связываться с молекулой на клетке. Реагент имеет множество участков связывания, включая Z1 и Z2, которые могут быть одинаковыми или разными, каждый из которых способен обратимо связываться с агентом. Первый агент содержит партнер С1 по связыванию, который может специфически связываться с участком Z1 связывания, а второй агент содержит по меньшей мере один партнер С2 по связыванию, который может специфически связываться с участком Z2 связывания. В некоторых случаях С1 и С2 разные. В некоторых случаях С1 и С2 одинаковые или по существу одинаковые. Первый агент содержит участок В1 связывания, который может специфически связываться с молекулой на поверхности клетки, а второй агент содержит участок В3 связывания, который может специфически связываться с молекулой на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления первым агентом и вторым агентом может быть селективный агент. Участки В1 и В3 связывания могут связывать одинаковые или разные молекулы (например, рецептор) на поверхности клетки, одинаковые или разные эпитопы на молекуле или одинаковые или разные молекулы на поверхности разных клеток. В данном случае первый агент связан с первой молекулой на поверхности клетки, а второй агент связан со второй молекулой на поверхности той же клетки.

На фиг. 7E представлен реагент, такой как олигомерный реагент стрептавидин или мутеин стрептавидина, обратимо связанный с первым и вторым агентом, причем каждый из агентов способен специфически связываться с молекулой на клетке. Реагент имеет множество участков связывания, включая Z1 и Z2, которые могут быть одинаковыми или разными, каждый из которых способен обратимо связываться с агентом. Первый агент содержит партнер С1 по связыванию, который может обратимо связываться с Z1 реагента, а второй агент содержит партнер С2 по связыванию, который может обратимо связываться с Z2. В некоторых случаях С1 и С2 разные. В некоторых случаях С1 и С2 одинаковые или по существу одинаковые. Первый агент содержит по меньшей мере один участок В2 связывания, который может специфически связываться с молекулой на поверхности клетки, а второй агент содержит по меньшей мере один участок В4 связывания, который может специфически связываться с молекулой на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления первым агентом и вторым агентом могут быть стимулирующие агенты. Участки В2 и В4 связывания могут связывать одинаковые или разные молекулы на поверхности клетки, одинаковые или разные эпитопы на молекуле или одинаковые или разные молекулы на поверхности разных клеток. В данном случае первый агент связан с первой молекулой на поверхности клетки, а второй агент связан со второй молекулой на поверхности той же клетки.

На фиг. 8, которая включает в себя фиг. 8А-8Е, представлены схематичные изображения иллюстративных вариантов осуществления, которые показаны на фиг. 7А-7Е, соответственно, за исключением того, что изображенные реагенты, такие как олигомерный реагент стрептавидин или мутеин стрептавидина, показаны иммобилизованными на носителе, таком как неподвижная фаза.

На фиг. 9 представлено схематичное изображение иллюстративных вариантов осуществления, в которых олигомерные реагенты, такие как олигомерный реагент стрептавидин или мутеин стрептавидина, используют для мультимеризации стимулирующих агентов, а полученные комплексы инкубируют с клетками для доставки сигналов в клетки, с последующим изменением направления связывания. На панели А представлен олигомерный реагент 1, который показан не связанным с каким-либо носителем и гибким. Стимулирующие агенты 2, которые показаны здесь в виде Fab-фрагментов и способны специфически связываться с молекулой на поверхности клетки, соединяют с реагентом. Агенты содержат партнера по связыванию (например, партнер С по связыванию), который способен обратимо связываться с участком связывания (например, участком Z связывания) на реагенте, мультимеризируя агентов. На панели В представлен партнер по связыванию, обратимо связывающийся с участком связывания на реагенте. В систему добавляют клетки 3. На панели С представлены мультимеризованные агенты (Fab-фрагменты), специфически связывающиеся с молекулами 4 на поверхности клетки 3. На панели С изображенные агенты представляют собой связывающие стимулирующий рецептор агенты (например, первый рецептор-связывающий агент и/или второй рецептор-связывающий агент), которые могут индуцировать или модулировать сигнал в клетке при связывании агента с молекулой на клетке. Как показано на панели D, в композицию добавляют вещество 5, такое как конкурентный реагент (например, биотин), которым может быть вещество, которое демонстрирует более высокую аффинность связывания для участка связывания на реагенте, чем для партнера по связыванию на агенте, нарушая таким образом обратимое связывание между реагентом 1 и агентом 2. В некоторых случаях агент, например, Fab-фрагмент, также может диссоциировать из его взаимодействия с молекулой 4 на клетке 3. В некоторых случаях это может нарушать, ослаблять и/или прекращать передачу сигналов в клетке.

На фиг. 10 представлено схематичное изображение иллюстративных вариантов осуществления обратимой системы, включающей в себя олигомерные реагенты, такие как олигомерный реагент стрептавидин или мутеин стрептавидина, соединенные с носителем, таким как твердый носитель или поверхность, содержащая неподвижную фазу. На панели А представлен носитель 6, содержащий реагент 1. В систему добавляют агенты 2, такие как Fab-фрагменты, которые способны специфически связываться с молекулой на поверхности клетки. Агенты 2, такие как Fab-фрагменты, содержат партнера по связыванию (например, партнера С по связыванию), который способен обратимо связываться с участком связывания (например, участком Z связывания) на реагенте. На панели В представлен партнер по связыванию, обратимо связывающийся с участком связывания на реагенте. В систему добавляют клетки 3. На панели С представлены агенты 2, например, Fab-фрагменты, связывающиеся с молекулами 4 на поверхности клетки 3. В некоторых вариантах осуществления scFvs содержат рецептор-связывающий агент или селективный агент. В некоторых вариантах осуществления агентами, например, Fab-фрагментами может быть рецептор-связывающий агент или селективный агент. На панели С представлен иллюстративный рецептор-связывающий агент или агенты (например, первый рецептор-связывающий агент и/или второй рецептор-связывающий агент), которые могут индуцировать или модулировать сигнал в клетке при связывании агента, например, Fab-фрагмента, с молекулой на клетке. Добавляют вещество 5, такое как конкурентный реагент (например, биотин), которым может быть вещество, которое демонстрирует более высокую аффинность связывания для участка связывания на реагенте, чем для партнера по связыванию на агенте,

например, Fab-фрагменте, нарушая таким образом связывание между реагентом и агентом. На панели D представлено нарушение связывания между агентом 2, например, Fab-фрагментом, и реагентом, что приводит таким образом к диссоциации реагента из агента, и таким образом клетки. В некоторых случаях агент, например, Fab-фрагмент, также может диссоциировать из его взаимодействия с молекулой 4 на клетке 3. В некоторых случаях это может нарушать, ослаблять и/или прекращать передачу сигналов в клетке.

На фиг. 11 представлены графики изменений размера при измерении с помощью динамического рассеяния света олигомерных реагентов мутеин стрептавида в разные моменты времени после хранения при -80°C , 4°C или 37°C .

На фиг. 12A и B представлены графики общего количества клеток (фиг. 12A) и процентного значения жизнеспособных клеток (фиг. 12B) с течением времени в процессе инкубации с разными отдельными партиями конъюгированных с Fab против CD3/против CD28 олигомерных реагентов мутеин стрептавида во время иллюстративного процесса конструирования для создания композиций Т-клеток, содержащих Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR).

На фиг. 13 представлен график, отображающий процентные значения общего количества клеток CAR+, CD4+CAR+ и CD8+CAR+, а также процентное значение Т-клеток CAR+CD4+ среди Т-клеток CD4+ и процентное значение Т-клеток CAR+CD8+ среди Т-клеток CD8+ композиций Т-клеток, инкубированных с разными отдельными партиями конъюгированных с Fab против CD3/против CD28 олигомерных реагентов мутеин стрептавида во время иллюстративного процесса конструирования для создания композиций Т-клеток CAR.

На фиг. 14 представлены графики, отображающие процентное значение клеток, положительных на окрашивание остаточных Fab (верхняя панель) или остаточного мутеина стрептавида (нижняя панель) среди композиций клеток, которые инкубировали с разными отдельными партиями конъюгированных с Fab олигомерных реагентов мутеин стрептавида.

На фиг. 15 представлен график, отображающий цитотоксическую активность композиций Т-клеток, содержащих Т-клетки CAR, которые были созданы с помощью иллюстративного способа конструирования, который включал инкубацию с разными отдельными партиями конъюгированных с Fab против CD3/против CD28 олигомерных реагентов мутеин стрептавида.

Подробное Описание

Если не указано иное, все термины данной области, обозначения и другие технические и научные термины или терминология, используемые в данном документе, предполагают наличие того же значения, которое обычно понимает рядовой специалист в области, к которой относится заявленный предмет изобретения. В некоторых случаях термины с общепринятыми значениями определены в данном документе для ясности и/или для удобства ссылки, и включение в данный документ таких определений не обязательно должно истолковываться как представляющее существенную разницу по сравнению с тем, что обычно понимают в данной области техники.

Все публикации, включая патентные документы, научные статьи и базы данных, упоминаемые в данной заявке, полностью включены посредством ссылки для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была отдельно включена посредством ссылки. Если приведенное здесь определение противоречит или иным образом не согласуется с определением, изложенным в патентах, заявках, опубликованных заявках и других публикациях, которые включены в данный документ

посредством ссылки, определение, изложенное здесь, имеет преимущественную силу над определением, которое включено в данный документ посредством ссылки.

Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие предмет изобретения.

I. Обзор

В данном документе представлены способы изготовления, получения и/или создания олигомерных реагентов в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, используют для олигомеризации молекул в олигомерные реагенты в виде частиц в диапазоне от 1 миллиона Да до 100 миллионов Да, от 1 миллиона Да до 1 миллиардов Да, от 1 миллиона Да до 10 миллиардов Да и/или от 1 миллиона Да до 100 миллиардов Да. В отдельных вариантах осуществления предусмотрено, что на распределение размеров олигомерных реагентов в виде частиц, полученных с помощью представленных способов, влияет изменение отдельных условий реакции на одной или более разных стадиях. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления условия, такие как синхронизация, концентрации и молярные соотношения реагентов и рН растворов точно регулируют и сохраняют постоянными. В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, используют для получения олигомерных реагентов в виде частиц со стабильными размерами между партиями или сериями. В некоторых вариантах осуществления условия одного или более этапов или стадий способов, представленных в данном документе, можно регулировать для изготовления, получения или создания олигомерных реагентов в виде частиц с одним или более разными нужными размерами.

В некоторых вариантах осуществления в способах, представленных в данном документе, для изготовления, получения и/или создания олигомерных реагентов в виде частиц сшивают молекулы, например, тетрамеры стрептавидина или мутеина стрептавидина, путем введения в реакцию множества молекул, имеющих присоединенные тиоловые функциональные группы (также называемые тиолированные молекулы, например, тиолированные молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина) с множеством молекул, имеющих присоединенную тиол-реактивную функциональную группу (например, активированные молекулы, например, молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина), такую как малеимидная функциональная группа.

В отдельных вариантах осуществления предусмотрено, что мультимеризационные реагенты и/или олигомерные реагенты в виде частиц одного или более конкретных размеров могут быть особенно эффективными для использования при модулировании клеток. Например, в некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц некоторого размера при обратимом связывании с одним или более стимулирующим агентом являются особенно эффективными для размножения, активации и/или обогащения популяции клеток. Как обнаружено в данном документе, олигомерные реагенты в виде частиц особенно большего размера, например, имеющие средний радиус, например, гидродинамический радиус, больше чем 32 нм, и обычно средний радиус больше чем 60 нм, например, средний радиус больше или приблизительно больше 90 нм, 95 нм или 100 нм, которые обратимо связаны со стимулирующими агентами, активируют клетки в большей степени, чем олигомерные частицы меньшего размера, например, ФИГ. 6. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены олигомерные реагенты в виде частиц с определенными размерами и распределениями размеров и способы стабильного получения олигомерных реагентов в виде частиц с нужными размерами и распределениями размеров.

В некоторых вариантах осуществления представленные способы получения олигомерных реагентов в виде частиц приводят к уменьшенной изменчивости и в целом к стабильному созданию олигомерных реагентов большего размера, минимизируя в то же время распределение размеров олигомеров в композиции. В некоторых вариантах осуществления реактивные тиоловые группы для реакции олигомеризации добавляют в молекулы путем активации имиотиололанов аминов, присутствующих на лизиновых остатках и на N-конце молекул. В некоторых вариантах осуществления синхронизацию реакции тиолирования и время между окончанием реакции тиолирования и началом реакции олигомеризации в некоторых случаях от реакции к реакции сохраняют постоянными, потому что свободные тиолы можно потерять вследствие изомеризации, т.е. образования N-замещенного имиотиолана. В некоторых аспектах синхронизация должна минимизировать потерю тиолов и создание N-замещенной формы имиотиолана, которая в некоторых случаях является скрытым источником функции SH при повторной изомеризации, которая может приводить к постсинтетическому росту олигомеров. В некоторых вариантах осуществления регулирование доступности тиоловых групп для реакции с малеимид-содержащими молекулами, и минимизация накопления N-замещенного имиотиолана, представляет собой параметр, который может влиять на постоянство размера олигомера.

Кроме того, в некоторых вариантах осуществления кинетика активации тиола и также других химических реакций в некоторых случаях может зависеть от pH. В некоторых вариантах осуществления pH одного или более буферов для химических реакций (буферов активации и связывания), и в частности pH буфера для тиолирующего агента находятся в пределах заданного диапазона или уровня, и обычно его точно измеряют и регулируют. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления стехиометрию между тиолирующими и активирующими агентами и молекулами регулируют с высокой точностью путем регулирования концентраций в пределах небольших допусков ($\pm 2\%$) для получения воспроизводимых средних размеров мультимеров.

Также в данном документе представлены такие олигомерные реагенты, которые описаны в данном документе. В некоторых вариантах осуществления один или более агентов могут быть обратимо или необратимо связаны с олигомерными реагентами, которые в некоторых случаях представляют собой агент мультимеризации, причем один или более агентов мультимеризированы на олигомерных реагентах в виде частиц. Олигомерные реагенты, имеющие связанные с ними один или более агентов, таких как агенты для мультимеризации, можно использовать в способах, включающих культивирование или инкубацию с клетками-мишенями, включая первичные клетки, такие как Т-клетки.

В некоторых аспектах в данном документе представлены олигомерные реагенты в виде частиц, которые связаны или обратимо связаны (например, мультимеризированы) с одним или более агентами, такими как рецептор-связывающие реагенты и/или стимулирующие реагенты. В конкретных вариантах осуществления предоставленные олигомерные частицы состоят из олигомеризированных молекул, например, сшитых мутеинов стрептавидина, и связаны со стимулирующими и/или рецептор-связывающими агентами, которые связываются и/или способны связываться с поверхностью клетки. В некоторых аспектах агенты представляют собой или содержат антитело против CD3 и/или против CD28 или его антиген-связывающие фрагменты, имеющие партнер по связыванию, например, стрептавидин-связывающий пептид, такой как Strep-tagII. В конкретных вариантах осуществления олигомеризированные реагенты в виде частиц

имеют радиус между 50 нм и 150 нм, 75 нм и 125 нм, 80 нм и 115 нм или радиус, равный или приблизительно равный 80 нм, 85 нм, 90 нм, 95 нм, 100 нм, 105 нм, 110 нм, 115 нм $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$ или $\pm 0,1\%$. В некоторых аспектах представлена композиция, содержащая множество олигомерных реагентов в виде частиц, таких как реагенты, связанные или обратимо связанные (например, мультимеризированные) с одним или более агентами, у которых средний радиус олигомерных реагентов в виде частиц в множестве составляет между 50 нм и 150 нм, 75 нм и 125 нм, 80 нм и 115 нм или радиус равен или приблизительно равен 80 нм, 85 нм, 90 нм, 95 нм, 100 нм, 105 нм, 110 нм, 115 нм $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$ или $\pm 0,1\%$. В некоторых аспектах олигомеризированные реагенты в виде частиц особенно подходят для отбора и/или стимуляции клеток, например, посредством связывания селективного агента или стимулирующего агента, соответственно, с молекулой клеточной поверхности на клетках-мишенях. В некоторых случаях присутствие или добавление конкурентного реагента приводит к диссоциации между олигомерным реагентом в виде частиц и агентами, например, рецептор-связывающими реагентами, которые в некоторых случаях могут быстро прекращать, заканчивать или нарушать стимуляцию клеток олигомерными реагентами в виде частиц.

В данном документе представлен способ размножения композиции клеток-мишеней, таких как Т-клетки, с использованием представленных олигомерных реагентов. В некоторых вариантах осуществления способы относятся к обратимым системам реагентов, способных связываться с молекулами на поверхности клеток-мишеней, такими как рецептор-связывающая молекула, предоставляя таким образом в клетки сигнал, которым в некоторых случаях может быть первичный активационный сигнал. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц, используемые в способах, представляют собой мультимеризационные реагенты и/или олигомерные реагенты в виде частиц, имеющие связанный на них один или более агентов, например, первый агент, второй агент и т.д., который обеспечивает в клетки сигнал, такой как первичный активационный сигнал и/или дополнительный или костимулирующий сигнал. В некоторых вариантах осуществления первичный активационный сигнал сам по себе может быть достаточным для активации размножения/пролиферации клеток. Данный первый агент может быть либо обратимо, либо также необратимо связан с реагентом мультимеризации и/или олигомерными реагентами в виде частиц. Реагент мультимеризации и/или олигомерные реагенты в виде частиц также могут иметь связанный с ними второй агент, который стимулирует вспомогательную молекулу на поверхности клеток. Второй агент при связывании с вспомогательной молекулой на поверхности клеток может таким образом стимулировать размножение активированных клеток. Также данный второй агент может быть либо обратимо, либо также необратимо связан с реагентом мультимеризации и/или олигомерным реагентом в виде частиц. Реагент мультимеризации и/или олигомеризированный реагент в виде частиц могут быть либо иммобилизованы на твердом носителе, либо растворимыми. В одном аспекте раскрытый в данном документе способ представляет собой серийное размножение популяции клеток, в котором стимулируют/размножают полную популяцию лимфоцитов, затем необходимые для размножения реагенты удаляют с помощью хроматографии на подходящей неподвижной фазе. В некоторых вариантах осуществления размноженные/стимулированные клетки, которые представляют собой культивируемые клетки, необязательно трансфицируют, например, Т-клеточным рецептором или химерным антигенным рецептором (CAR), а в некоторых аспектах их можно подвергать второму размножению, стимулированному

другой стимулирующей молекулой, которая связывается с введенным Т-клеточным рецептором или химерным антигенным рецептором.

В данном документе представлен способ размножения композиции клеток-мишеней, таких как Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления способы связаны с обратимыми системами реагентов, способных связываться с молекулами на поверхности клеток-мишеней, такими как рецептор-связывающая молекула, предоставляя таким образом в клетки сигнал, которым в некоторых случаях может быть первичный активационный сигнал. В некоторых вариантах осуществления в способах задействуют реагенты, такие как олигомерные реагенты в виде частиц, которыми могут быть мультимеризационные реагенты, и/или олигомерный реагент в виде частиц, имеющий связанный на нем один или более агентов, например, первый агент, второй агент и т.д. Который, обеспечивает в клетки сигнал, такой как первичный активационный сигнал и/или дополнительный или костимулирующий сигнал. В некоторых вариантах осуществления первичный активационный сигнал сам по себе может быть достаточным для активации размножения/пролиферации клеток. Данный первый агент может быть либо обратимо, либо также необратимо связан с реагентом мультимеризации и/или олигомерным реагентом в виде частиц. Реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц также могут иметь связанный с ними второй агент, который стимулирует вспомогательную молекулу на поверхности клеток. Второй агент при связывании с вспомогательной молекулой на поверхности клеток может таким образом стимулировать размножение активированных клеток. Также данный второй агент может быть либо обратимо, либо также необратимо связан с реагентом мультимеризации и/или олигомерным реагентом в виде частиц. Агент мультимеризации может быть либо иммобилизованным на твердом носителе, либо растворимым. В одном аспекте раскрытый в данном документе способ представляет собой серийное размножение популяции клеток, в котором стимулируют/размножают полную популяцию лимфоцитов, затем необходимые для размножения реагенты удаляют с помощью хроматографии на подходящей неподвижной фазе. В некоторых вариантах осуществления размноженные/стимулированные клетки, которые представляют собой культивируемые клетки, необязательно трансфицируют, например, Т-клеточным рецептором или химерным антигенным рецептором (CAR), а в некоторых аспектах их можно подвергать второму размножению, стимулированному другой стимулирующей молекулой, которая связывается с введенным Т-клеточным рецептором или химерным антигенным рецептором.

В данной области известны способы размножения популяции Т клеток *in vitro* в отсутствие экзогенных факторов роста или при низких количествах экзогенных факторов роста (см., например, патент США 6352694 В1 и Европейский патент EP 0 700 430 В1). В общем, в таких способах задействуют твердофазные поверхности больше чем 1 мкм в диаметре, на которых иммобилизуют разные связывающие агенты (например, антитело против CD3 и/или антитело против CD28). Например, в продаже имеются реагенты для размножения Т-клеток Dynabeads® CD3/CD28 (Invitrogen), которые представляют собой однородные, 4,5 мкм в диаметре, суперпарамагнитные, стерильные, непирогенные полистирольные шарики, покрытые смесью аффинно очищенных моноклональных антител против молекул CD3 и CD28 клеточной поверхности на человеческих Т-клетках. Однако, в некоторых случаях такие магнитные шарики, например, трудно интегрировать в способ размножения клеток в условиях, необходимых для клинических испытаний или терапевтических целей, поскольку необходимо убедиться, что эти магнитные шарики полностью удалены перед введением пациенту

размноженных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, решают эти проблемы. В некоторых аспектах представленные реагенты являются обратимыми, так что стимулирующие агенты можно удалить из композиции клеток. Также, в некоторых аспектах реагент, например, реагент мультимеризации или олигомерный реагент в виде частиц, с которым связаны стимулирующие агенты, не иммобилизован на носителе, например, не иммобилизован на твердом носителе или поверхности. Таким образом, в некоторых аспектах реагент, например, реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, является гибким, а не жестким. В некоторых вариантах осуществления реагент может адаптироваться или соответствовать поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления можно иммобилизовать реагент на носителе, таком как твердый носитель, включая неподвижную фазу. В некоторых вариантах осуществления такие способы можно использовать совместно со способами отбора с применением аналогичных селективных агентов, в которых одну или более клеток-мишеней можно отобрать и одновременно или последовательно подвергнуть воздействию стимулирующих агентов. Следовательно, в некоторых аспектах стимуляцию отдельных клеток или подгрупп клеток можно сдвинуть путем отбора и выделения вместе со стимуляцией.

В некоторых вариантах осуществления представленные способы включают культивирование, например, введение композиция клеток в контакт с реагентом, например, реагентом мультимеризации или олигомерным реагентом в виде частиц, с которым связан один или более рецептор-связывающих агентов (например, стимулирующих агентов) (см., например, фиг. 10А и 10В). В некоторых вариантах осуществления после введения композиции клеток в контакт с реагентом мультимеризации и/или олигомерным реагентом в виде частиц с одним или более связанными рецептор-связывающими агентами и обычно инкубации популяции клеток с реагентом мультимеризации и/или олигомерным реагентом в виде частиц с одним или более связанными рецептор-связывающими агентами, популяция клеток образует комплексы/связывается с агентом мультимеризации посредством первого агента. Другие популяции клеток, содержащиеся в первоначальном образце, у которых нет конкретной молекулы клеточной поверхности, не связываются с реагентом мультимеризации и/или олигомерным реагентом в виде частиц с одним или более связанными рецептор-связывающими агентами. В связи с этим следует отметить, что популяция клеток обычно имеет множество копий молекулы клеточной поверхности на своей поверхности, и для стимуляции или активации обычно нужно связывание этого множества копий.

Таким образом, агент мультимеризации обеспечивает обычно больше чем один участок связывания, например, Z1, в котором в некоторых случаях может быть обратимо связано множество агентов, например, посредством связывания партнера по связыванию, например, С1, одного или более агента с одним или более участком связывания, например, Z1. В некоторых таких аспектах представлен первый агент, второй агент и/или другие агенты с достаточной плотностью в популяции клеток. В связи с этим следует отметить, что агент мультимеризации сам по себе может иметь множество участков связывания, например, Z1, например, мутеин стрептавидина (представляющий собой гомотетрамер) в его нативном состоянии имеет четыре таких участка связывания, например, Z1, и может быть дополнительно олигомеризирован. В некоторых случаях реагент может иметь только один участок связывания, например, Z1, для обратимого связывания партнера по связыванию, например, С1. Таким примером является мультимерный кальмодулин. Кальмодулин сам по себе имеет только один

участок связывания для кальмодулин-связывающих пептидов. Однако, кальмодулин можно биотинилировать, а затем ввести в реакцию с олигомерами стрептавидина (см. также ниже), предоставляя таким образом реагент мультимеризации, в котором с высокой плотностью присутствует множество молекул кальмодулина на «каркасе»,
5 предоставляя таким образом мультимерный кальмодулин.

В некоторых вариантах осуществления после инкубации или другого подходящего времени, в которое нужно прервать стимуляцию, связывание между партнером по связыванию, также называемом в данном документе партнером С по связыванию, например, С1, обратимо связанного агента, и участком Z связывания, например, Z1,
10 реагента мультимеризации и/или олигомерного реагента в виде частиц, нарушают путем разрыва соответствующей обратимой связи. В некоторых случаях разрыва можно добиться путем добавления конкурента в инкубационную/реакционную смесь, содержащую популяцию клеток, связанных с реагентом мультимеризации и/или олигомерными реагентами в виде частиц. Для конкурентного разрыва (который можно
15 понять, как конкурентное элюирование) обратимой связи между партнером С по связыванию, например, С1, обратимо связанного агента и участком Z связывания, например, Z1, реагента мультимеризации и/или олигомерных реагентов в виде частиц, инкубационную смесь/популяцию клеток можно ввести в контакт со свободным первым партнером С по связыванию, например, С1, или аналогом указанного первого партнера
20 С по связыванию, который способен разорвать связь между первым партнером по связыванию и участком Z связывания, например, Z1. В примере партнера С по связыванию, например, С1, представляющего собой стрептавидин-связывающий пептид, который связывается с участком связывания биотина стрептавидина, первым свободным партнером может быть соответствующий свободный стрептавидин-связывающий
25 пептид или аналог, который связывается конкурентно. Таким аналогом может быть, например, биотин или производное или аналог биотина, такой как дестиобиотин.

В некоторых вариантах осуществления добавление свободного партнера или его аналога приводит к вытеснению партнера С по связыванию, например, С1, из реагента мультимеризации и/или олигомерного реагента в виде частиц, и таким образом,
30 поскольку партнер по связыванию содержится в обратимо связанном агенте, достигается вытеснение такого агента из реагента мультимеризации и/или олигомерного реагента в виде частиц. Данное вытеснение агента, в свою очередь, приводит к диссоциации первого агента из молекулы клеточной поверхности, в частности, если аффинность связывания связи между первым агентом и рецептором поверхности клетки имеет
35 константу диссоциации (K_d) в диапазоне от 10^{-2} М до 10^{-13} М и таким образом также является обратимой. Вследствие такой диссоциации в некоторых аспектах также прекращается стимуляция популяции клеток.

В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания молекул антител с их антигеном, включая, например, молекулу рецептора поверхности клетки, обычно
40 находится в диапазоне аффинности K_d от 10^{-7} М до 10^{-13} М. Таким образом, обычные моноклональные антитела можно использовать в качестве агента (первого или второго, рецептор-связывающего, например, стимулирующего агента или селективного агента). В некоторых вариантах осуществления, чтобы избежать любых нежелательных эффектов
45 avidности, которые приводят к более сильному связыванию, также можно использовать моноклональные антитела в виде их моновалентных фрагментов антител, таких как Fab-фрагменты или одноцепочечные Fv-фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления вследствие диссоциации обратимо связанного

агента или агентов из молекулы клеточной поверхности, представленный способ имеет дополнительное преимущество, заключающееся в том, что стимулированная популяция клеток не содержит стимулирующих агентов в конце периода стимуляции. Также в некоторых вариантах осуществления все другие реагенты, используемые в способе, а именно агенты (например, первый или второй, рецептор-связывающие агенты, например, стимулирующие агенты, или селективные агенты), а также конкурентный реагент партнера С по связыванию, например, С1, или его аналог могут быть легко удалены из стимулированной популяции клеток посредством «картриджа для удаления» (см., например, описанный в международной заявке на выдачу патента WO 2013/124474). В некоторых случаях, например, когда реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц иммобилизируют на твердом носителе, таком как поверхность биореактора или магнитный шарик, он находится сзади. Таким образом, использование картриджа для удаления для удаления свободного агента и конкурентного реагента может включать загрузку образца для элюирования (например, образца, полученного после разрыва обратимого связывания или связи) на вторую хроматографическую колонку.

В некоторых вариантах осуществления данная хроматографическая колонка имеет подходящую неподвижную фазу, которая представляет собой как матрицу для аффинной хроматографии, так и в то же время может выступать в качестве матрицы для гелепроникающей хроматографии. В некоторых аспектах данная матрица для аффинной хроматографии имеет иммобилизованный на ней аффинный реагент. В некоторых вариантах осуществления аффинным реагентом может быть, например, стрептавидин, мутеин стрептавидина, авидин, мутеин авидина или их смесь. В некоторых вариантах осуществления агент (например, первый или второй рецептор-связывающие агенты, например, стимулирующие агенты или селективные агенты), конкурентный реагент партнера С по связыванию, С1, связываются с аффинным реагентом, с иммобилизацией таким образом на матрице для хроматографии. В результате в элюированном образце, содержащем выделенную и размноженную популяция клеток, истощается агент (например, первый или второй рецептор-связывающие агенты, например, стимулирующие агенты или селективные агенты) и конкурентный реагент. В некоторых вариантах осуществления культивируемая композиция не содержит ни один из реагентов, которые в некоторых аспектах являются предпочтительными для использования в связи с диагностическими вариантами применения (например, дополнительная сортировка FACSTM) или для любого терапевтического применения на основе клеток.

В некоторых вариантах осуществления способность удалять реагент и другие компоненты из композиции имеет дополнительное преимущество невозможности избежать любого твердого носителя, такого как магнитные шарики. В некоторых вариантах осуществления это означает, что нет риска или минимального риска загрязнения активированных Т-клеток такими магнитными шариками. В некоторых вариантах осуществления это также означает, что способ, который соответствует стандартам GMP, можно более легко создать по сравнению с другими способами, такими как использование Dynabeads®, в которых нужно принимать дополнительные меры для обеспечения того, чтобы итоговая размноженная популяция Т-клеток не содержала магнитных шариков. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления использование растворимого агента мультимеризации значительно облегчает его удаление из популяции активированных клеток (Т-клеток, В-клеток или также естественных клеток-киллеров), поскольку клетки можно просто осаждать с помощью центрифугирования и супернатанта, в том числе растворимый агент мультимеризации

можно выбрасывать. Альтернативно, растворимый агент мультимеризации можно удалять из размноженной популяции клеток в матрице для гель-проникающей хроматографии картриджа для удаления, такого как описан выше (например, в международной заявке на выдачу патента WO 2013/124474). В некоторых вариантах осуществления, поскольку твердая фаза (например, магнитные шарики) отсутствует, в настоящем изобретении также представлена автоматическая замкнутая система для размножения клеток, которую можно интегрировать в известные системы размножения клеток, такие как Xuri Cell Expansion System W25 и WAVE Bioreactor 2/10 System, продаваемая GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom) или QUANTUM® Cell Expansion System, продаваемая TerumoBCT Inc. (Lakewood, CO, USA).

В некоторых аспектах способы, представленные в данном документе, могут включать наличие популяции клеток, которые несут по меньшей мере две специфические молекулы клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления первая молекула клеточной поверхности вовлечена в первичный активационный сигнал для популяции клеток, тогда как вторая молекула клеточной поверхности является вспомогательной молекулой на клеточной поверхности, которая вовлечена в обеспечение стимула для клеток. В конкретных вариантах осуществления популяцию клеток вводят в контакт с реагентом мультимеризации и/или олигомерными реагентами в виде частиц, с которыми обратимо или необратимо связан первый агент, который предоставляет в клетки первичный активационный сигнал, и второй агент, который вызывает или модулирует дополнительный сигнал, например, стимулирует вспомогательную молекулу на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток вводят в контакт с реагентом мультимеризации и/или олигомерным реагентом в виде частиц, с которыми обратимо связан первый агент, который предоставляет в клетки первичный активационный сигнал, и второй агент, который вызывает или модулирует дополнительный сигнал, например, стимулирует вспомогательную молекулу на поверхности клеток. Популяцией клеток, например, может быть популяция Т-клеток, в которых молекула клеточной поверхности представляет собой комплекс TCR/CD3, и молекулой клеточной поверхности является вспомогательная молекула CD28. В некоторых аспектах стимуляция посредством таких других дополнительных молекул может приводить к увеличению менее дифференцированных, а в некоторых случаях долгоживущих Т-клеток популяции, таких как долгоживущие Т-клетки памяти, по сравнению с обычной стимуляцией посредством CD28. В некоторых вариантах осуществления связывание как комплекса TCR/CD3 в качестве первичного активационного сигнала, так и связывание вспомогательной молекулы (например, CD28 или другой вспомогательной молекулы) могут быть необходимы для размножения/пролиферации Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, также могут быть дополнительно объединены для включения по меньшей мере одного селективного агента, обратимо связанного с тем же реагентом, например, тем же реагентом мультимеризации и/или олигомерными реагентами в виде частиц, в виде одного или обоих из первого или второго рецептор-связывающего агента (например, стимулирующего агента). В некоторых случаях можно усилить или увеличить одну или более особенностей, обусловленных инкубацией или культивированием, таких как стимуляция размножения (пролиферации), активации, костимуляции и/или выживания, в подмножестве Т-клеток, которые можно обратимо выбирать в присутствии по меньшей мере одного или более селективных агентов при инкубации или культивировании, что происходит также в присутствии одного или более стимулирующих агентов. Например,

как показано в примерах в данном документе, степень размножения в композиции Т-клеток в клетках CD8+ селективно увеличивалась, когда такие клетки инкубировали с мультимеризованным агентом, с которым было обратимо связано антитело против CD8 в дополнение к стимулирующим агентам антитела против CD3 и антитела против CD28. В некоторых вариантах осуществления одну или более особенностей, обусловленных инкубацией или культивированием, например, стимуляцию размножения (пролиферации), активации, костимуляции и/или выживания, можно увеличить по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз или более в подмножестве Т-клеток в культивируемой композиции, которые являются положительными для селективного маркера при инкубации в присутствии одного или более стимулирующих агентов и селективного агента, который специфически связывается с селективным маркером, по сравнению с инкубацией только в присутствии одного или более стимулирующих агентов, но не селективного агента. Данное смещение или избирательность клетки, такой как Т-клетка, позволяет регулировать особенности конечных точек конкретных подгрупп или популяций Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления селективным маркером может быть любой селективный маркер, который описан в данном документе. В некоторых вариантах осуществления селективный маркер выбирают из CD25, CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO.

В некоторых вариантах осуществления реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц содержит по меньшей мере один участок Z связывания, например, Z1, для обратимого связывания первого агента, а первый агент также содержит по меньшей мере один партнер С по связыванию, например, С1, при этом партнер С по связыванию, например, С1, способен обратимо или необратимо связываться с участком Z связывания, например, Z1, реагента мультимеризации и/или олигомерного реагента в виде частиц. Таким образом, первый агент при введении в контакт или инкубации с агентом мультимеризации может обратимо связываться с реагентом мультимеризации и/или олигомерным реагентом в виде частиц посредством обратимой связи, образованной между партнером С по связыванию, например, С1, и участком Z связывания, например, Z1. Кроме того, второй агент может содержать партнер С по связыванию, например, С2, при этом партнер С2 по связыванию способен обратимо связываться с участком Z связывания, например, Z2, соответственно, реагента мультимеризации и/или олигомерного реагента в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления второй агент при его введении в контакт или инкубации с агентом мультимеризации обратимо связывается с реагентом мультимеризации и/или олигомерными реагентами в виде частиц посредством обратимой связи, образованной между партнером С по связыванию, например, С1, и участком Z связывания, например, Z2. В некоторых случаях С1 и С2 могут быть одинаковыми или по существу одинаковыми и/или содержат одинаковый или по существу одинаковый фрагмент. В некоторых случаях Z1 и Z2 могут быть одинаковыми или по существу одинаковыми и/или содержат одинаковый или по существу одинаковый фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления использование в качестве партнеров С1 и С2 по связыванию фрагменты, которые связываются с одним и тем же участком связывания агента мультимеризации, имеет преимущество, заключающееся в том, что можно использовать один и тот же конкурентный реагент (первого партнера С1 по связыванию, а также второго партнера С2 по связыванию) или его аналог для нарушения, а в

некоторых случаях прекращения размножения популяции клеток-мишеней (например, Т-клеток) и для высвобождения данной популяции клеток-мишеней (например, Т-клеток) из агента мультимеризации.

В некоторых случаях для получения связывающих агентов (например, первого или второго рецептор-связывающих агентов, например, стимулирующих агентов или селективных агентов), чтобы иметь партнер С по связыванию, можно обеспечить партнер С по связыванию, например, С1 или С2, с помощью соответствующего вектора экспрессии, используемого для рекомбинантного получения агента (например, фрагмента антитела), так что партнер С по связыванию, например, С1 или С2, является частью пептида слияния с агентом либо на N-конце, либо на С-конце. В некоторых вариантах осуществления в контексте агента, который представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, партнер С по связыванию, например, С1 или С2, может иметься на С-конце либо легкой, либо тяжелой цепи. Также данная методика клонирования рекомбинантного белка, например, вариабельных доменов молекулы антитела, и рекомбинантного получения соответствующего белка, например, фрагмента антитела, хорошо известна специалисту в данной области, см., например, Skerra, A. (1994). В некоторых вариантах осуществления молекулу антитела можно создать из искусственных связывающих молекул с антителоподобными свойствами против заданной мишени, такой как CD3 или CD28, или других молекул дополнительного или стимулирующего агента, которые описаны, например, с помощью хорошо известных эволюционных методов, таких как фаговый дисплей (рассмотрено, например, в Kay, B.K. et al. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins - A Laboratory Manual, 1st Ed., Academic Press, New York NY; Lowman, H.B. (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26, 401-424, или Rodi, D.J., and Makowski, L. (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 10, 87-93), ribosome display (reviewed in Amstutz, P. et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12, 400-405) или mRNA display as reported in Wilson, D.S. et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 3750-3755.

II. Обратимые Системы реагентов и Связанные с ними варианты применения

В некоторых вариантах осуществления в способах задействуют обратимые системы, в которых по меньшей мере один агент (например, рецептор-связывающий агент или селективный агент), способный связываться с молекулой на поверхности клетки (молекулой клеточной поверхности), связан, например, обратимо связан, с реагентом. В некоторых случаях реагент содержит множество участков связывания, способных связываться, например, обратимо связываться с агентом (например, рецептор-связывающим агентом или селективным агентом). В некоторых случаях реагент представляет собой реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, имеющий связанный с ними по меньшей мере один агент. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один агент (например, рецептор-связывающий агент или селективный агент) содержит по меньшей мере один участок В связывания, который может специфически связывать эпитоп или область молекулы, а также содержит партнер по связыванию, также называемый в данном документе партнер С по связыванию, который специфически связывается по меньшей мере с одним участком Z связывания реагента. В некоторых случаях связывающее взаимодействие между партнером С по связыванию и по меньшей мере одним участком Z связывания представляет собой нековалентное взаимодействие. В некоторых случаях связывающее взаимодействие между партнером С по связыванию и по меньшей мере одним участком Z связывания представляет собой ковалентное взаимодействие. В некоторых вариантах осуществления связывающее взаимодействие, такое как нековалентное взаимодействие, между партнером С по связыванию и по меньшей мере одним участком Z связывания является

обратимым.

В некоторых вариантах осуществления обратимая связь может быть опосредована присутствием вещества, такого как конкурентный реагент (также называемый элюирующий реагент), который представляет собой или содержит участок связывания, который также способен связываться по меньшей мере с одним участком Z связывания. Обычно, вещество (например, конкурентный реагент) может выступать в качестве конкурента. Например, в некоторых вариантах осуществления партнер С по связыванию диссоциирует из по меньшей мере одного участка Z связывания в соответствии с его скоростью диссоциации. В некоторых аспектах после диссоциации партнер С по связыванию может (i) снова связываться по меньшей мере с одним участком Z связывания, или в некоторых аспектах (ii) будет предотвращено повторное связывание по меньшей мере с одним участком Z связывания, если вещество, например, конкурентный реагент, сперва связывается с одним или более участками Z связывания. В некоторых аспектах вещество может иметь более высокую аффинность связывания и/или присутствовать с высокой и/или достаточной концентрацией для участка Z связывания, имеющегося в реагенте и/или вследствие присутствия в более высоких концентрациях, чем партнер С по связыванию, уменьшая таким образом количество присоединенного и/или связанного партнера С по связыванию от одного или более партнеров С по связыванию. В некоторых вариантах осуществления аффинность вещества (например, конкурентного реагента) по меньшей мере для одного участка Z связывания больше чем аффинность партнера С по связыванию агента (например, рецептор-связывающего агента или селективного агента) по меньшей мере для одного участка Z связывания. В некоторых вариантах осуществления связь между участком Z связывания реагента и партнером С по связыванию агента (например, рецептор-связывающего агента или селективного агента) можно уменьшить или понизить за счет добавления вещества (например, конкурентного реагента), делая таким образом в некоторых аспектах связь агента (например, рецептор-связывающего агента или селективного агента) и реагента эффективно обратимой.

В данной области описаны и известны реагенты, которые можно использовать в таких обратимых системах, см., например, патент США №№ 5168049; 5506121; 6103493; 7776562; 7981632; 8298782; 8735540; 9023604; и международную опубликованную заявку РСТ №№ WO 2013/124474 и WO 2014/076277. Ниже описаны неограничивающие примеры реагентов и партнеров по связыванию, способных образовать обратимое взаимодействие, а также вещества (например, конкурентные реагенты), способные перевернуть такое связывание.

А. Реагент

В некоторых вариантах осуществления реагент содержит один или множество участков Z связывания, которые способны обратимо связываться с партнерами С по связыванию, представленными агентом (например, рецептор-связывающим агентом или селективным агентом). В некоторых вариантах осуществления реагент содержит множество участков Z связывания, каждый из которых способен специфически связываться с партнером С по связыванию, который содержится в агенте (например, рецептор-связывающем агенте или селективном агенте), таким образом чтобы реагент был способен обратимо связываться с множеством агентов (например, рецептор-связывающим агентом или селективным агентом), например, представляет собой реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц с одним или более связанным реагентом. В некоторых вариантах осуществления реагент представляет собой олигомер или полимер отдельных молекул (например, мономеров) или комплексы, которые

составляют отдельную молекулу (например, тетрамер), каждый из которых содержит по меньшей мере один участок Z связывания. В некоторых вариантах осуществления реагент содержит по меньшей мере два участка Z связывания, по меньшей мере три участка Z связывания, по меньшей мере четыре участка Z связывания, например, по 5 меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72 или более участков Z связывания. Все участки связывания могут быть одинаковыми, или множество участков связывания могут содержать один или более разных участков связывания (например, Z1, Z2, Z3 и т.д.). В некоторых вариантах осуществления реагент представляет собой олигомерный реагент в виде частиц и 10 содержит по меньшей мере 72, 120, 140, 200, 240, 280, 320, 360, 400, 440, 480, 520, 560, 600, 640, 680, 720, 760, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 или по меньшей мере 100000 участков Z связывания.

В некоторых вариантах осуществления один или более агентов (например, рецептор-связывающих агентов или селективных агентов) связаны, например, обратимо связаны 15 с реагентом, например, посредством одного или множества участков Z связывания, присутствующих на реагенте. В некоторых случаях это приводит к агентам (например, рецептор-связывающим агентам или селективным агентам), расположенным близко друг к другу таким образом, чтобы мог возникнуть эффект авидности, если клетку-мишень, имеющую (по меньшей мере две копии) молекулы клеточной поверхности, 20 вводят в контакт с агентом (например, рецептор-связывающим агентом или селективным агентом), который имеет один или более участков В связывания, способных связывать конкретную молекулу.

В некоторых вариантах осуществления два или более разных агента (например, рецептор-связывающих агента или селективных агента), которые являются одинаковыми, 25 т.е. содержат одинаковый участок В связывания, могут быть обратимо связаны с реагентом. В некоторых вариантах осуществления два или более разных агента, содержащих одинаковый участок В связывания, обратимо связаны с олигомерным реагентом в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере два разных (вида) агентов (например, рецептор-связывающих агентов 30 или селективных агентов), а в некоторых случаях три или четыре разных (видов) агентов, например, два или более разных рецептор-связывающих агентов и/или селективный агент. Например, в некоторых вариантах осуществления реагент может быть обратимо связан с первым агентом (например, рецептор-связывающим агентом или селективным агентом), содержащим участок В1, В2, В3 или В4 и т.д. Связывания, и вторым агентом 35 (например, рецептор-связывающим агентом или селективным агентом), содержащим другой участок связывания, например, другой участок В1, В2, В3 или В4 связывания. В некоторых случаях участок связывания первого агента и второго агента может быть одинаковым. Например, в некоторых аспектах каждый из по меньшей мере двух агентов (например, рецептор-связывающий агент или селективный агент) могут связываться с 40 одной и той же молекулой. В некоторых случаях участок связывания первого агента и второго агента могут быть разными. В некоторых аспектах каждый из по меньшей мере двух агентов (например, рецептор-связывающий агент или селективный агент) могут связываться с другой молекулой, такой как первая молекула, вторая молекула и так далее. В некоторых случаях разные молекулы, такие как молекулы клеточной 45 поверхности, могут присутствовать на одной и той же клетке-мишени. В других случаях разные молекулы, таких как молекулы клеточной поверхности, могут присутствовать на разных клетках-мишенях, которые присутствуют в той же популяции клеток. В некоторых случаях третий, четвертый и так далее агент (например, рецептор-

связывающий агент или селективный агент) может быть связан с тем же реагентом, каждый из которых содержит дополнительный другой участок связывания.

В некоторых вариантах осуществления два или более разных агента (например, рецептор-связывающих агента или селективных агента) содержат одинаковый партнер С по связыванию. В некоторых вариантах осуществления два или более разных агента (например, рецептор-связывающих агента или селективных агента) содержат разные партнеры по связыванию. В некоторых аспектах первый агент (например, рецептор-связывающий агент или селективный агент) может иметь партнер С1 по связыванию, который может специфически связываться с участком Z1 связывания, присутствующим на реагенте, а второй агент (например, рецептор-связывающие агенты или селективный агент) может иметь партнер С2 по связыванию, который может специфически связываться с участком Z1 связывания или с участком Z2 связывания, присутствующим на реагенте. Таким образом, в некоторых случаях множество участков Z связывания, представленных реагентом, включает участки Z1 и Z2 связывания, которые способны обратимо связываться с партнерами С1 и С2 по связыванию, соответственно, представленными агентом (например, рецептор-связывающим агентом или селективным агентом). В некоторых вариантах осуществления С1 и С2 одинаковые, и/или Z1 и Z2 одинаковые. В других аспектах один или более из множества участков Z связывания могут быть разными. В других случаях один или более из множества партнеров С по связыванию могут быть разными. Специалист в данной области может выбрать любую комбинацию разных партнеров С по связыванию, которые совместимы с реагентом, содержащим участки Z связывания, при условии, что каждый из партнеров С по связыванию способен взаимодействовать, например, специфически связываться с одним из участков Z связывания.

В некоторых вариантах осуществления реагент представляет собой стрептавидин, мутеин или аналог стрептавида, авидин, мутеин или аналог авидина (такой как нейтравидин) или их смесь, причем такой реагент содержит один или более участков Z связывания для обратимой связи с партнером С по связыванию. В некоторых вариантах осуществления партнером С по связыванию может быть биотин, производное или аналог биотина, или стрептавидин-связывающий пептид или другая молекула, которая способна специфически связываться со стрептавидином, мутеином или аналогом стрептавида, авидином или мутеином или аналогом авидина. В некоторых вариантах осуществления реагент представляет собой или содержит стрептавидин, авидин, аналог или мутеин стрептавида или аналог или мутеин авидина, который обратимо связывает биотин, аналог биотина или их биологически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления реагент представляет собой или содержит аналог или мутеин стрептавида или аналог или мутеин авидина, который обратимо связывает стрептавидин-связывающий пептид. В некоторых вариантах осуществления веществом (например, конкурентный реагент) может быть биотин, производное или аналог биотина или стрептавидин-связывающий пептид, способный конкурировать за связывание с партнером С по связыванию для одного или более участков Z связывания. В некоторых вариантах осуществления партнер С по связыванию и вещество (например, конкурентный реагент) разные, и вещество (например, конкурентный реагент) демонстрирует более высокую аффинность связывания для одного или более участков Z связывания по сравнению с аффинностью партнера по связыванию.

В некоторых вариантах осуществления стрептавидином может быть стрептавидин дикого типа, мутеины или аналоги стрептавида, такие как стрептавидиноподобные полипептиды. Также в некоторых аспектах авидин представляет собой авидин дикого

типа или мутеины или аналоги авидина, такие как нейтравидин, дегликозилированный авидин с модифицированными аргининами, который обычно демонстрирует более нейтральный pH и доступен в качестве альтернативы нативному авидину. Обычно, дегликозилированные, нейтральные формы авидина включают такие продаваемые формы как «экстравидин», продаваемый Sigma Aldrich, или «Нейтравидин» продаваемый, например, Thermo Scientific или Invitrogen.

В некоторых вариантах осуществления реагент представляет собой стрептавидин или мутеин или аналог стрептавидаина. В некоторых вариантах осуществления стрептавидин дикого типа (wt-стрептавидин) имеет аминокислотную последовательность, раскрытую в Argarana et al, *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 1871-1882 (SEQ ID NO: 1). Обычно, стрептавидин в природе существует в виде тетрамера из четырех идентичных субъединиц, т.е. Он представляет собой гомотетрамер, где каждая субъединица содержит один участок связывания для биотина, производного или аналога биотина или имитатор биотина. Иллюстративной последовательностью субъединицы стрептавидаина является последовательность аминокислот, приведенная в SEQ ID NO: 1, но такая последовательность также может содержать последовательность, присутствующую в его гомологах из другого вида *Streptomyces*. В частности, каждая субъединица стрептавидаина может демонстрировать сильную аффинность связывания для биотина с константой диссоциации (K_d) порядка приблизительно 10^{-14} М. В некоторых случаях стрептавидин может существовать в виде моновалентного тетрамера, в котором только один из четырех участков связывания является функциональным (Howarth et al. (2006) *Nat. Methods*, 3:267-73; Zhang et al. (2015) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 463:1059-63)), двухвалентного тетрамера, в котором два из четырех участков связывания являются функциональными (Fairhead et al. (2013) *J. Mol. Biol.* 426:199-214), или может быть представлен в мономерной или димерной форме (Wu et al. (2005) *J. Biol. Chem.* 280:23225-31; Lim et al. (2010) *Biochemistry*, 50:8682-91).

В некоторых вариантах осуществления стрептавидин может быть в любой форме, например, стрептавидин дикого типа или немодифицированный, такой как стрептавидин из вида *Streptomyces* или его функционально активный фрагмент, который содержит по меньшей мере одну функциональную субъединицу, содержащую участок связывания для биотина, производного или аналога биотина или имитатора биотина, такого который обычно содержит по меньшей мере одну функциональную субъединицу стрептавидаина дикого типа из *Streptomyces avidinii*, приведенную в SEQ ID NO: 1, или ее функционально активный фрагмент. Например, в некоторых вариантах осуществления стрептавидин может содержать фрагмент стрептавидаина дикого типа, который укорочен на N- и/или C-конце. Такие минимальные стрептавидины включают любые, которые начинаются на N-конце в области позиций аминокислот 10-16 SEQ ID NO: 1 и заканчиваются на C-конце в области позиций аминокислот 133-142 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления функционально активный фрагмент стрептавидаина содержит последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления стрептавидин, такой как приведен в SEQ ID NO: 2, может дополнительно содержать N-концевой метионин в позиции, соответствующей Ala13 с нумерацией, приведенной в SEQ ID NO: 1. Ссылка на позицию остатков в стрептавидине или мутеинах стрептавидаина приведена со ссылкой на нумерацию остатков в SEQ ID NO: 1.

В некоторых аспектах мутеины стрептавидаина содержат полипептиды, которые отличаются от последовательности немодифицированного стрептавидаина или стрептавидаина дикого типа одной или более заменой, делецией или добавлением

аминокислоты, но которые содержат по меньшей мере одну функциональную субъединицу, содержащую участок связывания для биотина, производного или аналога биотина или стрептавидин-связывающего пептида. В некоторых аспектах стрептавидиноподобными полипептидами и мутеинами стрептавидина могут быть полипептиды, которые по существу иммунологически эквивалентны стрептавидину дикого типа и в частности способны связывать биотин, производные биотина или аналоги биотина с такой же или иной аффинностью, чем у wt-стрептавидина. В некоторых случаях стрептавидиноподобные полипептиды или мутеины стрептавидина могут содержать аминокислоты, которые не являются частью стрептавидина дикого типа, или они могут содержать только часть стрептавидина дикого типа. В некоторых вариантах осуществления стрептавидиноподобными полипептидами являются полипептиды, которые не идентичны стрептавидину дикого типа, поскольку у хозяина нет ферментов, которые требуются, чтобы трансформировать продуцируемый хозяином полипептид в структуру стрептавидина дикого типа. В некоторых вариантах осуществления стрептавидин также может присутствовать в виде тетрамеров стрептавидина и димеров стрептавидин, в частности гомотетрамеров стрептавидин, гомодимеров стрептавидина, гетеротетрамеров стрептавидина и гетеродимеров стрептавидина. Как правило, каждая субъединица обычно имеет участок связывания для биотина или аналогов биотина или для стрептавидин-связывающих пептидов. Примеры стрептавидинов или мутеинов стрептавидина приведены, например, в WO 86/02077, DE 19641876 A1, US 6022951, WO 98/40396 или WO 96/24606.

В некоторых вариантах осуществления биотин обычно используют в его естественной d-стереоизомерной форме, т.е. D-биотин. В некоторых вариантах осуществления биотином является D-биотин. В конкретных вариантах осуществления примеры аналогов и/или производных биотина включают, но без ограничения, D-биотин, N-кетонный аналог биотина, кетонный аналог биотина, N-азидовый аналог биотина, азидовый аналог биотина, N-ацилазидовый аналог биотина, NBD-GABA аналог биотина, 1,2-диаминовый аналог биотина, N-алкиновый аналог биотина, тетратиоловый аналог биотина, N-гидроксисукцинимид-иминобиотин, иминобиотин, амидобиотин N-гидроксисукцинимид-иминобиотин, амидобиотины, дестиобиотин, биотинсульфон, капроиламидобиотин и биоцитин. В некоторых аспектах аналоги биотина представляют собой или содержат биотинсульфон, 2'-тиобиотин, 2'-иминобиотин, d-дестиобиотин, dl-дестиобиотин, сложный метиловый эфир dl-дестиобиотина и другие производные имидазолидона и производные, описанные у Green, N.M. (1975) в *Advances in Protein Chemistr* (Anson, M.L. И Edsell, J.T. Eds), Vol. 29, pp. 85-133, Academic Press, New York. В некоторых вариантах осуществления аналогом или производным биотина является D-биотин, дестиобиотин и/или иминобиотин.

В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавидина может содержать аминокислоты, которые не являются частью немодифицированного стрептавидина или стрептавидина дикого типа, или может содержать только часть стрептавидина дикого типа или немодифицированного стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавидина содержит по меньшей мере одну субъединицу, которая может иметь одну более аминокислотную замену (замены) по сравнению с субъединицей немодифицированного стрептавидина или стрептавидина дикого типа, например, по сравнению с субъединицей стрептавидина дикого типа, приведенной в SEQ ID NO: 1, или ее функционально активным фрагментом, например, приведенным в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна субъединица мутеина стрептавидина может иметь по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,

16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных отличий по сравнению со стрептавидином дикого типа или немодифицированным стрептавидином и/или содержит по меньшей мере одну субъединицу, содержащую аминокислотную последовательность, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 1, 2 или 59, где такой мутеин стрептавидина демонстрирует функциональную активность, чтобы связывать биотин, производное или аналог биотина или имитатор биотина. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены (замещения) представляют собой консервативные или неконсервативные мутации. В данной области известны примеры мутеинов стрептавидина, см., например, патент США № 5168049; 5506121; 6022951; 6156493; 6165750; 6103493; или 6368813; или международную опубликованную заявку PCT № WO 2014/076277.

В некоторых вариантах осуществления стрептавидин или мутеин стрептавидина содержит белки, содержащие одну или больше чем одну функциональную субъединицу, содержащую один или более участков Z связывания для биотина, производного или аналога биотина или стрептавидин-связывающего пептида, например, два или более, три или более, четыре или более, а в некоторых случаях 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более функциональных субъединиц. В некоторых вариантах осуществления стрептавидин или мутеин стрептавидина может содержать мономер; димер, включая гетеродимер или гомодимер; тетрамер, включая гомотетрамер, гетеротетрамер, моновалентный тетрамер или двухвалентный тетрамер; или может содержать его мультимеры или олигомеры более высокого порядка.

В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания, например, константа диссоциации (K_d) стрептавидина или мутеина стрептавидина для партнера по связыванию лиганда пептида составляет менее чем 1×10^{-4} М, 5×10^{-4} М, 1×10^{-5} М, 5×10^{-5} М, 1×10^{-6} М, 5×10^{-6} М или 1×10^{-7} М, но обычно более чем 1×10^{-13} М, 1×10^{-12} М или 1×10^{-11} М. Например, пептидные последовательности (Strep-tags), такие как раскрыты в патенте США № 5506121, могут выступать в качестве имитаторов биотина и демонстрируют аффинность связывания для стрептавидина, например, с K_d приблизительно между 10^{-4} и 10^{-5} М. В некоторых случаях аффинность связывания можно дополнительно улучшить за счет получения мутации в молекуле стрептавидина, см., например, патент США № 6103493 или международную опубликованную заявку PCT № WO 2014/076277. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания можно определить с помощью способов, известных в данной области, например, любых, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления реагент, такой как стрептавидин или мутеин стрептавидина, демонстрирует аффинность связывания для партнера по связыванию лиганда пептида, причем партнером по связыванию лиганда пептида может быть партнер С по связыванию, присутствующий в агенте (например, рецептор-связывающем агенте или селективном агенте). В некоторых вариантах осуществления пептидная последовательность содержит последовательность с общей формулой, приведенной в SEQ ID NO: 9, например, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления пептидная последовательность имеет общую формулу, приведенную в SEQ ID NO: 11, такую как приведена в SEQ ID NO: 12. В одном примере пептидной последовательностью является Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly

(также называемая Strep-tag®, приведенная в SEQ ID NO: 7). В одном примере пептидной последовательностью является Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (также называемая Strep-tag® II, приведенная в SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления лиганд пептида содержит последовательное расположение по меньшей мере двух стрептавидин-связывающих модулей, при этом расстояние между двумя модулями составляет по меньшей мере 0 и не больше чем 50 аминокислот, при этом один связывающий модуль имеет 3-8 аминокислот и содержит по меньшей мере последовательность His-Pro-Хаа (SEQ ID NO: 9), где Хаа представляет собой глутамин, аспарагин или метионин, и, при этом другой связывающий модуль имеет такой же или другой лиганд пептида стрептавидина, такой как приведен в SEQ ID NO: 11 (см., например, международную опубликованную заявку РСТ № WO 02/077018; патент США № 7981632). В некоторых вариантах осуществления лиганд пептида содержит последовательность, имеющую формулу, приведенную в любой из SEQ ID NO: 13 или 14. В некоторых вариантах осуществления лиганд пептида имеет последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 15-19. В большинстве случаев все эти стрептавидин-связывающие пептиды связываются с одним и тем же участком связывания, а именно биотиновым участком связывания стрептавидина. если в качестве партнеров С по связыванию, например, С1 и С2, используют один или более таких стрептавидин-связывающих пептидов, реагент мультимеризации и/или олигомерные реагенты в виде частиц, связанные с одним или более агентами посредством партнера С по связыванию, обычно состоят из одного или более мутеинов стрептавидина.

В некоторых вариантах осуществления реагент представляет собой или содержит мутеин стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления мутеины стрептавидина содержат одну или более мутаций (например, аминокислотных замен) по сравнению со стрептавидином дикого типа, приведенным в SEQ ID NO: 1, или его биологически активной частью. Например, биологически активные части стрептавидина могут содержать варианты стрептавидина, более короткие на N- и/или C-конце, которые в некоторых случаях называют минимальный стрептавидин. В некоторых вариантах осуществления минимальный стрептавидин с укороченным N-концом, на котором можно сделать любую из мутаций, начинается на N-конце в области позиций аминокислот 10-16 и завершается на C-конце в области позиций аминокислот 133-142 по сравнению с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления стрептавидин с укороченным N-концом, на котором можно сделать любую из мутаций, содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2 или 59. В некоторых вариантах осуществления минимальный стрептавидин содержит аминокислотную последовательность от позиции Ala13 до Ser139 и необязательно вместо Ala13 имеет N-концевой метиониновый остаток. Для целей данного документа нумерация позиций аминокислот везде относится к нумерации wt-стрептавидина, приведенной в SEQ ID NO: 1 (например, Argarana et al. *Nucleic Acids Res.* 14 (1986), 1871-1882, см. также ФИГ. 9).

В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавидина представляет собой мутант, который описан в патенте США № 6103493. В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавидина содержит по меньшей мере одну мутацию внутри области позиций 44-53 аминокислот, основанную на аминокислотной последовательности стрептавидина дикого типа, такой как приведена в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавидина содержит мутацию в одном или более остатках 44, 45, 46 и/или 47. В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавидина содержит замену Glu в позиции 44 стрептавидина дикого типа

гидрофобной алифатической аминокислотой, например, Val, Ala, Ile или Leu, любой аминокислоты в позиции 45, алифатической аминокислотой, такой как гидрофобная алифатическая аминокислота в позиции 46, и/или замену Val в позиции 47 основной аминокислотой, например, Arg или Lys, например, обычно Arg. В некоторых вариантах осуществления в позиции 46 находится Ala, и/или в позиции 47 находится Arg, и/или в позиции 44 находится Val или Ile. В некоторых вариантах осуществления мутант стрептавидина содержит остатки Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷, такие как приведены в иллюстративных мутеинах стрептавидина, содержащих последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4 или 60 (также известную как мутант стрептавидина 1, SAM1). В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавидина содержит остатки Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷, такие как приведены в иллюстративных мутеинах стрептавидина, содержащих последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 5, 6 или 61 (также известную как SAM2). В некоторых случаях такие мутеины стрептавидина описаны, например, в патенте США 6103493 и продаются под торговой маркой Strep-Tactin®.

В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавидина представляет собой мутант, который описан в международной опубликованной заявке PCT №№ WO 2014/076277. В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавидина содержит по меньшей мере два цистеиновых остатка в области позиций 44-53 аминокислот со ссылкой на положения аминокислот, приведенные в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления цистеиновые остатки присутствуют в позициях 45 и 52, создавая дисульфидный мостик, связывающий эти аминокислоты. В таком варианте осуществления аминокислотой 44 обычно является глицин или аланин, аминокислотой 46 обычно является аланин или глицин, а аминокислотой 47 обычно является аргинин. В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавидина содержит по меньшей мере одну мутацию или аминокислотное отличие в области аминокислотных остатков 115-121 со ссылкой на положения аминокислот, приведенные в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавидина содержит по меньшей мере одну мутацию в аминокислотной позиции 117, 120 и 121 и/или делецию аминокислот 118 и 119 и замещение по меньшей мере аминокислотной позиции 121.

В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавидина содержит мутацию в позиции, соответствующей позиции 117, причем мутация может представлять собой большой гидрофобный остаток, например, Trp, Tyr или Phe, или заряженный остаток, например, Glu, Asp или Arg, или гидрофильный остаток, например, Asn или Gln, или в некоторых случаях гидрофобные остатки Leu, Met или Ala, или полярные остатки Thr, Ser или His. В некоторых вариантах осуществления мутация в позиции 117 сочетается с мутацией в позиции, соответствующей позиции 120, причем эта мутация может представлять собой маленький остаток, например, Ser или Ala или Gly, и мутацией в позиции, соответствующей позиции 121, причем эта мутация может представлять собой гидрофобный остаток, например, объемный гидрофобный остаток, например, Trp, Tyr или Phe. В некоторых вариантах осуществления мутация в позиции 117 сочетается с мутацией в позиции, соответствующей позиции 120 стрептавидина дикого типа, приведенного в SEQ ID NO:1 или его биологически активного фрагмента, причем этой мутацией может быть гидрофобный остаток, такой как Leu, Ile, Met или Val или обычно Tyr или Phe, и мутацией в позиции, соответствующей позиции 121, по сравнению с позициями стрептавидина дикого типа, приведенного в SEQ ID NO:1 или его биологически активного фрагмента, причем эта мутация может представлять собой маленький остаток, например, Gly, Ala или Ser, или с Gln или гидрофобный остаток,

например, Leu, Val, Ile, Trp, Tyr, Phe или Met. В некоторых вариантах осуществления такие мутеины также могут содержать остатки Val44-Thr45-Ala46-Arg47 или остатки Ile44-Gly45-Ala46-Arg47. В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавидина содержит остатки Val44, Thr45, Ala46, Arg47, Glu117, Gly120 и Tyr121. В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавидин содержит последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO:27 или SEQ ID NO:28, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 28, содержит остатки Val44, Thr45, Ala46, Arg47, Glu117, Gly120 и Tyr121 и демонстрирует функциональную активность связывания с биотином, аналогом биотина или стрептавидин-связывающим пептидом.

В некоторых вариантах осуществления молекула, например, стрептавидин или мутеин стрептавидина имеет приблизительно 5-30 первичных аминов, которые в некоторых случаях могут включать в себя N-концевой амин и/или один или более лизиновых остатков. В конкретных вариантах осуществления молекула представляет собой тетрамер стрептавидина или мутеина стрептавидина, включая любой из описанных мутеинов стрептавидина, которая в виде тетрамера содержит больше чем 5 первичных аминов, например, обычно 5-40 или 15-35, например, обычно приблизительно 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 14, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 или более первичных аминов. В некоторых вариантах осуществления молекулой является стрептавидин или мутеин стрептавидина или его укороченный фрагмент, например, любая из таких описанных молекул. В конкретных вариантах осуществления молекула представляет собой тетрамер стрептавидина или мутеина стрептавидина, содержащий последовательность, приведенную в любой из SEQ ID NO:2, 4, 6, 27, 59, 60 или 61, которая в виде тетрамера представляет собой молекулу, которая содержит 20 первичных аминов, включая 1 N-концевой амин и 4 лизина на мономер.

В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавидина может содержать любую из приведенных выше мутаций в любой комбинации, а полученный мутеин стрептавидина может демонстрировать аффинность связывания, характеризующуюся константой диссоциации (K_d), которая составляет $3,7 \times 10^{-5}$ М или менее для лиганда пептида (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; также называется Strep-tag®, приведено в SEQ ID NO: 7) и/или, которая составляет $7,1 \times 10^{-5}$ М или менее для лиганда пептида (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; также называется Strep-tag® II, приведено в SEQ ID NO: 8) и/или которая составляет $7,0 \times 10^{-5}$ М, $6,0 \times 10^{-5}$ М, $5,0 \times 10^{-5}$ М, $4,0 \times 10^{-5}$ М, $3,0 \times 10^{-5}$ М, $2,0 \times 10^{-5}$ М, $1,0 \times 10^{-5}$ М, $9,0 \times 10^{-6}$ М, $8,0 \times 10^{-6}$ М, $7,0 \times 10^{-6}$ М, $6,0 \times 10^{-6}$ М, $5,0 \times 10^{-6}$ М, $4,0 \times 10^{-6}$ М, $3,0 \times 10^{-6}$ М, $2,0 \times 10^{-6}$ М, $1,0 \times 10^{-6}$ М, $9,0 \times 10^{-7}$ М, $8,0 \times 10^{-7}$ М, $7,0 \times 10^{-7}$ М, $6,0 \times 10^{-7}$ М, $5,0 \times 10^{-7}$ М, $4,0 \times 10^{-7}$ М, $3,0 \times 10^{-7}$ М, $2,0 \times 10^{-7}$ М или $1,0 \times 10^{-7}$ М или менее, но обычно больше чем 1×10^{-13} М, 1×10^{-12} М или 1×10^{-11} М для любого из лигандов пептидов, приведенных в любой из SEQ ID NO:7-19.

В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавидина может содержать любую из приведенных выше мутаций в любой комбинации, а полученный мутеин стрептавидина может демонстрировать аффинность связывания, характеризующуюся константой ассоциации (K_a), которая составляет $2,7 \times 10^4$ М⁻¹ или более для лиганда пептида (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; также называется Strep-tag®, приведено в

SEQ ID NO: 7) и/или которая составляет $1,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ или более для лиганда пептида (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; также называется Strep-tag® II, приведено в SEQ ID NO: 8) и/или которая составляет $1,43 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $1,67 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $3,33 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1,11 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1,25 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1,43 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1,67 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $3,33 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1,11 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1,25 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1,43 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1,67 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $3,33 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ или более, но обычно менее чем $1 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ или $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ для любого из лигандов пептида, приведенных в любой из SEQ ID NO: 7-19.

В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавицина демонстрирует последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 3-6, 27, 28, 60 или 61, или последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с последовательностью аминокислот, приведенной в любой из SEQ ID NO: 3-6, 27, 28, 60 или 61, и демонстрирует аффинность связывания, характеризующуюся константой диссоциации (K_d), которая составляет $3,7 \times 10^{-5} \text{ M}$ или менее для лиганда пептида (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; также называется Strep-tag®, приведено в SEQ ID NO: 7) и/или которая составляет $7,1 \times 10^{-5} \text{ M}$ или менее для лиганда пептида (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; также называется Strep-tag® II, приведено в SEQ ID NO: 8) и/или которая составляет $7,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $6,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $5,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $4,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $3,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $9,0 \times 10^{-6} \text{ M}$, $8,0 \times 10^{-6} \text{ M}$, $7,0 \times 10^{-6} \text{ M}$, $6,0 \times 10^{-6} \text{ M}$, $5,0 \times 10^{-6} \text{ M}$, $4,0 \times 10^{-6} \text{ M}$, $3,0 \times 10^{-6} \text{ M}$, $2,0 \times 10^{-6} \text{ M}$, $1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$, $9,0 \times 10^{-7} \text{ M}$, $8,0 \times 10^{-7} \text{ M}$, $7,0 \times 10^{-7} \text{ M}$, $6,0 \times 10^{-7} \text{ M}$, $5,0 \times 10^{-7} \text{ M}$, $4,0 \times 10^{-7} \text{ M}$, $3,0 \times 10^{-7} \text{ M}$, $2,0 \times 10^{-7} \text{ M}$ или $1,0 \times 10^{-7} \text{ M}$ или менее, но обычно больше чем $1 \times 10^{-13} \text{ M}$, $1 \times 10^{-12} \text{ M}$ или $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ для любого из лигандов пептида, приведенных в любой из SEQ ID NO: 7-19.

В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавицина также демонстрирует связывание с другими лигандами стрептавицина, такими как, но без ограничения, биотин, иминобиотин, липоевая кислота, дестиобиотин, диаминобиотин, НАВА (гидроксиазобензол-бензойная кислота) и/или диметил-НАВА. В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавицина демонстрирует аффинность связывания для другого лиганда стрептавицина, такого как биотин или дестиобиотин, большую чем аффинность связывания мутеина стрептавицина для лиганда пептида имитатора биотина, такого как приведен в любой из SEQ ID NO: 7-19. В некоторых вариантах осуществления мутеин стрептавицина демонстрирует аффинность связывания для другого лиганда стрептавицина, такого как биотин или дестиобиотин, такую же, приблизительно такую же или ниже чем аффинность связывания мутеина стрептавицина для лиганда пептида имитатора биотина, такого как приведен в любой из SEQ ID NO: 7-19. В некоторых вариантах осуществления биотин или аналог или производное биотина (например, дестиобиотин) в представленных способах можно использовать в качестве конкурентного реагента. Например, взаимодействие мутеина стрептавицина, обозначенного Strep-tactin® (например, содержащего последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4 или 60) с лигандом пептида, обозначенным STREP-TAG® II (например, приведено в SEQ ID NO: 8) характеризуется аффинностью связывания с K_d приблизительно 10^{-6} M по сравнению с приблизительно 10^{-13} M для взаимодействия

биотин-стрептавидин. В некоторых случаях биотин, который может связываться с высокой аффинностью с Strep-Tactin® с K_d между или между приблизительно 10^{-10} и 10^{-13} М, может конкурировать с STREP-TAG® II за участок связывания.

5 В некоторых случаях реагент содержит по меньшей мере две хелатирующие группы К, которые могут быть способны связываться с ионом переходного металла. В некоторых вариантах осуществления реагент может быть способен связываться с олигогистидиновой аффинной меткой, глутатион-S-трансферазой, кальмодулином или его аналогом, кальмодулин-связывающим пептидом (CBP), FLAG-пептидом, HA-tag, 10 мальтозосвязывающим белком (MBP), эпитопом HSV, эпитопом тус и/или биотинилированным белком-носителем.

В некоторых вариантах осуществления реагент представляет собой олигомер или полимер. В некоторых вариантах осуществления олигомер или полимер можно создать путем прямого или непрямого связывания отдельных молекул белка, как он существует 15 в природе, либо путем прямого или непрямого связывания отдельных молекул мономера или комплекса субъединиц, которые составляют отдельную молекулу (например, прямого или непрямого связывания димеров, тримеров, тетрамеров и т.д. белка, как он существует в природе). Например, в некоторых вариантах осуществления тетрамерный стрептавидин или авидин может называться отдельная молекула или 20 наименьший строительный блок соответствующего олигомера или полимера. В конкретных вариантах осуществления тетрамерный гомодимер или гетеродимер стрептавидина или авидина может называться отдельная молекула или наименьший строительный блок соответствующего олигомера или полимера. В некоторых вариантах осуществления олигомер или полимер может иметь связь по меньшей мере из 2 25 отдельных молекул белка (например, представляет собой 2-мер) или может быть по меньшей мере 3-мер, 4-мер, 5-мер, 6-мер, 7-мер, 8-мер, 9-мер, 10-мер, 11-мер, 12-мер, 13-мер, 14-мер, 15-мер, 16-мер, 17-мер, 18-мер, 19-мер, 20-мер, 25-мер, 30-мер, 35-мер, 40-мер, 45-мер или 50-мер из отдельных молекул белка (например, мономеров, тетрамеров). В некоторых вариантах осуществления олигомером может быть по 30 меньшей мере 100-мер, 200-мер, 300-мер, 400-мер, 500-мер, 1000-мер, 1500-мер, 2000-мер, 2500-мер, 3000-мер или по меньшей мере 3500-мер из отдельных молекул белка. В некоторых вариантах осуществления реагент представляет собой олигомерный реагент в виде частиц, который описан в разделе II(A)(1) или (2), или представляет собой олигомерный реагент в виде частиц, который получен с помощью способов, описанных 35 в разделе II(B)(3).

Олигомеры можно создать с использованием любых способов, известных в данной области, например, любых описанных в опубликованной заявке на выдачу патента США № US 2004/0082012. В некоторых вариантах осуществления олигомер или полимер 40 содержит две или более отдельные молекулы, которые могут быть сшиты, например, с помощью полисахаридного или бифункционального линкера.

В некоторых вариантах осуществления олигомер или полимер получают путем сшивания отдельных молекул или комплекса субъединиц, которые составляют отдельную молекулу, в присутствии полисахарида. В некоторых вариантах 45 осуществления олигомеры или полимеры можно получать путем введения карбоксильных остатков в полисахарид, например, декстран. В некоторых аспектах отдельные молекулы реагента (например, мономеры, тетрамеры) можно соединить посредством первичных аминогрупп внутренних лизиновых остатков и/или свободного N-конца с карбоксильными группами в каркасе декстрана с использованием обычной

карбодимидной химии. В некоторых вариантах осуществления реакцию соединения проводят при молярном отношении приблизительно 60 молей отдельных молекул реагента (например, мономеров, тетрамеров) на моль декстрана.

В некоторых вариантах осуществления реагент представляет собой олигомер или полимер одного или более из стрептавидина или авидина или любого из аналога или мутеина стрептавидина или аналога или мутеина авидина (например, нейтравидина). В некоторых вариантах осуществления участок Z связывания представляет собой природный биотиновый участок связывания авидина или стрептавидина, для которого может быть до четырех участков связывания в отдельной молекуле (например, тетрамер содержит четыре участка Z связывания), за счет чего гомотетрамер может содержать до 4 одинаковых участков связывания, т.е. Z1, тогда как гетеро-тетрамер может содержать до 4 участков связывания, которые могут быть разными, например, содержит Z1 и Z2. В некоторых вариантах осуществления олигомер создают или получают из множества отдельных молекул (например, множества гомотетрамеров) того же стрептавидина, мутеина стрептавидина, авидина или мутеина авидина, в каком случае каждый участок Z связывания, например, Z1, олигомера одинаковый. Например, в некоторых случаях олигомер может содержать множество участков Z1 связывания, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 45, 50 или более участков Z1 связывания. В некоторых вариантах осуществления олигомер создают или получают из множества отдельных молекул, которыми могут быть гетеро-тетрамеры стрептавидина, мутеина стрептавидина, авидина или мутеина авидина, и/или из множества двух или более разных отдельных молекул (например, разных гомотетрамеров) стрептавидина, мутеина стрептавидина, авидина или мутеина авидина, которые отличаются своими участками Z связывания, например, Z1 и Z2, в каком случае в олигомере может присутствовать множество разных участков Z связывания, например, Z1 и Z2. Например, в некоторых случаях олигомер может содержать множество участков Z1 связывания и множество участков Z связывания, которые в комбинации могут содержать по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 45, 50 или более объединенных участков Z1 и Z2 связывания.

В некоторых случаях соответствующий олигомер или полимер можно сшивать с помощью полисахарида. В одном варианте осуществления на первой стадии можно получать олигомеры или полимеры стрептавидина или авидина или аналогов стрептавидина или авидина (например, нейтравидина) путем введения карбоксильных остатков в полисахарид, например, декстран, по существу, как описано в Noguchi, A, et al, Bioconjugate Chemistry (1992) 3,132-137. В некоторых таких аспектах на второй стадии стрептавидин или авидин или их аналоги затем можно соединять посредством первичных аминогрупп внутреннего лизинового остатка и/или свободного N-конца с карбоксильными группами в каркасе декстрана с использованием обычной карбодимидной химии. В некоторых случаях шитые олигомеры или полимеры стрептавидина или авидина или любой из аналогов стрептавидина или авидина также можно получать путем сшивания посредством бифункциональных молекул, служащих в качестве линкера, таких как глутардиальдегид, или с помощью других способов, описанных в данной области.

В некоторых вариантах осуществления олигомер или полимер получают путем сшивания отдельных молекул или комплекса субъединиц, которые составляют отдельную молекулу, с использованием бифункционального линкера или другого

химического линкера, такого как глутардиальдегид, или с помощью других способов, известных в данной области. В некоторых аспектах сшитые олигомеры или полимеры стрептавидина или авидина или любого из мутеина или аналога стрептавидина или авидина можно получать путем сшивания отдельных молекул стрептавидина или авидина посредством бифункциональных молекул, служащих в качестве линкера, таких как глутардиальдегид, или с помощью других способов, описанных в данной области. Например, можно создавать олигомеры мутеинов стрептавидина путем введения тиоловых групп в мутеин стрептавидина (это можно сделать, например, путем введения мутеина стрептавидина в реакцию с 2-иминотиолоном (реагентом Трота) и путем активации, например, в отдельной реакции аминогрупп, доступных в мутеине стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления эту активацию аминогрупп можно обеспечивать с помощью реакции мутеина стрептавидина с продаваемым гетеробифункциональным сшивающим средством, таким как сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо SMCC) или сукцинимидил-6-[(β-малеимидопропионамидо)гексаноат (SMPH). В некоторых таких вариантах осуществления два продукта реакции, полученных таким образом, перемешивают вместе, что обычно приводит к реакции тиоловых групп, содержащихся в одной партии модифицированного мутеина стрептавидина, с активированными (например, посредством малеимидных функциональных групп) аминокислотами другой партии модифицированного мутеина стрептавидина. В некоторых случаях с помощью данной реакции образуются мультимеры/олигомеры мутеина стрептавидина. Эти олигомеры могут иметь любое подходящее количество отдельных молекул, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 45, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4,000 или более, а степень олигомеризации можно изменять в соответствии с условиями реакции.

В некоторых вариантах осуществления посредством эксклюзионной хроматографии можно выделить олигомерный или полимерный реагент, а в качестве реагента можно использовать любую нужную фракцию. Например, в некоторых вариантах осуществления после введения в реакцию модифицированного мутеина стрептавидина в присутствии 2-иминотиолана и гетеробифункционального сшивающего средства, такого как сульфо SMCC, посредством эксклюзионной хроматографии можно выделить олигомерный или полимерный реагент, и любую нужную фракцию можно использовать в качестве реагента. В некоторых вариантах осуществления олигомеры не имеют (и не должны иметь) единую молекулярную массу, но у них можно наблюдать статистическое распределение массы, такое как распределение Гаусса. В некоторых случаях в качестве реагента можно использовать любой олигомер более чем с тремя тетрамерами стрептавидина или мутеина, например, гомотетрамерами или гетеротетрамерами, например, обычно 3-50 тетрамеров, например, гомотетрамеров или гетеротетрамеров, 10-40 тетрамеров, например, гомотетрамеров или гетеротетрамеров, или 25-35 тетрамеров, например, гомотетрамеров или гетеротетрамеров. Олигомеры могут иметь, например, 3-25 тетрамеров мутеина стрептавидина, например, гомотетрамеров или гетеротетрамеров. В некоторых аспектах при молекулярной массе мутеинов стрептавидина приблизительно 50 кДа олигомеры могут иметь молекулярную массу от приблизительно 150 кДа до приблизительно 2000 кДа, от приблизительно 150 кДа до приблизительно 1500 кДа, от приблизительно 150 кДа до приблизительно 1250 кДа, от приблизительно 150 кДа до 1000 кДа, от приблизительно 150 кДа до приблизительно 500 кДа или от приблизительно 150 кДа до приблизительно 300 кДа, от приблизительно

300 кДа до приблизительно 2000 кДа, от приблизительно 300 кДа до приблизительно 1500 кДа, от приблизительно 300 кДа до приблизительно 1250 кДа, от приблизительно 300 кДа до 1000 кДа, от приблизительно 300 кДа до приблизительно 500 кДа, от приблизительно 500 кДа до приблизительно 2000 кДа, от приблизительно 500 кДа до приблизительно 1500 кДа, от приблизительно 500 кДа до приблизительно 1250 кДа, от приблизительно 500 кДа до 1000 кДа, от приблизительно 1000 кДа до приблизительно 2000 кДа, от приблизительно 1000 кДа до приблизительно 1500 кДа, от приблизительно 1000 кДа до приблизительно 1250 кДа, от приблизительно 1250 кДа до приблизительно 2000 кДа или от приблизительно 1500 кДа до приблизительно 2000 кДа. В некоторых вариантах осуществления олигомеры имеют молекулярную массу более чем 2000 кДа. Обычно, вследствие того, что каждая молекула стрептавидина/мутеина имеет четыре участка связывания биотина, такой реагент может обеспечить 12-160 участков Z связывания, например, 12-160 или более участков Z связывания. В некоторых вариантах осуществления олигомеры представляют собой растворимые реагенты.

1. Олигомерные реагенты в виде частиц

В данном документе представлены олигомерные реагенты в виде частиц, которые состоят из и/или содержат множество молекул, например, тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц представляют собой растворимые реагенты. В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе олигомерные реагенты в виде частиц содержат по меньшей мере один участок связывания, который обратимо связывается или способен обратимо связываться с одним или более агентами, например, стимулирующим агентом и/или селективным агентом. В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе олигомерные реагенты в виде частиц содержат множество участков связывания, которые способны обратимо связываться с одним или более агентами, например, на участке на партнере по связыванию, например, партнере С по связыванию, который соединен с одним или более агентами. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц обратимо связаны с одним или более агентами. В конкретных вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц представляет собой олигомерную частицу, которую производят, получают или создают любым из способов, описанных в разделе II(B).

В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц, представленные в данном документе, состоят из и/или содержат олигомеризированные молекулы, которые представляют собой белки, полипептиды, пептиды, и/или молекулы, которые содержат или включают в себя одну или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе олигомерные реагенты в виде частиц содержат и/или состоят из олигомеризированных молекул, которые содержат множество участков связывания, которые способны связываться с одним или более агентами, например, рецептор-связывающим агентом. В некоторых вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц, представленный в данном документе, содержит множество участков связывания, которые способны связываться с агентом, который описан в разделе II(B)(4) и/или разделе II(B)(5). В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе олигомерные реагенты в виде частиц содержат множество участков связывания, которые связываются или способны связываться с одним или более агентами на участке внутри партнера по связыванию, например, партнера С по связыванию, который соединен с одним или более агентами. В конкретных вариантах осуществления молекула, которая является

олигомеризированной, содержит множество участков связывания, которые способны связываться с партнером С по связыванию, который описан в разделе II(A). В некоторых вариантах осуществления молекула, которая является олигомеризированной, представляет собой или содержит стрептавидин, мутеин или аналог стрептавидаина, авидин, мутеин или аналог авидина (например, нейтравидин). В некоторых вариантах осуществления стрептавидин представляет собой тетрамер в нативном состоянии. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления молекула представляет собой тетрамер стрептавидаина, мутеина или аналога стрептавидаина, авидина, мутеина или аналога авидина (например, нейтравидина). В конкретных вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц содержит множество из одного или более любых из реагентов, которые описаны в разделе II(A).

В конкретных вариантах осуществления размер олигомерных реагентов в виде частиц определяют с помощью любого подходящего средства, известного в данной области. В некоторых вариантах осуществления массу и/или молекулярную массу олигомерных реагентов в виде частиц определяют с помощью любого подходящего средства в данной области, включая, но без ограничения электрофорез, например, SDS-PAGE, хроматографию, например, гель-фильтрационную хроматографию, или SEC или масс-спектрометрию. В некоторых вариантах осуществления размер, например, радиус, олигомерного реагента в виде частиц определяют с помощью метода динамического рассеяния света (DLS). В некоторых вариантах осуществления размер, например, радиус, определяют с помощью методики фракционирования в потоке в поле течения (F4). В некоторых вариантах осуществления F4 можно использовать для разделения и измерения частиц на основе размера независимо от плотности частиц. В некоторых вариантах осуществления размер частиц измеряют с помощью асимметричного фракционирования в потоке в поле течения (AF4). В некоторых вариантах осуществления размер частиц можно определить с помощью измерения диаметра или радиуса частиц. В некоторых вариантах осуществления размер частиц можно определить с помощью измерения гидродинамического радиуса или радиуса инерции частиц. В некоторых вариантах осуществления радиус определяют с помощью метода динамического рассеяния света. В некоторых вариантах осуществления радиус, например, гидродинамический радиус и/или радиус Стокса, можно определить с помощью метода хроматографии, например, эксклюзионной хроматографии (сек).

В конкретных вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц, представленный в данном документе, имеет радиус, например, средний радиус, по меньшей мере 5 нм, по меньшей мере 10 нм, по меньшей мере 15 нм, по меньшей мере 20 нм, по меньшей мере 25 нм, по меньшей мере 30 нм, по меньшей мере 35 нм, по меньшей мере 40 нм, по меньшей мере 45 нм, по меньшей мере 50 нм, по меньшей мере 55 нм, по меньшей мере 60 нм, по меньшей мере 65 нм, по меньшей мере 70 нм, по меньшей мере 75 нм, по меньшей мере 80 нм, по меньшей мере 85 нм, по меньшей мере 90 нм, по меньшей мере 95 нм, по меньшей мере 100 нм, по меньшей мере 105 нм, по меньшей мере 110 нм, по меньшей мере 115 нм, по меньшей мере 120 нм, по меньшей мере 125 нм, по меньшей мере 130 нм, по меньшей мере 135 нм, по меньшей мере или по меньшей мере 140 нм. В некоторых вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц имеет радиус между 5 нм и 150 нм, между 25 нм и 150 нм, между 50 нм и 150 нм, между 75 нм и 125 нм, между 80 нм и 140 нм, между 85 нм и 135 нм, между 80 нм и 120 нм, между 80 нм и 115 нм или между 90 нм и 110 нм, включительно. В некоторых вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц, представленный в данном документе, имеет радиус приблизительно 85 нм, приблизительно 86 нм, приблизительно

87 нм, приблизительно 88 нм, приблизительно 89 нм, приблизительно 90 нм, приблизительно 91 нм, приблизительно 92 нм, приблизительно 93 нм, приблизительно 94 нм, приблизительно 95 нм, приблизительно 96 нм, приблизительно 97 нм, приблизительно 98 нм, приблизительно 99 нм, приблизительно 100 нм, приблизительно 101 нм, приблизительно 102 нм, приблизительно 103 нм, приблизительно 104 нм, приблизительно 105 нм, приблизительно 106 нм, приблизительно 107 нм, приблизительно 108 нм, приблизительно 109 нм, приблизительно 110 нм, приблизительно 111 нм, приблизительно 112 нм, приблизительно 113 нм, приблизительно 114 нм или приблизительно 115 нм. В некоторых вариантах осуществления частицы имеют радиус между 80 нм и 115 нм, включительно.

В некоторых вариантах осуществления радиусом является гидродинамический радиус, радиус инерции, радиус Стокса, радиус Стокса-Эйнштейна и/или эффективный радиус гидратированных частиц в растворе. В некоторых вариантах осуществления радиусом является гидродинамический радиус. В некоторых вариантах осуществления радиусом является радиус Стокса. В конкретных вариантах осуществления гидродинамическим радиусом является радиус Стокса. В некоторых вариантах осуществления радиус представляет собой средний, медианный и/или срединный радиус множества частиц.

В некоторых вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц, представленный в данном документе, имеет молекулярную массу по меньшей мере 2×10^6 г/моль, 3×10^6 г/моль, 5×10^6 г/моль, 1×10^7 г/моль, по меньшей мере 5×10^7 г/моль, по меньшей мере 1×10^8 г/моль, по меньшей мере $1,25 \times 10^8$ г/моль, по меньшей мере $1,5 \times 10^8$ г/моль, по меньшей мере 2×10^8 г/моль или по меньшей мере 5×10^8 г/моль. В некоторых вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц, представленный в данном документе, имеет молекулярную массу между 1×10^6 г/моль и 1×10^{10} г/моль, 2×10^6 г/моль и 1×10^{10} г/моль, между 1×10^7 г/моль и 1×10^9 г/моль, между 5×10^7 г/моль и 5×10^8 г/моль, между $7,5 \times 10^7$ г/моль и $2,5 \times 10^8$ г/моль, между $2,5 \times 10^7$ г/моль и $2,75 \times 10^8$ г/моль, между 1×10^8 г/моль и 5×10^8 г/моль, между $7,5 \times 10^7$ г/моль и 5×10^8 г/моль или между 1×10^8 г/моль и 2×10^8 г/моль, включительно. В конкретных вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц, представленный в данном документе, имеет молекулярную массу приблизительно $7,5 \times 10^7$ г/моль, приблизительно $8,0 \times 10^7$ г/моль, приблизительно $9,0 \times 10^7$ г/моль, приблизительно $1,0 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $1,1 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $1,2 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $1,3 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $1,4 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $1,5 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $1,6 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $1,7 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $1,8 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $1,9 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $2,0 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $2,1 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $2,2 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $2,3 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $2,4 \times 10^8$ г/моль или приблизительно $2,5 \times 10^8$ г/моль. В некоторых вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц, представленный в данном документе, имеет молекулярную массу между 5×10^7 г/моль и 2×10^8 г/моль, включительно.

В некоторых вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц, представленный в данном документе, состоит из и/или содержит множество тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц, представленный в данном документе, состоит из

и/или содержит по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400, по меньшей мере 500, по меньшей мере 600, по меньшей мере 700, по меньшей мере 800, по меньшей мере 900, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 1100, по меньшей мере 1200, по меньшей мере 1300, по меньшей мере 1400, по меньшей мере 1500, по меньшей мере 1600, по меньшей мере 1700, по меньшей мере 1800, по меньшей мере 1900, по меньшей мере 2200, по меньшей мере 2300, по меньшей мере 2400, по меньшей мере 2500, по меньшей мере 2600, по меньшей мере 2700, по меньшей мере 2800, по меньшей мере 2900, по меньшей мере 3000, по меньшей мере 4000, по меньшей мере 5000, по меньшей мере 10000 или по меньшей мере 20000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В конкретных вариантах осуществления представленные в данном документе олигомерные реагенты в виде частиц содержат и/или состоят из между 100 и 50000, между 500 и 10000, между 1000 и 20000, между 500 и 5000, между 300 и 7500, между 1500 и 7500, между 500 и 3500, между 1000 и 5000, между 1500 и 2500, между 1500 и 2500, между 2000 и 3000, между 2500 и 3500, между 2000 и 4000 или между 2000 и 5000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц, представленный в данном документе, состоит из и/или содержит между приблизительно 2000 и 3500 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлен олигомерный реагент в виде частиц, который состоит из и/или содержит множество тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц, представленный в данном документе, содержит множество участков связывания, которые обратимо связываются или способны обратимо связываться с одним или более агентами, например, стимулирующим агентом и/или селективным агентом. В некоторых вариантах осуществления олигомерная частица имеет радиус между 25 нм и 150 нм, включительно; молекулярную массу между 2×10^6 г/моль и 1×10^{10} г/моль; и/или между 500 и 10000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина.

В конкретных вариантах осуществления в данном документе представлен олигомерный реагент в виде частиц, который состоит из и/или содержит множество тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц, представленный в данном документе, содержит множество участков связывания, которые обратимо связываются или способны обратимо связываться с одним или более агентами, например, стимулирующим агентом и/или селективным агентом. В некоторых вариантах осуществления олигомерные частицы имеют радиус, например, средний радиус, между 70 нм и 125 нм, включительно; молекулярную массу между 1×10^7 г/моль и 1×10^9 г/моль, включительно; и/или между 1000 и 5000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, включительно. В некоторых вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц связан, например, обратимо связан, с одним или более агентами, такими как агент, который связывается с молекулой, например, рецептором, на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления один или более агентов представляют собой агенты, описанные в данном документе, например, в разделе II-C-3. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой антитело против CD3 и/или против CD28 или его антиген-связывающий фрагмент, например, антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который содержит партнер по связыванию, например, стрептавидин-связывающий пептид, например, Strep-tag® II. В конкретных вариантах осуществления один или более агентов представляет собой Fab против CD3 и/или против

CD28, содержащий партнер по связыванию, например, стрептавидин-связывающий пептид, например, Strep-tag® II.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлен олигомерный реагент в виде частиц, который состоит из и/или содержит множество тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц, представленный в данном документе, содержит множество участков связывания, которые обратимо связываются или способны обратимо связываться с одним или более агентами, например, стимулирующим агентом и/или селективным агентом. В некоторых вариантах осуществления олигомерные частицы имеют радиус, например, средний радиус, между 80 нм и 120 нм, включительно; молекулярную массу, например, среднюю молекулярную массу между $7,5 \times 10^6$ г/моль и 2×10^8 г/моль, включительно; и/или количество, например, среднее количество, между 500 и 10000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, включительно. В некоторых вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц связан, например, обратимо связан, с одним или более агентами, такими как агент, который связывается с молекулой, например, рецептором, на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления один или более агентов представляют собой агенты, описанные в данном документе, например, в разделе II-C-3. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой Fab против CD3 и/или против CD28, например, Fab, который содержит партнер по связыванию, например, стрептавидин-связывающий пептид, например, Strep-tag® II. В конкретных вариантах осуществления один или более агентов представляет собой Fab против CD3 и/или против CD28, содержащий партнер по связыванию, например, стрептавидин-связывающий пептид, например, Strep-tag® II.

2. Композиции олигомерных реагентов в виде частиц

В данном документе представлены композиции, содержащие олигомерные реагенты в виде частиц, например, множество олигомерных реагентов в виде частиц, которые состоят из и/или содержат множество молекул, например, тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления композиция, представленная в данном документе, содержит множество любых олигомерных реагентов в виде частиц, описанных в данном документе. В конкретных вариантах осуществления композиция содержит множество любых олигомерных реагентов в виде частиц, описанных в разделе II(A)(1). В некоторых вариантах осуществления композиция содержит множество олигомерных реагентов в виде частиц, которые изготавливают, получают и/или создают любым из способов, описанных в разделе II(B).

В конкретных вариантах осуществления композиция содержит олигомерные реагенты в виде частиц со средним, срединным и/или медианным размером. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит олигомерные реагенты в виде частиц со средним, срединным или медианным радиусом по меньшей мере 25 нм, по меньшей мере 30 нм, по меньшей мере 35 нм, по меньшей мере 40 нм, по меньшей мере 45 нм, по меньшей мере 50 нм, по меньшей мере 55 нм, по меньшей мере 60 нм, по меньшей мере 65 нм, по меньшей мере 70 нм, по меньшей мере 75 нм, по меньшей мере 80 нм, по меньшей мере 85 нм, по меньшей мере 90 нм, по меньшей мере 95 нм, по меньшей мере 100 нм, по меньшей мере 105 нм, по меньшей мере 110 нм, по меньшей мере 115 нм, по меньшей мере 120 нм, по меньшей мере 125 нм, по меньшей мере 130 нм, по меньшей мере 135 нм, по меньшей мере или по меньшей мере 140 нм. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит олигомерные реагенты в виде частиц со средним, срединным или медианным радиусом между 5 нм и 150 нм, между 25 нм и

150 нм, между 50 нм и 150 нм, между 75 нм и 125 нм, между 80 нм и 140 нм, между 85 нм и 135 нм, между 80 нм и 120 нм, между 80 нм и 115 нм или между 90 нм и 110 нм, включительно.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит олигомерные реагенты в виде частиц со средним, срединным или медианным радиусом 90 нм ± 25 нм, 90 нм ± 20 нм, 90 нм ± 15 нм, 90 нм ± 10 нм, 90 нм ± 5 нм, 95 нм ± 25 нм, 95 нм ± 20 нм, 95 нм ± 15 нм, 95 нм ± 10 нм, 95 нм ± 5 нм, 97 нм ± 20 нм, 97 нм ± 15 нм, 97 нм ± 10 нм, 97 нм ± 5 нм.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит олигомерные реагенты в виде частиц со средним, срединным или медианным радиусом приблизительно 85 нм, приблизительно 86 нм, приблизительно 87 нм, приблизительно 88 нм, приблизительно 89 нм, приблизительно 90 нм, приблизительно 91 нм, приблизительно 92 нм, приблизительно 93 нм, приблизительно 94 нм, приблизительно 95 нм, приблизительно 96 нм, приблизительно 97 нм, приблизительно 98 нм, приблизительно 99 нм, приблизительно 100 нм, приблизительно 101 нм, приблизительно 102 нм, приблизительно 103 нм, приблизительно 104 нм, приблизительно 105 нм, приблизительно 106 нм, приблизительно 107 нм, приблизительно 108 нм, приблизительно 109 нм, приблизительно 110 нм, приблизительно 111 нм, приблизительно 112 нм, приблизительно 113 нм, приблизительно 114 нм или приблизительно 115 нм. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит олигомерные реагенты в виде частиц со средним, срединным или медианным радиусом между 80 нм и 115 нм, включительно.

В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц композиции имеют среднюю, срединную или медианную молекулярную массу по меньшей мере 2×10^6 г/моль, 3×10^6 г/моль, 5×10^6 г/моль, 1×10^7 г/моль, по меньшей мере 5×10^7 г/моль, по меньшей мере 1×10^8 г/моль, по меньшей мере $1,25 \times 10^8$ г/моль, по меньшей мере $1,5 \times 10^8$ г/моль, по меньшей мере 2×10^8 г/моль или по меньшей мере 5×10^8 г/моль. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц композиции имеют среднюю, срединную или медианную молекулярную массу между 1×10^6 г/моль и 1×10^{10} г/моль, 2×10^6 г/моль и 1×10^{10} г/моль, между 1×10^7 г/моль и 1×10^9 г/моль, между 5×10^7 г/моль и 5×10^8 г/моль, между $7,5 \times 10^7$ г/моль и $2,5 \times 10^8$ г/моль, между $2,5 \times 10^7$ г/моль и $2,75 \times 10^8$ г/моль, между 1×10^8 г/моль и 5×10^8 г/моль, между $7,5 \times 10^7$ г/моль и 5×10^8 г/моль или между 1×10^8 г/моль и 2×10^8 г/моль, включительно. В конкретных вариантах осуществления олигомерный реагент в виде частиц композиции имеют среднюю, срединную или медианную молекулярную массу приблизительно $7,5 \times 10^7$ г/моль, приблизительно $8,0 \times 10^7$ г/моль, приблизительно $9,0 \times 10^7$ г/моль, приблизительно $1,0 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $1,1 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $1,2 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $1,3 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $1,4 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $1,5 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $1,6 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $1,7 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $1,8 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $1,9 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $2,0 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $2,1 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $2,2 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $2,3 \times 10^8$ г/моль, приблизительно $2,4 \times 10^8$ г/моль или приблизительно $2,5 \times 10^8$ г/моль. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц композиции имеют среднюю, срединную или медианную молекулярную массу между 5×10^7 г/моль и 2×10^8

г/моль, включительно.

В некоторых вариантах осуществления каждый из олигомерных реагентов в виде частиц композиции состоит из и/или содержит множество тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц композиции состоят из и/или содержат среднее, срединное или медианное количество по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400, по меньшей мере 500, по меньшей мере 600, по меньшей мере 700, по меньшей мере 800, по меньшей мере 900, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 1100, по меньшей мере 1200, по меньшей мере 1300, по меньшей мере 1400, по меньшей мере 1500, по меньшей мере 1600, по меньшей мере 1700, по меньшей мере 1800, по меньшей мере 1900, по меньшей мере 2200, по меньшей мере 2300, по меньшей мере 2400, по меньшей мере 2500, по меньшей мере 2600, по меньшей мере 2700, по меньшей мере 2800, по меньшей мере 2900, по меньшей мере 3000, по меньшей мере 4000, по меньшей мере 5000, по меньшей мере 10000 или по меньшей мере 20000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В конкретных вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц композиции содержать и/или состоят из среднее, срединное или медианное количество между 100 и 50000, между 500 и 10000, между 1000 и 20000, между 500 и 5000, между 300 и 7500, между 1500 и 7500, между 500 и 3500, между 1000 и 5000, между 1500 и 2500, между 1500 и 2500, между 2000 и 3000, между 2500 и 3500, между 2000 и 4000 или между 2000 и 5000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц композиции состоят из и/или содержат среднее, срединное или медианное количество между приблизительно 2000 и 3500 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит олигомерные реагенты в виде частиц с распределением размеров. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц композиции имеют распределение размеров, при котором по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% олигомерных реагентов в виде частиц композиции имеют размер, который находится в пределах $\pm 100%$, $\pm 90%$, $\pm 80%$, $\pm 70%$, $\pm 60%$, $\pm 50%$, $\pm 40%$, $\pm 30%$, $\pm 25%$, $\pm 20%$, $\pm 15%$, $\pm 10%$, $\pm 5%$, $\pm 1%$, $\pm 0,5%$, $\pm 0,1%$, $\pm 0,01%$ или $\pm 0,001%$ медианного или среднего размера олигомерных реагентов в виде частиц композиции. В некоторых вариантах осуществления размер измеряют с помощью радиуса, молекулярной массы или количества молекул, например, тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, олигомерного реагента в виде частиц.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95% олигомерных реагентов в виде частиц композиции имеют радиус, который находится в пределах $\pm 100%$, $\pm 90%$, $\pm 80%$, $\pm 70%$, $\pm 60%$, $\pm 50%$, $\pm 40%$, $\pm 30%$, $\pm 25%$, $\pm 20%$, $\pm 15%$, $\pm 10%$, $\pm 5%$, $\pm 1%$, $\pm 0,5%$, $\pm 0,1%$, $\pm 0,01%$ или $\pm 0,001%$ медианного или среднего радиуса олигомерных реагентов в виде частиц композиции. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 95% олигомерных реагентов в виде частиц композиции имеют радиус, который находится в пределах между 10 нм и 250 нм, между 25 нм и 200 нм, между 50 и 150 нм, между 70 нм и 140 нм, между 70 и 130 нм, между 70 и 100 нм, между 80 нм и 110 нм, между 80 нм и 120 нм, между 80 нм и 115 нм, между 80 нм и 100 нм, между 90 и 120 нм, между 90 нм и 110 нм, между 100 нм и 120 нм или между 85 и/или 115 нм, включительно. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 95% олигомерных реагентов в виде частиц композиции имеют радиус, который находится в пределах $\pm 25%$, $\pm 20%$, $\pm 15%$, $\pm 10%$, $\pm 5%$ или $\pm 1%$ среднего радиуса олигомерных реагентов в виде частиц композиции.

В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 95% олигомерных реагентов в виде частиц композиции имеют молекулярную массу, которая находится в пределах $\pm 100\%$, $\pm 90\%$, $\pm 80\%$, $\pm 70\%$, $\pm 60\%$, $\pm 50\%$, $\pm 40\%$, $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, $\pm 0,1\%$, $\pm 0,01\%$ или $\pm 0,001\%$ медианной или средней молекулярной массы олигомерных реагентов в виде частиц композиции. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95% олигомерных реагентов в виде частиц композиции имеют молекулярную массу между 2×10^6 г/моль и 1×10^{10} г/моль, между 1×10^6 г/моль и 1×10^8 г/моль, между 1×10^7 г/моль и 1×10^9 г/моль, между 1×10^8 г/моль и 1×10^{10} г/моль, между 1×10^8 г/моль и 1×10^9 г/моль, между 5×10^7 г/моль и 5×10^8 г/моль, между 1×10^9 г/моль и 1×10^{10} г/моль, между 1×10^7 г/моль и 1×10^8 г/моль, между $7,5 \times 10^7$ г/моль и $2,5 \times 10^8$ г/моль, между 5×10^7 г/моль и $2,5 \times 10^8$ г/моль, между 1×10^8 г/моль и 3×10^8 г/моль, между $7,0 \times 10^7$ г/моль и $3,0 \times 10^8$ г/моль или между 1×10^8 г/моль и 2×10^8 г/моль, включительно. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95% олигомерных реагентов в виде частиц композиции имеют молекулярную массу, которая находится в пределах $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 1\%$ средней молекулярной массы олигомерных реагентов в виде частиц композиции.

В некоторых вариантах осуществления олигомерные частицы композиции состоят из множества тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, и по меньшей мере 95% олигомерных реагентов в виде частиц состоят из количества тетрамеров в пределах $\pm 100\%$, $\pm 90\%$, $\pm 80\%$, $\pm 70\%$, $\pm 60\%$, $\pm 50\%$, $\pm 40\%$, $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, $\pm 0,1\%$, $\pm 0,01\%$ или $\pm 0,001\%$ медианного или среднего количества тетрамеров на олигомерном реагенте в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления олигомерные частицы композиции, по меньшей мере 95% олигомерных реагентов в виде частиц, состоят из между 100 и 50000, между 500 и 10000, между 1000 и 20000, между 1000 и 5000, между 5000 и 10000, между 10000 и 15000, между 1500 и 4000, между 2000 и 4500, между 2500 и 5000, между 3000 и 5000, между 3500 и 5500, между 4000 и 6000 или между 1500 и 3500 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95% олигомерных реагентов в виде частиц композиции состоят из количества тетрамеров в пределах $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 1\%$ средней молекулярной массы олигомерных реагентов в виде частиц композиции.

В некоторых вариантах осуществления композицию олигомерных реагентов в виде частиц хранят в течение некоторого периода времени, например, после изготовления, получения и/или создания олигомерных реагентов в виде частиц и перед добавлением агента, например, рецептор-связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления композицию олигомерных реагентов в виде частиц хранят в буфере с нейтральным pH. В некоторых вариантах осуществления композицию хранят в виде отдельных аликвот. В некоторых вариантах осуществления композицию олигомерных реагентов в виде частиц хранят при комнатной температуре или ниже, при 4°C или ниже, при -20°C или ниже или при -80°C или ниже. В некоторых вариантах осуществления композицию хранят в течение некоторого периода времени, составляющего, приблизительно составляющего или составляющего по меньшей мере 12 часов, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 10 дней, 14 дней, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 18 недель, 20 недель, 22 недели, 24 недели, 26 недель, 27 недель, 28 недель, 30 недель, 32 недели, 34 недели, 36 недель, 38 недель, 40 недель,

42 недели, 44 недели, 46 недель, 48 недель, 50 недель, 52 недели, 60 недель, 70 недель, 80 недель, 90 недель, 12 месяцев, 16 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев, 36 месяцев или больше чем 36 месяцев. В конкретных вариантах осуществления композицию олигомерных реагентов в виде частиц хранят при 4°C или ниже в течение, в течение
5 приблизительно или в течение по меньшей мере 1 недели 9 недель, 27 недель или 46 недель. В некоторых вариантах осуществления композицию олигомерных реагентов в виде частиц хранят при -80°C или ниже в течение, в течение приблизительно или в течение по меньшей мере 1 недели 9 недель, 27 недель или 46 недель. В конкретных вариантах осуществления размеры олигомерных частиц во время хранения являются
10 стабильными, например, размер не изменяется или не увеличивается больше чем на 25%, 20%, 15%, 10% или 5%.

В конкретных вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц композиции не претерпевают увеличение среднего, например, срединного размера частиц во время хранения. В некоторых вариантах осуществления композицию хранят
15 в течение некоторого периода времени, и олигомерные реагенты в виде частиц не претерпевают увеличение среднего размера больше чем на 1%, больше чем на 5%, больше чем на 10%, больше чем на 20%, больше чем на 25%, больше чем на 30%, больше чем на 40% или больше чем на 50%. В конкретных вариантах осуществления композицию хранят приблизительно при 4°C или ниже, приблизительно при -20°C или ниже или
20 приблизительно при -80°C или ниже в течение по меньшей мере 9, 27 или 46 недель и не претерпевают увеличение среднего размера больше чем на 1%, 5% или 10%. В некоторых вариантах осуществления композицию хранят приблизительно при -80°C.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена композиция олигомерных реагентов в виде частиц, которые состоят из и/или содержат множество
25 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления каждый из олигомерных реагентов в виде частиц композиции содержат множество участков связывания, которые обратимо связываются или способны обратимо связываться с одним или более агентами, например, стимулирующим агентом и/или селективным агентом. В некоторых вариантах осуществления олигомерные
30 реагенты в виде частиц имеют средний, срединный или медианный радиус между 25 нм и 150 нм; среднюю, срединную или медианную молекулярную массу между 2×10^6 г/моль и 1×10^{10} г/моль; и/или среднее, срединное или медианное количество между 500 и 10000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах
35 осуществления по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% олигомерных реагентов в виде частиц композиции имеют радиус, молекулярную массу или количество тетрамеров, которые находятся в пределах $\pm 100%$, $\pm 90%$, $\pm 80%$, $\pm 70%$, $\pm 60%$, $\pm 50%$, $\pm 40%$, $\pm 30%$, $\pm 25%$, $\pm 20%$, $\pm 15%$, $\pm 10%$, $\pm 5%$, $\pm 1%$ среднего, срединного или медианного радиуса, молекулярной массы или количества тетрамеров олигомерных реагентов в виде частиц
40 композиции.

В конкретных вариантах осуществления в данном документе представлена композиция олигомерных реагентов в виде частиц, которые состоят из и/или содержат множество тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина и которые содержат
множество участков связывания, которые обратимо связываются с одним или более
45 реагентами, агентами, например, рецептор-связывающими агентами, такими как Fab против CD3 и/или против CD28, имеющими streptag. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц имеют средний, срединный или медианный радиус между 50 нм и 150 нм; среднюю, срединную или медианную

молекулярную массу между 1×10^7 г/моль и 1×10^9 г/моль; и/или среднее, срединное или медианное количество между 1000 и 5000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95% олигомерных реагентов в виде частиц композиции имеют радиус, молекулярную массу или количество тетрамеров, которые находятся в пределах $\pm 50\%$, $\pm 40\%$, $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ среднего, срединного или медианного радиуса, молекулярной массы или количества тетрамеров олигомерных реагентов в виде частиц композиции.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена композиция олигомерных реагентов в виде частиц, которые состоят из и/или содержат множество тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина и которые содержат множество участков связывания, которые обратимо связываются с одним или более агентами. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц имеют средний, срединный или медианный радиус между 50 нм и 150 нм; среднюю, срединную или медианную молекулярную массу между 5×10^7 г/моль и 5×10^8 г/моль; и/или среднее, срединное или медианное количество между 2000 и 4000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95% олигомерных реагентов в виде частиц композиции имеют радиус, молекулярную массу или количество тетрамеров, которые находятся в пределах $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ среднего, срединного или медианного радиуса, молекулярной массы или количества тетрамеров олигомерных реагентов в виде частиц композиции. В конкретных вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц не претерпевают увеличение размера больше чем на 10% при хранении при -80°C в течение по меньшей мере 9, 27 недель или 46 недель.

В некоторых вариантах осуществления любой из предоставленных олигомерных реагентов получают с помощью способа получения или создания олигомерных реагентов, описанных в разделе II.B ниже.

В. Получения олигомерных реагентов в виде частиц

В данном документе представлены способы создания, изготовления и/или получения реагентов, которые состоят из олигомеризированных реагентов, т.е. олигомерных реагентов в виде частиц. В конкретных вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц содержат множество участков связывания, которые способны обратимо связываться с агентом, например, стимулирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц содержат множество участков связывания, которые способны обратимо связываться с агентами, например, стимулирующими агентами и/или селективными агентами, которые распознают и/или связываются с одной или более молекулами, экспрессируемыми на клетке. В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, используют для создания, изготовления и/или получения олигомерных реагентов в виде частиц нужного или целевого размера.

В данном документе представлены способы получения, создания и/или изготовления реагентов, которые представляют собой олигомерные реагенты в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, используют для получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц, которые содержат и/или состоят из множества молекул, например, тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, предназначены для получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц, которые представляют собой

растворимые реагенты. В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе способы получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц включают или содержат стадию инкубации, обработки и/или введения в контакт молекул, например, тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, в условиях, подходящих для олигомеризации молекул. В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе способы получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц включают стадию отделения олигомерных реагентов в виде частиц от неолигомеризированных молекул. В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, включают стадию стабилизации одного или более свойств олигомерных реагентов в виде частиц, например, размера частиц.

В конкретных вариантах осуществления представленные в данном документе способы получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц включают стадию олигомеризации молекул, стадию удаления олигомеризированных молекул от неолигомеризированных молекул и/или стадию стабилизации свойства олигомерных реагентов в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе способы получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц содержат и/или включают одну или более стадий добавления молекуле функциональной группы, например, функциональной группы, которая подходит для реакции сшивания или олигомеризации. В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе способы получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц содержат и/или включают одну или более стадий добавления молекуле функциональной группы и одну или более стадий олигомеризации молекулы. В конкретных вариантах осуществления представленные в данном документе способы получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц содержат и/или включают стадии добавления молекулам одной или более функциональных групп, стадию олигомеризации молекул и стадию отделения олигомеризированных молекул, например, олигомерных частиц, от неолигомеризированных молекул.

В некоторых вариантах осуществления молекулы, которые являются олигомеризированными, представляют собой белки, полипептиды, пептиды и/или молекулы, которые содержат или включают в себя одну или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления молекула, которая является олигомеризированной, содержит множество участков связывания, которые способны связываться с агентом, например, рецептор-связывающим агентом. В некоторых вариантах осуществления молекула, которая является олигомеризированной, содержит множество участков связывания, которые способны связываться с агентом, который описан в разделе II(C) (3). В некоторых вариантах осуществления молекула, которая является олигомеризированной, содержит множество участков связывания, которые способны связываться с партнером по связыванию, например, партнером С по связыванию. В конкретных вариантах осуществления молекула, которая является олигомеризированной, содержит множество участков связывания, которые способны связываться с партнером С по связыванию, который описан в разделе II(A). В некоторых вариантах осуществления молекула, которая является олигомеризированной, представляет собой или содержит стрептавидин, мутеин или аналог стрептавидина, авидин, мутеин или аналог авидина (например, нейтравидин). В некоторых вариантах осуществления стрептавидин представляет собой тетрамер в нативном состоянии. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления молекула представляет собой

тетрамер стрептавидина, мутеина или аналога стрептавидина, авидина, мутеина или аналога авидина (например, нейтравидина). В конкретных вариантах осуществления молекулой является любой из реагентов, описанных в разделе II(A). В некоторых вариантах осуществления молекула представляет собой тетрамер реагентов, описанных

5 в разделе II(A).
В отдельных вариантах осуществления предусмотрено, что характеристики, например, размер, олигомерных реагентов в виде частиц, которые изготавливают, получают и/или создают с помощью способов, представленных в данном документе, зависят от синхронизации разных стадий, методик и инкубаций, а также от таких условий, как pH и температура, и концентраций реагентов на разных этапах или стадиях методики. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления одну или более стадий или этапов способов, представленных в данном документе, выполняют и/или регистрируют с точной синхронизацией и измерениями, например, для обеспечения, чтобы при повторении способов, представленных в данном документе, полученные изготовленные

10 олигомерные реагенты в виде частиц имели такой же или аналогичный размер и характеристики, как и другие партии или серии, полученные с помощью способов, представленных в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления измерения буферов и реагентов должны в пределах $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,1\%$, $\pm 0,01\%$ или $\pm 0,001\%$ целевого или нужного количества или концентрации.

20 В некоторых вариантах осуществления реакции, например, инкубацию, обработку или введение в контакт проводят при нужном или целевом pH в пределах $\text{pH} \pm 1$, $\pm 0,5$, $\pm 0,1$, $\pm 0,05$, $\pm 0,04$, $\pm 0,03$, $\pm 0,02$, $\pm 0,01$, $\pm 0,001$, или $\pm 0,0001$. В конкретных вариантах осуществления инкубацию, обработку или введение в контакт проводят в пределах 30 минут, 15 минут, 10 минут, 5 минут, 4 минут, 3 минут, 2 минут, 90 секунд, 60 секунд, 45

25 секунд, 30 секунд, 15 секунд, 10 секунд, 5 секунд или в пределах 1 секунды целевого или нужного периода времени. В конкретных вариантах осуществления время между стадиями, этапами и/или реакциями, например, инкубациями или обработкой, находится в пределах 30 минут, 15 минут, 10 минут, 5 минут, 4 минут, 3 минут, 2 минут, 90 секунд, 60 секунд, 45 секунд, 30 секунд, 15 секунд, 10 секунд, 5 секунд или в пределах 1 секунды

30 от установленного целевого или нужного времени.

В некоторых вариантах осуществления отдельные особенности представленных в данном документе способов изготовления, получения или создания олигомерных реагентов в виде частиц являются критическими для стабильного получения олигомерных реагентов в виде частиц. Например, в некоторых вариантах осуществления

35 способы, представленные в данном документе, включают стадию тиолирования молекул, например, путем инкубации молекул с тиолирующим агентом, и время, pH и/или концентрации и количества реагентов инкубации все снижаются в пределах $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,1\%$, $\pm 0,01\%$ или $\pm 0,001\%$ целевых или нужных значений для достижения стабильного получения олигомерных реагентов в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления количество времени между окончанием стадии тиолирования молекул и стадии олигомеризации молекул, например, путем инкубации активированных и тиолированных молекул, попадает в пределах $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,1\%$, $\pm 0,01\%$ или $\pm 0,001\%$ нужного или целевого периода времени. В некоторых вариантах осуществления

40 способы, представленные в данном документе, включают стадию активации молекул, например, путем инкубации молекул с активирующим агентом, который добавляет в молекулы функциональные группы, и время, pH и/или концентрации и количества реагентов инкубации все снижаются в пределах $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,1\%$, $\pm 0,01\%$ или $\pm 0,001\%$ целевых или нужных значений для достижения стабильного получения

олигомерных реагентов в виде частиц. В конкретных вариантах осуществления время, рН и/или концентрации и количества реагентов для стадии олигомеризации молекул все снижаются в пределах $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,1\%$, $\pm 0,01\%$ или $\pm 0,001\%$ целевых или нужных значений для достижения стабильного получения олигомерных реагентов в виде частиц. В конкретных вариантах осуществления стабильное получение олигомерных реагентов в виде частиц приводит к или включает получение стабильных партий или серий. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, приводят к стабильным партиям или сериям олигомерных реагентов в виде частиц. Например, в некоторых вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, приводят к партиям или сериям олигомерных реагентов в виде частиц со средними, например, срединными, размерами частиц, которые снижаются в пределах $\pm 50\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, $\pm 0,1\%$, $\pm 0,01\%$ или $\pm 0,001\%$ от среднего, например, срединного размера частиц серий или партий, изготовленных, полученных или созданных с помощью способов в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе способы получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц включают стадию активации молекул, например, тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, путем инкубации, обработки и/или введения молекул в контакт с активирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления активирующий агент добавляет или способен добавлять молекуле функциональную группу, которая вступает в реакцию или способна вступать в реакцию в реакции сшивания. В некоторых вариантах осуществления активирующий агент добавляет или способен добавлять функциональную группу одному или более аминам молекулы. В некоторых вариантах осуществления активирующий агент добавляет или способен добавлять молекуле аминок-реактивную группу, сульфгидрил-реактивную или тиол-реактивную группу, альдегид-реактивную группу, фотореактивную группу и/или гидроксил-реактивную группу. В некоторых вариантах осуществления активирующий агент добавляет или способен добавлять молекуле сульфгидрил-реактивную или тиол-реактивную группу. В некоторых вариантах осуществления активирующий агент добавляет или способен добавлять молекуле галоацетильную группу, малеимидную группу, азиридиновую группу, акрилоиловую группу, арилирующий агент, винилсульфоновую группу, пиридилдисульфид, TNB-тиол или дисульфидный восстанавливающий агент. В некоторых вариантах осуществления активирующий агент добавляет или способен добавлять молекуле малеимидную группу. В некоторых вариантах осуществления активирующий агент представляет собой или содержит сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо SMCC) и/или сукцинимидил-6-[(β -малеимидопропионамидо)гексаноат (SMPH).

В конкретных вариантах осуществления молекулы, например, тетрамеры стрептавидина или мутеина стрептавидина, инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с активирующим агентом в условиях, подходящих для активации молекулы, т.е. Добавляют молекул одну или более функциональных групп. В конкретных вариантах осуществления инкубацию, обработку или введение в контакт активирующего агента с молекулами проводят при нейтральном рН. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку или введение в контакт активирующего агента с молекулами проводят при рН между 5,0 и 9,0, между 6,0 и 8,0, между 6,5 и 7,5, или между 7,0 и 7,5. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку или введение в контакт активирующего агента с молекулами проводят при рН приблизительно 6,5, приблизительно 6,6, приблизительно 6,7, приблизительно 6,8, приблизительно 6,9,

приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, приблизительно 7,3, приблизительно 7,4 или приблизительно 7,5. В некоторых вариантах осуществления рН составляет приблизительно 7,2. В конкретных вариантах осуществления рН составляет $7,2 \pm 0,1$, $\pm 0,05$, $\pm 0,02$, $\pm 0,01$, $\pm 0,005$ или ± 00001 .

5 В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт активирующего агента с молекулами, например, тетрамерами стрептавидина или мутеина стрептавидина, проводят при постоянной температуре. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт активирующего агента с молекулами проводят при температуре по меньшей мере 4°C ,
 10 по меньшей мере 8°C , по меньшей мере 12°C , по меньшей мере 16°C , по меньшей мере 20°C , по меньшей мере 24°C , по меньшей мере 28°C , по меньшей мере 32°C , по меньшей мере 37°C , по меньшей мере 39°C , по меньшей мере 50°C , по меньшей мере 60°C , по меньшей мере 70°C , по меньшей мере 80°C , по меньшей мере 90°C или по меньшей мере 100°C . В конкретных вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт активирующего агента с молекулами проводят при температуре между 4°C и 39°C , между 10°C и 37°C , между 10°C и 25°C , между 20°C и 30°C , между 24°C и 39°C или между 40°C и 100°C . В конкретных вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт активирующего агента с молекулами проводят при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления инкубацию и/или обработку для
 20 олигомеризации молекул проводят при или приблизительно при 24°C . В некоторых вариантах осуществления инкубацию и/или обработку для активации молекул проводят при $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\pm 1^{\circ}\text{C}$, $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$, $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$, $\pm 0,05^{\circ}\text{C}$ или $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$.

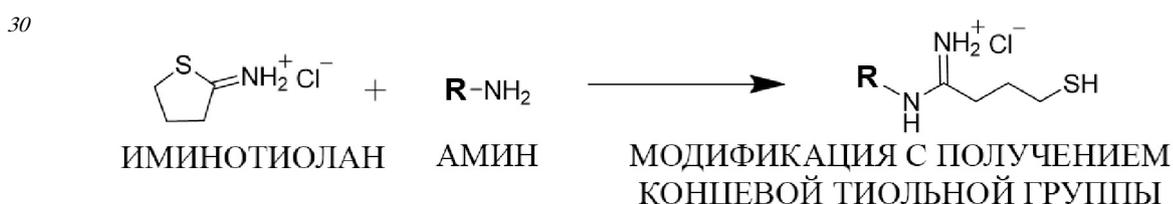
В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт активирующего агента с молекулами, например, тетрамерами стрептавидина
 25 или мутеина стрептавидина, проводят в течение некоторого периода времени. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт активирующего агента с молекулами проводят в течение от 5 минут до 1 часа, от 15 минут до 2 часов, от 30 минут до 90 минут, от 1 часа до 6 часов, от 6 часов до 24 часов или более 24 часов. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/
 30 или введение в контакт активирующего агента с молекулами проводят в течение приблизительно 5 минут, 15 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 45 минут, приблизительно 1 часа, приблизительно 1,5 часов, приблизительно 2 часов, приблизительно 3 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 18 часов,
 35 приблизительно 20 часов или приблизительно 24 часов. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт активирующего агента с молекулами проводят в течение или приблизительно в течение 1 часа. В конкретных вариантах осуществления инкубацию, обработку или введение в контакт активирующего агента с молекулами проводят в течение 1 часа ± 5 минут, ± 2 минут, ± 1 минуты, ± 30
 40 секунд, ± 15 секунд, ± 10 секунд, ± 5 секунд или ± 1 секунды.

В конкретных вариантах осуществления активирующий агент инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с молекулами, например, тетрамерами стрептавидина или мутеина стрептавидина, при некотором молярном соотношении активирующего агента и молекул. В некоторых вариантах осуществления молярное
 45 отношение молекул к активирующему агенту составляет или приблизительно составляет 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10. В конкретных вариантах осуществления молярное отношение молекул к активирующему агенту составляет 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, $\pm 0,1\%$, $\pm 0,05\%$ или $\pm 0,001\%$.

В некоторых вариантах осуществления молярное отношение составляет 1:2, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, $\pm 0,1\%$, $\pm 0,05\%$ или $\pm 0,001\%$. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение составляет 1:2 $\pm 5\%$. В конкретных вариантах осуществления молярное отношение составляет 1:2 $\pm 2\%$.

5 В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или контакт с активирующим агентом и молекулами, например, тетрамерами стрептавидина или мутеина стрептавидина, заканчивают путем удаления активирующего агента от молекул. В некоторых вариантах осуществления активирующий агент удаляют от молекул с помощью хроматографии. В некоторых вариантах осуществления активирующий агент
10 удаляют от молекул с помощью гель-фильтрационной хроматографии, например, с помощью колонки для обессоливания.

В конкретных вариантах осуществления представленные в данном документе способы получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц включают стадию тиолирования молекул, например, тетрамеров стрептавидина или мутеина
15 стрептавидина, путем инкубации, обработки и/или введения молекул в контакт с тиолирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления тиолирующий агент представляет собой агент, который добавляет или способен добавлять молекуле тиоловую функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления тиолирующий агент представляет собой агент, который добавляет или способен
20 добавлять тиоловую функциональную группу одному или более свободным аминам. В некоторых вариантах осуществления тиоловую функциональную группу добавляют к N-концевой аминокислоте и/или к свободным аминам, присутствующим на лизиновых остатках молекулы. В некоторых вариантах осуществления тиолирующий агент представляет собой или содержит циклическое соединение тииоимидат. В конкретных
25 вариантах осуществления тиолирующий агент представляет собой или содержит 2-иминотиолан (реагент Трота). В некоторых вариантах осуществления тиолирующий агент представляет собой или содержит 2-иминотиолан и добавляет тиоловую функциональную группу свободному амину в реакции, которая проиллюстрирована ниже:



35 В конкретных вариантах осуществления тиолирующий агент, например, 2-иминотиолан, продают, хранят и/или получают в виде гидрохлорида, например, соли 2-иминотиолан-НСl. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления добавление 2-иминотиолана в раствор вызывает значительное падение рН раствора. В некоторых вариантах осуществления раствор может быть забуферен для предотвращения или
40 снижения падения рН. В отдельных вариантах осуществления предусмотрено, что реакции тиолирования, выполняемые при кислом рН и/или рН ниже 7,0, ограничивают доступность лизиновых остатков, например, ограничивают доступность свободных аминов на лизиновых остатках и, таким образом, ограничивают количество тиоловых функциональных групп, которые добавляет молекуле тиолирующий реагент. В
45 некоторых вариантах осуществления аминокислоты на лизиновых остатках можно протонировать до степени, которая снижает или предотвращает способность тиолирования и/или добавления тиоловых функциональных групп аминокислотам при кислых значениях рН и/или при значениях рН ниже 7,0. Таким образом, в некоторых

вариантах осуществления кислотность раствора, содержащего тиолирующий агент, регулируют и/или нейтрализуют для увеличения эффективности реакции тиолирования.

В некоторых вариантах осуществления инкубация, обработка и/или введение в контакт тиолирующего агента с молекулами включает добавление тиолирующего агента в буфер с щелочным рН или с рН выше 7,0 перед или в начале инкубации, обработки, контакта тиолирующего агента с молекулами. В конкретных вариантах осуществления тиолирующий агент добавляют в буфер, который имеет рН по меньшей мере 7,0, по меньшей мере 7,2, по меньшей мере 7,4, по меньшей мере 7,6, по меньшей мере 7,8, по меньшей мере 8,0, по меньшей мере 8,1, по меньшей мере 8,2, по меньшей мере 8,3, по меньшей мере 8,4, по меньшей мере 8,5, по меньшей мере 8,6, по меньшей мере 8,7, по меньшей мере 8,8, по меньшей мере 8,9, по меньшей мере 9,0, по меньшей мере 9,5, или по меньшей мере 10,0 перед или в начале инкубации, обработки, контакта тиолирующего агента с молекулами. В некоторых вариантах осуществления тиолирующий агент добавляют в буфер, который имеет рН приблизительно 7,5, приблизительно 7,6, приблизительно 7,7, приблизительно 7,8, приблизительно 7,9, приблизительно 8,0, приблизительно 8,1, приблизительно 8,2, приблизительно 8,3, приблизительно 8,4, приблизительно 8,5, приблизительно 8,6, приблизительно 8,7, приблизительно 8,8, приблизительно 8,9, приблизительно 9,0, приблизительно 9,1, приблизительно 9,2, приблизительно 9,3, приблизительно 9,4 или приблизительно 9,5 перед или в начале инкубации, обработки, контакта тиолирующего агента с молекулами. В некоторых вариантах осуществления рН буфера составляет приблизительно 8,5. В конкретных вариантах осуществления рН буфера составляет $8,5 \pm 0,1$, $\pm 0,05$, $\pm 0,02$, $\pm 0,01$, $\pm 0,005$ или ± 00001 . В некоторых вариантах осуществления буфер содержит буферный агент с pK_a при комнатной температуре больше чем 7,0, больше чем 7,5, больше чем 8,0, больше чем 8,5, или больше чем 9,0. В конкретных вариантах осуществления буферный агент представляет собой или содержит TES, HEPES, DIPSO, MOBS, TAPSO, Trizma, HEPPSO, POPSO, TEA, EPPS, трицин, Gly-gly, бицин, HEPBS, TAPS, AMPD, TABS, AMPSO, CHES, CAPSO, AMP, CAPS, CABS и/или борат. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой или содержит боратный буфер. В конкретных вариантах осуществления боратный буфер содержит по меньшей мере 25 мМ бората, по меньшей мере 50 мМ бората, по меньшей мере 75 мМ бората или приблизительно или по меньшей мере 100 мМ бората. В конкретных вариантах осуществления буфер составляет или содержит $100 \text{ мМ} \pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, $\pm 0,1\%$, $\pm 0,05\%$ или $\pm 0,001\%$ борат.

В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт тиолирующего агента с молекулами проводят при щелочном рН или рН выше 7,0. Например, в некоторых вариантах осуществления рН раствора при добавлении тиолирующего агента и молекул представляет собой щелочной рН или рН выше 7,0. В некоторых вариантах осуществления рН в процессе инкубации, обработки или введения в контакт тиолирующего агента с молекулами находится между 7,0 и 11,0, между 7,0 и 9,0, между 7,5 и 8,5 или между 7,5 и 8,0. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку или введение в контакт тиолирующего агента с молекулами проводят при рН приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, приблизительно 7,3, приблизительно 7,4, приблизительно 7,5, приблизительно 7,6, приблизительно 7,7, приблизительно 7,8, приблизительно 7,9 или приблизительно 8,0. В некоторых вариантах осуществления рН в процессе инкубации, обработки или введения в контакт тиолирующего агента с молекулами составляет или приблизительно составляет 7,7. В конкретных вариантах осуществления рН в процессе инкубации, обработки или

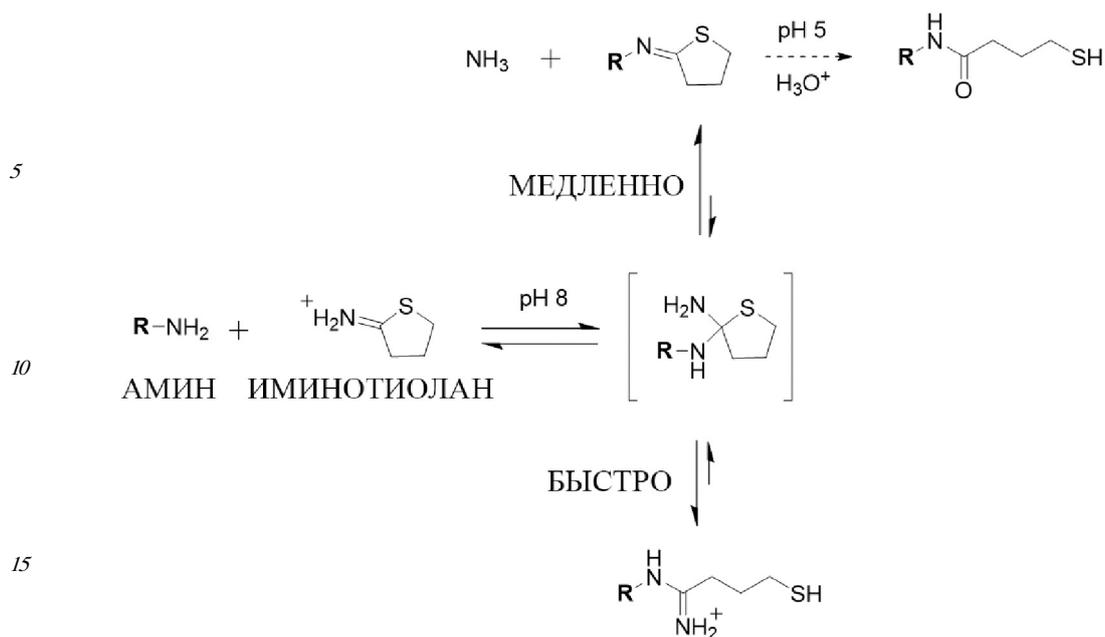
введения в контакт тиолирующего агента с молекулами составляет $7,7 \pm 0,1, \pm 0,05, \pm 0,02, \pm 0,01, \pm 0,005$ или ± 00001 .

В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт активирующего агента с молекулами, например, тетрамерами стрептавидина или мутеина стрептавидина, проводят в течение некоторого периода времени. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт активирующего агента с молекулами проводят в течение от 5 минут до 1 часа, от 15 минут до 2 часов, от 30 минут до 90 минут, от 1 часа до 6 часов, от 6 часов до 24 часов или более 24 часов. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт активирующего агента с молекулами проводят в течение приблизительно 5 минут, 15 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 45 минут, приблизительно 1 часа, приблизительно 1,5 часов, приблизительно 2 часов, приблизительно 3 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 20 часов или приблизительно 24 часов. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт активирующего агента с молекулами проводят в течение или приблизительно в течение 1 часа. В конкретных вариантах осуществления инкубацию, обработку или введение в контакт активирующего агента с молекулами проводят в течение 1 часа ± 5 минут, ± 2 минут, ± 1 минуты, ± 30 секунд, ± 15 секунд, ± 10 секунд, ± 5 секунд или ± 1 секунды. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт активирующего агента с молекулами проводят в течение или приблизительно в течение 25 минут. В конкретных вариантах осуществления инкубацию, обработку или введение в контакт активирующего агента с молекулами проводят в течение 25 минут ± 5 минут, ± 2 минуты, ± 1 минуты, ± 30 секунд, ± 15 секунд, ± 10 секунд, ± 5 секунд или ± 1 секунды.

В отдельных вариантах осуществления предусмотрено, что инкубацию, обработку и/или контакт молекулы, например, молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина приводит к первой реакции, которая добавляет нужную тиоловую функциональную группу. Однако, в некоторых вариантах осуществления нужная тиоловая функциональная группа может повторно изомеризоваться в более стабильную, но неактивную N-замещенную форму. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления тиолирование молекулы с помощью 2-иминотиолана добавляет тиоловую функциональную группу молекуле, которая может повторно изомеризоваться в более стабильную N-замещенную форму без такой же реактивности, как у тиоловой функциональной группы (Singh et al. Anal Biochem 236(1): 114-1125 (1996)). Изображение этой реакции показано ниже:

40

45



Вследствие этого, в некоторых вариантах осуществления тиолирование молекулы 2-иминотиололаном не должно приводить к стандартной кривой насыщения и вместо этого будет приводить к кривой, при этом уровень или количество тиоловых функциональных групп, которые присутствуют на молекулах, например, тетрамерах стрептавидина или мутеина стрептавидина, будет достигать пика или максимального уровня, а затем должен снова падать после достижения максимума. В некоторых вариантах осуществления период полураспада тиоловой функциональной группы составляет 139 минут.

В некоторых вариантах осуществления на максимальный или пиковый уровень тиоловых функциональных групп, соединенных с молекулами, который достигается в процессе реакции тиолирования, влияет рН растворов, где происходит реакция. В некоторых вариантах осуществления максимальный или пиковый уровень тиоловых функциональных групп больше, когда тиолирующий агент добавляют в буфер с более щелочным рН, чем когда тиолирующий агент добавляют в менее щелочной буфер. В некоторых вариантах осуществления максимальный или пиковый уровень тиоловых функциональных групп достигается за более короткий период времени, когда тиолирующий агент добавляют в буфер с более щелочным рН, чем когда тиолирующий агент добавляют в менее щелочной буфер. В некоторых вариантах осуществления максимальный или пиковый уровень тиоловых функциональных групп больше, когда тиолирующий агент добавляют в буфер с рН равным или приблизительно равным 8,5, чем когда тиолирующий агент добавляют в менее щелочной буфер, например, буфер с рН 8,3. В некоторых вариантах осуществления максимальный или пиковый уровень тиоловых функциональных групп достигается за более короткий период времени, когда тиолирующий агент добавляют в буфер с рН равным или приблизительно равным 8,5, чем когда тиолирующий агент добавляют в менее щелочной буфер, например, буфер с рН 8,3. В некоторых вариантах осуществления максимальный или пиковый уровень тиоловых функциональных групп больше, когда рН раствора, в котором происходит инкубация, обработка и/или введение в контакт с тиолирующим агентом и молекулой в процессе реакции, составляет или приблизительно составляет рН 7,7, чем когда инкубация, обработка и/или введение в контакт в процессе реакции происходит в растворе с рН менее чем 7,7, например, рН приблизительно 6,9. В некоторых вариантах

осуществления максимальный или пиковый уровень тиоловых функциональных групп достигается за более короткий период времени, когда рН раствора, в котором происходит инкубация, обработка и/или введение в контакт с тиолирующим агентом и молекулой в процессе реакции, составляет или приблизительно составляет рН 7,7, чем
5 когда инкубация, обработка и/или введение в контакт происходит в процессе реакции в растворе с рН менее чем 7,7, например, рН приблизительно 6,9.

В некоторых вариантах осуществления максимальный или пиковый уровень тиоловых функциональных групп, которые добавляют молекуле, является средним (например, срединным), который выражают в виде количества тиоловых функциональных групп, которые добавляют молекуле. В некоторых вариантах осуществления максимальный
10 или пиковый уровень тиоловых функциональных групп составляет по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по
15 меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40 или по меньшей мере 50 тиоловых функциональных групп. В некоторых вариантах осуществления максимальным или пиковым уровнем тиоловых функциональных групп, которые добавляют каждой молекуле, является среднее (например, срединное) процентное значение лизиновых остатков на молекулу с присоединенной или
20 добавленной тиоловой функциональной группой. В некоторых вариантах осуществления максимальный или пиковый уровень составляет по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% лизиновых остатков с присоединенной или добавленной тиоловой функциональной
25 группой. В конкретных вариантах осуществления молекула представляет собой тетрамер стрептавидина или мутеина стрептавидина, и максимальный или пиковый уровень тиоловых функциональных групп составляет по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15 или по
30 меньшей мере 16 тиоловых функциональных групп на тетрамер.

В некоторых вариантах осуществления молекулу инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с тиолирующим агентом в течение некоторого периода времени, которое является достаточным для достижения максимального или пикового уровня тиоловых функциональных групп, которые добавляют молекуле. В конкретных
35 вариантах осуществления максимальный или пиковый уровень достигают в пределах 1 минуты, в пределах 2 минут, в пределах 5 минут, в пределах 10 минут, в пределах 15 минут, в пределах 20 минут, в пределах 25 минут, в пределах 30 минут, в пределах 45 минут, в пределах 60 минут, в пределах 90 минут или в пределах 120 минут инкубации, обработки или контакта тиолирующего агента с молекулой.

В конкретных вариантах осуществления тиолирующий агент инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с молекулой, и количество тиоловых функциональных групп, которые добавляют или соединяют с молекулами, достигает пикового или максимального уровня, а затем начинает снижаться после достижения максимума или пика. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, введение в
45 контакт и/или обработку заканчивают после достижения пикового или максимального уровня. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку или введение в контакт заканчивают при или до того, как количество тиоловых функциональных групп, соединенных с молекулами, будет на 50% меньше, 40% меньше, 30% меньше,

25% меньше, 20% меньше, 15% меньше, 10% меньше, 5% меньше или 1% меньше, чем максимальный или пиковый уровень. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт заканчивают в момент времени, когда среднее (например, срединное) количество тиоловых функциональных групп составляет по
5 меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по
10 меньшей мере 40 или по меньшей мере 50 тиоловых функциональных групп. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, введение в контакт и/или обработку заканчивают в момент времени, когда по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по
15 меньшей мере 99% лизиновых остатков имеют присоединенную или добавленную тиоловую функциональную группу. В конкретных вариантах осуществления молекула представляет собой тетрамер стрептавидина или мутеина стрептавидина, и инкубацию, введение в контакт и/или обработку заканчивают в момент времени, когда количество тиоловых функциональных групп составляет по меньшей мере 6, по меньшей мере 7,
20 по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15 или по меньшей мере 16 тиоловых функциональных групп на тетрамер. В конкретных вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт тиолирующего агента и молекулы заканчивают через 1 час. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт тиолирующего агента и молекулы заканчивают
25 через 25 минут.

В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт тиолирующего агента с молекулами, например, тетрамерами стрептавидина или мутеина стрептавидина, проводят при постоянной температуре. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт
30 тиолирующего агента с молекулами проводят при температуре по меньшей мере 4°C, по меньшей мере 8°C, по меньшей мере 12°C, по меньшей мере 16°C, по меньшей мере 20°C, по меньшей мере 24°C, по меньшей мере 28°C, по меньшей мере 32°C, по меньшей мере 37°C, по меньшей мере 39°C, по меньшей мере 50°C, по меньшей мере 60°C, по меньшей мере 70°C, по меньшей мере 80°C, по меньшей мере 90°C или по меньшей мере
35 100°C. В конкретных вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт тиолирующего агента с молекулами проводят при температуре между 4°C и 39°C, между 10°C и 37°C, между 10°C и 25°C, между 20°C и 30°C, между 24°C и 39°C или между 40°C и 100°C. В конкретных вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт тиолирующего агента с молекулами проводят при комнатной
40 температуре. В некоторых вариантах осуществления инкубацию и/или обработку для олигомеризации молекул проводят при или приблизительно при 24°C. В некоторых вариантах осуществления инкубацию и/или обработку для тиолирования молекул проводят при 24°C ± 2°C, ± 1°C, ± 0,5°C, ± 0,2°C, ± 0,1°C, ± 0,05°C или ± 0,01°C.

В конкретных вариантах осуществления тиолирующий агент инкубируют,
45 обрабатывают и/или вводят в контакт с молекулами, например, тетрамерами стрептавидина или мутеина стрептавидина, при некотором молярном соотношении тиолирующего агента и молекул. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт тиолирующего агента и молекул проводят при

молярном соотношении между 1:1 и 10:1 тиолирующего реагента и каждого первичного амина на молекулу. В конкретных вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт тиолирующего агента и молекул проводят при молярном отношении 5:1 тиолирующего реагента к каждому первичному амину на молекулу. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение тиолирующего реагента к каждому первичному амину на молекулу составляет или приблизительно составляет 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1. В конкретных вариантах осуществления молярное отношение тиолирующего реагента к каждому первичному амину на молекулу составляет 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, $\pm 0,1\%$, $\pm 0,05\%$ или $\pm 0,001\%$. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение составляет 1:5, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, $\pm 0,1\%$, $\pm 0,05\%$ или $\pm 0,001\%$. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение тиолирующего агента к молекуле составляет между 1:1 и 1000:1, между 1:1 и 500:1, между 10:1 и 200:1 или между 100:1 и 1000:1. В конкретных вариантах осуществления молярное отношение активирующего агента к молекуле составляет приблизительно 100:1. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение составляет 100:1, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, $\pm 0,1\%$, $\pm 0,05\%$ или $\pm 0,001\%$.

В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт тиолирующего агента с молекулами, например, тетрамерами стрептавидина или мутеина стрептавидина, заканчивают путем удаления или отделения тиолирующего агента от молекул. Способы удаления или отделения молекул, например, белковых или полипептидных молекул, таких как стрептавидин, являются рутинными в данной области и включают такие способы, как хроматография и/или гель-фильтрация. В некоторых вариантах осуществления тиолирующий агент удаляют от молекул с помощью хроматографии. В некоторых вариантах осуществления активирующий агент удаляют от молекул с помощью гель-фильтрационной хроматографии, например, с помощью колонки для обессоливания.

В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе способы получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц содержат и/или включают стадию олигомеризации молекул. В некоторых вариантах осуществления молекулы олигомеризируют путем сшивания отдельных молекул или комплекса субъединиц, которые составляют отдельную молекулу. В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, включают одну или более стадий обработки, инкубации и/или введения в контакт молекул с агентом, который стимулирует олигомеризацию. Например, в некоторых вариантах осуществления молекулы олигомеризируют путем инкубации, обработки и/или введения молекул в контакт с агентом, например, активирующим агентом, который представляет собой линкер или сшивающее средство, например, бифункциональный линкер или сшивающее средство или другой химический линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер или сшивающее средство представляет собой или содержит бифункциональный линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гомобифункциональный линкер, например, линкер по меньшей мере с двумя одинаковыми функциональными и/или реактивными группами. В конкретных вариантах осуществления линкером является гетеробифункциональный линкер, например, линкер по меньшей мере с двумя разными функциональными и/или реактивными группами. В некоторых вариантах осуществления молекулы инкубируют с линкером для олигомеризации, или чтобы они стали способными к олигомеризации. Подходящие линкеры для олигомеризации молекул известны в данной области и включают, но без

ограничения, глутаральдегид, диметил адипимидат (DMA), диметил суберимидат (DMS), диметил пимелимидат (DMP), N-гидроксисукцинимид (NHS), дитиобис (сукцинимидилпропионат (DSP), дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат) (DTSSP), этиленгликоль бис[сукцинимидилсукцинат], NHS сложный эфир, N-ε-малеимидокапроновую кислоту, N-[ε-малеимидокапроновая кислота]гидразид, N-сукцинимидил S-ацетилтиоацетат, N-сукцинимидил S-ацетилтиопропионат, 2-иминотиолан (реагент Трота), 4-сукцинимидилоксикарбонил-метил-(2-пиридилдитио)-толуол сульфосукцинимидил, 4- [N-малеимидометил]-циклогексан-1-карбоксилат, N-[гамма-малеимидобутирилокси] сульфо-сукцинимидовый эфир, N-(K-малеимидундеканокси) сульфосукцинимидовый эфир, малеимидоуксусную кислоту N-гидроксисукцинимидовый эфир, гидразид N-(эпсилон-малеимидокапроновой кислоты), гидразид N-(K-малеимидундекановой кислоты), гидразид N-(бета-малеимидопропионовой кислоты) и гидразид 3-(2-пиридилдитио)пропионил.

В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, содержат и/или включают олигомеризацию молекул, которые были модифицированы, например, химически модифицированы. В конкретных вариантах осуществления одну или более модифицированных молекул олигомеризируют. В конкретных вариантах осуществления одну или более молекул активируют. В некоторых вариантах осуществления модифицированной молекулой является активированная молекула, которая была активирована путем добавления и/или присоединения функциональной группы, которая вступает в реакцию или способна вступать в реакцию в реакции сшивания и/или олигомеризации. В некоторых вариантах осуществления функциональную группу добавляют или соединяют с амином, например, первичным амином, молекулы, например, доступным и/или свободным амином. В некоторых вариантах осуществления амином, например, первичным амином является N-концевой амин. В конкретных вариантах осуществления амин, например, первичный амин находится на лизиновом остатке. В некоторых вариантах осуществления активированную молекулу модифицируют путем добавления и/или присоединения функциональной группы, которая представляет собой или содержит амин-реактивную группу (например, N-гидроксисукцинимидовый эфир, имидовый эфир, пентафторофильный сложный эфир или гидроксиметил фосфин), сульфгидрил-реактивную или тиол-реактивную группу (например, малеимид, галоацетил, пиридилдисульфид, тиосульфат или винилсульфон), альдегид-реактивную группу (например, гидразид или алкоксиамин), фотореактивную группу (например, диазирин или арилазид) и/или гидроксил-реактивную группу (например, изоцианат). В некоторых вариантах осуществления активированную молекулу активировали путем добавления и/или присоединения сульфгидрил-реактивной или тиол-реактивной группы. В некоторых вариантах осуществления активированную молекулу активировали путем добавления и/или присоединения галоацетильной группы, малеимидной группы, азиридиновой группы, акрилоильной группы, арилирующего агента, винилсульфоновой группы, пиридилдисульфида, TNB-тиола или дисульфидного восстанавливающего агента. В некоторых вариантах осуществления активированную молекулу активировали путем добавления и/или присоединения малеимидной группы.

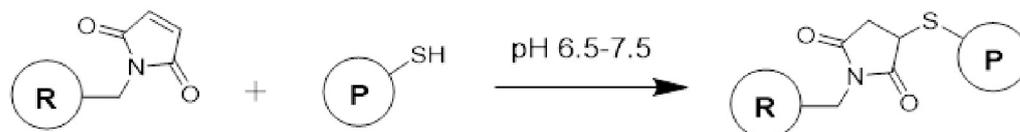
В некоторых вариантах осуществления модифицированная молекула представляет собой тиолированную молекулу. В конкретных вариантах осуществления модифицированную молекулу модифицировали путем тиолирования, например, добавления тиола (т.е. тиоловой группы, тиоловой функции или тиоловой функциональной группы). В конкретных вариантах осуществления тиолированную

молекулу тиолировали путем присоединения и/или добавления тиоловой функциональной группы с одним или более лизиновыми остатками.

В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе способы получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц содержат и/или включают стадию инкубации, обработки или введения в контакт активированных молекул с тиолированными молекулами. В некоторых вариантах осуществления инкубация, обработка и/или введение в контакт олигомеризует и/или приводит к реакции олигомеризации между тиолированными молекулами и активированными молекулами. В конкретных вариантах осуществления олигомеры молекулы образуются путем инкубации, обработки и/или введения в контакт тиолированных молекул с активированными молекулами. В некоторых вариантах осуществления активированная молекула имеет одну или более присоединенных малеимидных групп. В конкретных вариантах осуществления активированная молекула представляет собой или содержит активированную молекулу стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления активированная молекула стрептавидина или мутеина стрептавидина представляет собой или содержит молекулу стрептавидина или мутеина стрептавидина с одной или более присоединенными малеимидными группами. В конкретных вариантах осуществления тиолированная молекула представляет собой тиолированную молекулу стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления тиолированная молекула стрептавидина или мутеина стрептавидина представляет собой молекулу стрептавидина или мутеина стрептавидина с одной или более тиоловыми функциональными группами. В конкретных вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, включают стадию инкубации, введения в контакт и/или обработки тиолированных тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина с активированными тетрамерами стрептавидина или мутеина стрептавидина, например, для олигомеризации тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина.

В конкретных вариантах осуществления молекулы олигомеризируют с помощью реакции сшивания. В некоторых вариантах осуществления часть молекул тиолировали путем добавления молекуле одной или более тиоловых функциональных групп. В некоторых вариантах осуществления тиоловые группы добавляют свободным аминогруппам молекулы, например, на аминовых, например, первичных аминовых, группах лизиновых остатков и/или N-концевом амине, например, N-концевом первичном амине. В некоторых вариантах осуществления часть молекул, которые отделены от тиолированных молекул, активируют путем добавления или присоединения малеимидных групп. В некоторых вариантах осуществления активированные молекулы не содержат цистеиновых остатков и/или тиоловых функциональных групп. Вследствие этого, в некоторых вариантах осуществления активированные молекулы не реагируют с другими активированными молекулами. В некоторых вариантах осуществления инкубируют активированные и тиолированные молекулы, и происходит реакция сшивания между малеимидными функциональными группами активированных молекул и тиоловой функциональной группой тиолированных молекул. Например, ниже проиллюстрирована реакция сшивания между малеимидной функциональной группой на молекуле R и тиоловой (SH) функциональной группой на молекуле P:

45



В некоторых вариантах осуществления реакция между тиоловой функциональной группой и малеимидной функциональной группой подходит для сшивания молекул для образования олигомеров. В некоторых вариантах осуществления молекулами являются тетрамеры стрептавидина или мутеина стрептавидина.

5 В конкретных вариантах осуществления молекулы, например, активированные и тиолированные тетрамеры стрептавидина или мутеина стрептавидина инкубируют и/или обрабатывают в условиях, подходящих для олигомеризации молекул. В конкретных вариантах осуществления инкубацию и/или обработку для олигомеризации молекул проводят при нейтральном рН. В некоторых вариантах осуществления инкубацию и/или обработку для олигомеризации молекул проводят при рН между 5,0 и 9,0, между 6,0 и 8,0, между 6,5 и 7,5 или между 7,0 и 7,5. В некоторых вариантах осуществления инкубацию и/или обработку для олигомеризации молекул проводят при рН приблизительно 6,5, приблизительно 6,6, приблизительно 6,7, приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, 10 приблизительно 7,3, приблизительно 7,4 или приблизительно 7,5. В некоторых вариантах осуществления рН составляет приблизительно 7,2. В конкретных вариантах осуществления рН составляет $7,2 \pm 0,1$, $\pm 0,05$, $\pm 0,02$, $\pm 0,01$, $\pm 0,005$ или ± 00001 .

В некоторых вариантах осуществления молекулы, например, активированные и тиолированные молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина, инкубируют и/или обрабатывают в условиях, которые подходят для олигомеризации молекул, и подходящие условия включают температуру. В некоторых вариантах осуществления инкубацию и/или обработку для олигомеризации молекул проводят при температуре по меньшей мере 4°C , по меньшей мере 8°C , по меньшей мере 12°C , по меньшей мере 16°C , по меньшей мере 20°C , по меньшей мере 24°C , по меньшей мере 28°C , по меньшей мере 32°C , по меньшей мере 37°C , по меньшей мере 39°C , по меньшей мере 50°C , по меньшей мере 60°C , по меньшей мере 70°C , по меньшей мере 80°C , по меньшей мере 90°C или по меньшей мере 100°C . В конкретных вариантах осуществления инкубацию и/или обработку для олигомеризации молекул проводят при температуре между 4°C и 39°C , между 10°C и 37°C , между 10°C и 25°C , между 20°C и 30°C , между 24°C и 39°C или 20 между 40°C и 100°C . В конкретных вариантах осуществления инкубацию и/или обработку для олигомеризации молекул проводят при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления инкубацию и/или обработку для олигомеризации молекул проводят при или приблизительно при 24°C . В некоторых вариантах осуществления инкубацию и/или обработку для олигомеризации молекул проводят при $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $\pm 1^{\circ}\text{C}$, $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$, $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$, $\pm 0,05^{\circ}\text{C}$ или $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$.

В некоторых вариантах осуществления молекулы, например, активированные и тиолированные тетрамеры стрептавидина или мутеина стрептавидина, инкубируют и/или обрабатывают в условиях, которые подходят для олигомеризации молекул в течение некоторого периода времени. В некоторых вариантах осуществления молекулы инкубируют и/или обрабатывают в условиях, которые подходят для олигомеризации молекул в течение от 5 минут до 1 часа, от 15 минут до 2 часов, от 30 минут до 90 минут, от 1 часа до 6 часов, от 6 часов до 24 часов или более 24 часов. В некоторых вариантах осуществления инкубацию и/или обработку для олигомеризации молекул проводят в течение приблизительно 5 минут, 15 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 45 минут, приблизительно 1 часа, приблизительно 1,5 часов, приблизительно 2 часов, 45 приблизительно 3 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 20 часов или приблизительно 24 часов. В некоторых вариантах

осуществления инкубацию и/или обработку для олигомеризации молекул проводят в течение или приблизительно в течение 1 часа. В конкретных вариантах осуществления инкубацию и/или обработку для олигомеризации молекул проводят в течение 1 часа \pm 5 минут, \pm 2 минуты, \pm 1 минуты, \pm 30 секунд, \pm 15 секунд, \pm 10 секунд, \pm 5 секунд или \pm 1 секунды.

В конкретных вариантах осуществления активированные и тиолированные молекулы, например, активированные и тиолированные тетрамеры стрептавидина или мутеина стрептавидина, инкубируют и/или обрабатывают для олигомеризации молекул при некотором молярном отношении активированных молекул к тиолированным молекулам.

В конкретных вариантах осуществления молярное отношение активированных молекул к тиолированным молекулам составляет 1:X. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой количество, т.е. сумму, лизинов и N-концевых аминов на тиолированную молекулу. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой количество свободных или доступных аминогрупп на молекуле. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой количество лизинов на тиолированную молекулу перед добавлением тиоловых функциональных групп. В конкретных вариантах осуществления молярное отношение активированных молекул к тиолированным молекулам составляет или приблизительно составляет 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10. В конкретных вариантах осуществления молярное отношение активированных молекул к тиолированным молекулам составляет 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 или 1:10, \pm 10%, \pm 5%, \pm 2%, \pm 1%, \pm 0,5%, \pm 0,1%, \pm 0,05% или \pm 0,001%. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение составляет 1:4, \pm 10%, \pm 5%, \pm 2%, \pm 1%, \pm 0,5%, \pm 0,1%, \pm 0,05% или \pm 0,001%.

В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт в условиях для олигомеризации молекул, например, тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, заканчивают путем добавления одного или более агентов, например, химического агента, который прекращает и/или способен прекратить реакцию олигомеризации. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой агент, который модифицирует или иным образом предотвращает введение одной или более функциональных групп, например, малеимидных или тиоловых функциональных групп, в реакцию при реакции сшивания или олигомеризации. В некоторых вариантах осуществления молекулы представляют собой активированные и тиолированные молекулы, а один или более агентов представляет собой или содержит агент, который насыщает доступные малеимидные группы, например, с помощью добавления и/или присоединения тиоловой группы, или который расщепляет и/или отсоединяет малеимидные группы от молекул. В некоторых вариантах осуществления не прореагировавшие малеимидные группы можно удалить с помощью агента, который повышает pH. В некоторых вариантах осуществления повышенный pH будет приводить к удалению и/или отсоединению не прореагировавших малеимидных групп, тогда как сшитые малеимидные группы будут стабильными. В некоторых вариантах осуществления один или более агентов включают агент, который катализирует гидролиз малеимидной кольцевой системы, например, с помощью реакции раскрытия кольца. В некоторых вариантах осуществления молекулы представляют собой активированные и тиолированные молекулы, а один или более агентов представляет собой или содержит агент, который модифицирует и/или насыщает тиоловые функциональные группы. В некоторых вариантах осуществления насыщение и/или модификация тиоловых функциональных групп предотвращает реакции олигомеризации и/или сшивания с малеимидными группами. В некоторых вариантах осуществления для прекращения

реакций олигомеризации и/или сшивания активированные и тиолированные молекулы, например, активированные и тиолированные тетрамеры стрептавидина или мутеина стрептавидина, инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с N-этилмалеимидом (NEM).

5 В некоторых вариантах осуществления молекулы, например, активированные и тиолированные тетрамеры стрептавидина или мутеина стрептавидина, инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с агентом, который прекращает и/или способен прекратить реакцию олигомеризации и/или сшивания. В некоторых вариантах осуществления агент, который прекращает и/или способен прекратить реакции

10 олигомеризации и/или сшивания, инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с молекулами при температуре между 4°C и 39°C, между 4°C и 25°C, между 4°C и 10°C или между 20°C и 30°C. В конкретных вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт сначала выполняют при комнатной температуре, а затем выполняют приблизительно при 4°C. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт сначала выполняют при или приблизительно при

15 24°C, а затем выполняют приблизительно при 4°C. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку или введение в контакт сначала выполняют в течение приблизительно 5 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 15 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 60 минут, приблизительно 90 минут или

20 приблизительно 120 минут при комнатной температуре и/или приблизительно при 24°C, а затем инкубируют, вводят в контакт и/или обрабатывают в течение приблизительно 1 часа, приблизительно 2 часов, приблизительно 4 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 24 часов или более 24 часов приблизительно при 4°C. В некоторых

25 вариантах осуществления инкубацию, обработку или введение в контакт сначала выполняют в течение приблизительно 15 минут при комнатной температуре и/или приблизительно при 24°C, а затем выполняют в течение приблизительно 16 часов приблизительно при 4°C. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку или введение в контакт с NEM сначала выполняют в течение приблизительно 15 минут

30 при комнатной температуре и/или приблизительно при 24°C, а затем инкубируют, вводят в контакт и/или обрабатывают в течение приблизительно 16 часов приблизительно при 4°C.

В конкретных вариантах осуществления представленные в данном документе способы получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц включают

35 стадии тиолирования молекул и активации молекул. В некоторых вариантах осуществления разные популяции или множества молекул тиолируют из популяций или множеств молекул, которые активируют. В некоторых вариантах осуществления стадии активации и тиолирования выполняют приблизительно в одно и то же время, например, так чтобы и тиолированные и активированные молекулы были доступны для реакции

40 инкубации без необходимости хранения либо тиолированных, либо активированных молекул, в то время как протекает другой процесс. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть инкубации, обработки и/или введения в контакт тиолирующего агента с молекулами и инкубацию, обработку и/или введение в контакт активирующего агента с молекулами выполняют в одно и то же время.

45 В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 1%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% инкубации, обработки и/или

введения в контакт тиолирующего агента с молекулами проводят во время проведения инкубации, обработки и/или введения в контакт активирующего агента с молекулами. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 1%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%,
5 по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% инкубации, обработки и/или введения в контакт активирующего агента с молекулами проводят во время проведения инкубации, обработки и/или введения в контакт тиолирующего агента с молекулами.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 1 минуту, по меньшей мере
10 5 минут, по меньшей мере 10 минут, по меньшей мере 15 минут, по меньшей мере 30 минут, по меньшей мере 45 минут, по меньшей мере 60 минут, по меньшей мере 90 минут, по меньшей мере 120 минут, по меньшей мере 4 часа, по меньшей мере 6 часов, по меньшей мере 8 часов, по меньшей мере 12 часов, по меньшей мере 16 часов или по меньшей мере 24 часа инкубации, обработки и/или введения в контакт активирующего агента с молекулами проводят во время проведения инкубации, обработки и/или
15 введения в контакт тиолирующего агента с молекулами. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 1 минуту, по меньшей мере 5 минут, по меньшей мере 10 минут, по меньшей мере 15 минут, по меньшей мере 30 минут, по меньшей мере 45 минут, по меньшей мере 60 минут, по меньшей мере 90 минут, по меньшей мере 120
20 минут, по меньшей мере 4 часа, по меньшей мере 6 часов, по меньшей мере 8 часов, по меньшей мере 12 часов, по меньшей мере 16 часов или по меньшей мере 24 часа инкубации, обработки и/или введения в контакт тиолирующего агента с молекулами проводят во время проведения инкубации, обработки и/или введения в контакт активирующего агента с молекулами.

В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в
25 контакт тиолирующего агента и инкубацию, обработку и/или введение в контакт активирующего агента с молекулами начинают приблизительно в одно и то же время. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт тиолирующего агента и инкубацию, обработку и/или введение в контакт активирующего агента с молекулами начинают в пределах 30 минут, в пределах 15 минут, в пределах
30 10 минут, в пределах 5 минут, в пределах 1 минуты, в пределах 30 секунд, в пределах 15 секунд, в пределах 10 секунд, в пределах 5 секунд, в пределах 1 секунды друг от друга. В некоторых вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт тиолирующего агента и инкубацию, обработку и/или введение в контакт активирующего агента с молекулами заканчивают приблизительно в одно и то же
35 время. В конкретных вариантах осуществления инкубацию, обработку и/или введение в контакт тиолирующего агента и инкубацию, обработку и/или введение в контакт активирующего агента с молекулами заканчивают в пределах 30 минут, в пределах 15 минут, в пределах 10 минут, в пределах 5 минут, в пределах 1 минуты, в пределах 30
40 секунд, в пределах 15 секунд, в пределах 10 секунд, в пределах 5 секунд, в пределах 1 секунды друг от друга.

В отдельных вариантах осуществления предусмотрено, что, когда тиоловую функциональную группу присоединяют или добавляют молекуле, тиоловая функциональная группа может изомеризоваться в более стабильную, но неактивную
45 N-замещенную форму. В некоторых аспектах тиоловую функциональную группу добавляют или присоединяют в присутствии 2-иминотиолана (реактанта Трота). В некоторых вариантах осуществления предусмотрено, что, когда тиоловую функциональную группу присоединяют или добавляют молекуле в присутствии 2-

имиотиолана (реагента Трота), тиоловая функциональная группа может изомеризироваться в более стабильную, но неактивную N-замещенную форму. В некоторых вариантах осуществления тиоловые функциональные группы изомеризируются с периодом полураспада, равным или приблизительно равным 139 минутам после удаления тиолирующего агента. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления количество тиоловых функциональных групп на молекулах после инкубации, обработки и/или введения в контакт с тиолирующим агентом уменьшается с течением времени.

В конкретных вариантах осуществления представленные в данном документе способы получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц включают стадии тиолирования молекул, активации молекул и олигомеризации молекул, например, инкубации активированных и тиолированных молекул в условиях, подходящих для олигомеризации. В конкретных вариантах осуществления начало стадии олигомеризации молекулы рассчитывают в пределах или через точное количество времени после завершения или окончания стадии тиолирования. В некоторых вариантах осуществления начало стадии олигомеризации молекулы рассчитывают в пределах или через точное количество времени после завершения или окончания стадии тиолирования и активации.

В конкретных вариантах осуществления стадию олигомеризации молекулы, например, инкубации активированных и тиолированных молекул в условиях, подходящих для олигомеризации, начинают в пределах некоторого периода времени после окончания стадии тиолирования, например, после окончания инкубации молекулы с тиолирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления стадию олигомеризации молекулы начинают или запускают перед потерей, уменьшением или распадом 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,01%, 0,001% или 0,0001% тиоловых функциональных групп, которые соединены с молекулой в конце стадии тиолирования. В конкретных вариантах осуществления стадию олигомеризации молекулы начинают или запускают перед потерей, уменьшением или распадом 10% тиоловых функциональных групп, которые соединены с молекулой в конце стадии тиолирования. В некоторых вариантах осуществления стадию олигомеризации молекулы начинают или запускают в пределах 24 часов, в пределах 16 часов, в пределах 12 часов, в пределах 8 часов, в пределах 6 часов, в пределах 4 часов, в пределах 2 часов, в пределах 90 минут, в пределах 60 минут, в пределах 45 минут, в пределах 30 минут, в пределах 15 минут, в пределах 10 минут, в пределах 5 минут или в пределах 1 минуты после окончания стадии тиолирования. В некоторых вариантах осуществления стадию олигомеризации молекулы начинают или запускают через 6 часов, 5 часов, 4 часа, 3 часа, 2 часа, 90 минут, 60 минут, 45 минут, 30 минут, 15 минут, 10 минут, 5 минут или 1 минуту \pm 5 минут, \pm 2 минуты, \pm 1 минута, \pm 30 секунд, \pm 15 секунд, \pm 10 секунд, \pm 5 секунд или \pm 1 секунда. В некоторых вариантах осуществления стадию олигомеризации молекулы начинают или запускают в пределах 15 минут после окончания стадии тиолирования. В некоторых вариантах осуществления стадию олигомеризации молекулы начинают или запускают через 10 минут \pm 1 минута, \pm 30 секунд, \pm 15 секунд, \pm 10 секунд, \pm 5 секунд или \pm 1 секунда после окончания стадии тиолирования.

В конкретных вариантах осуществления окончание стадии тиолирования, например, инкубации молекулы с тиолирующим агентом, наступает или происходит, когда тиолирующий агент удаляют от молекул, или когда начинают или запускают способ удаления тиолирующего агента. В некоторых вариантах осуществления окончание стадии тиолирования наступает или происходит, когда начинают или запускают способ удаления тиолирующего агента. В конкретных вариантах осуществления способ

удаления тиолирующего агента составляет или включает хроматографию, например, гель-фильтрационную хроматографию. В некоторых вариантах осуществления окончание стадии тиолирования наступает или происходит, когда или в момент, когда образец или раствор, содержащий тиолирующий агент и молекулы, наливают в хроматографическую колонку, например, гель-фильтрационную хроматографическую колонку, для удаления или отделения тиолирующего агента от молекул. В конкретных вариантах осуществления запуск стадии олигомеризации молекулы начинают и/или инициируют, когда активированные молекулы вводят в контакт, добавляют и/или перемешивают с тиолированными молекулами.

В конкретных вариантах осуществления представленные в данном документе способы получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц включают стадию удаления и/или отделения олигомерных реагентов в виде частиц и/или олигомеризированных молекул от неолигомеризированных молекул. В некоторых вариантах осуществления стадия удаления и/или отделения олигомерных реагентов в виде частиц и/или олигомеризированных молекул от неолигомеризированных молекул происходит после завершения или окончания стадии олигомеризации молекулы.

В некоторых вариантах осуществления олигомеризированные реагенты в виде частиц и/или олигомеры молекул удаляют и/или отделяют от неолигомеризированных молекул и от олигомерных частиц, размер которых меньше или ниже порогового размера. В некоторых вариантах осуществления пороговое значение размера представляет собой или содержит радиус по меньшей мере 5 нм, по меньшей мере 10 нм, по меньшей мере 15 нм, по меньшей мере 20 нм, по меньшей мере 25 нм, по меньшей мере 30 нм, по меньшей мере 40 нм, по меньшей мере 50 нм, по меньшей мере 60 нм, по меньшей мере 70 нм, по меньшей мере 75 нм, по меньшей мере 80 нм, по меньшей мере 85 нм или по меньшей мере 90 нм. В некоторых вариантах осуществления пороговое значение размера представляет собой или содержит молекулярную массу по меньшей мере 100 кДа, по меньшей мере 500 кДа, по меньшей мере 1000 кДа, по меньшей мере 2000 кДа, по меньшей мере 5000 кДа, по меньшей мере 10000 кДа, по меньшей мере 50000 кДа, или по меньшей мере 100000 кДа. В некоторых вариантах осуществления пороговый размер не влияет на средний (например, срединный) размер и/или распределение размеров олигомерных реагентов в виде частиц, полученных с помощью способов, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц, например, олигомеры тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, удаляют и/или отделяют от неолигомеризированных частиц с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). В некоторых вариантах осуществления SEC представляет собой методику, которая обеспечивает отделение молекул по размеру без повреждения или разрушения молекул, за счет чего молекулы, меньшие чем эксклюзионный предел, улавливаются в колонке, а молекулы, например, большие чем эксклюзионный предел, без задержки проходят через колонку. В некоторых вариантах осуществления эксклюзионный предел представляет собой размер, который попадает между 1 кДа и 100000 кДа, между 100 кДа и 10000 кДа, между 500 кДа и 1000 кДа, между 500 кДа и 5000 кДа, между 5000 кДа и 20000 кДа, между 10000 кДа и 50000 кДа или между 50000 и 100000 кДа. В некоторых вариантах осуществления эксклюзионный предел больше чем молекулярная масса мономера и/или тетрамера молекулы. В некоторых вариантах осуществления эксклюзионный предел больше чем молекулярная масса тетрамера стрептавидина или мутеина стрептавидина. В конкретных вариантах осуществления собирают все частицы, например, олигомерные частицы, которые проходят через SEC

колонку, например, в свободном объеме, например, без задержки.

В конкретных вариантах осуществления при выполнении SEC порядок, в котором молекулы выходят из колонки, связан с размером молекул, таким образом, в некоторых вариантах осуществления элюат колонки можно собирать в разных фракциях. В некоторых вариантах осуществления фракции можно объединять или выбрасывать для удаления частиц определенных размеров. Например, в некоторых вариантах осуществления фракции можно выбрасывать для удаления частиц, например, олигомерных реагентов в виде частиц, с размером менее чем 100 кДа, менее чем 500 кДа, менее чем 1000 кДа, менее чем 2000 кДа, менее чем 5000 кДа, менее чем 10000 кДа, менее чем 50000 кДа или менее чем 100000 кДа. В некоторых вариантах осуществления при SEC удаляют олигомерные реагенты в виде частиц из нелигандизированных молекул, но не влияют на средний (например, срединный) размер и/или распределение размеров олигомерных реагентов в виде частиц, полученных с помощью способов, представленных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц, например, олигомеризированные тетрамеры стрептавидина или мутеина стрептавидина, можно продолжать сшивать и/или олигомеризировать после инкубации, обработки и/или введения в контакт молекул для завершения или окончания олигомеризации. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе способы получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц включают стадию стабилизации, например, стабилизации размера олигомеров. В некоторых вариантах осуществления стадия стабилизации олигомеров составляет или включает инкубацию, введение в контакт и/или обработку олигомеризированных молекул, например, олигомерных реагентов в виде частиц, стабилизирующим агентом.

В некоторых вариантах осуществления стабилизирующим агентом является любой агент, который предотвращает или способен предотвращать изменение размера частиц, например, олигомерного реагента в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующим агентом является любой агент, который модифицирует функциональную группу на молекуле, или олигомерные частицы, которые вступают в реакцию или способны вступать в реакцию в реакции олигомеризации и/или сшивания. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующим агентом является любой агент, который предотвращает образование, изомеризацию и/или преобразование для получения функциональной группы на молекуле, или олигомерные частицы, которые вступают в реакцию или способны вступать в реакцию в реакции олигомеризации и/или сшивания. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующим реагентом является любой агент, который модифицирует или способен модифицировать галоацетильную группу, малеимидную группу, азиридиновую группу, акрилоильную группу, арилирующий агент, винилсульфоновую группу, пиридилдисульфид, TNB-тиол или дисульфидный восстанавливающий агент, который соединен с молекулой или олигомерными частицами. В конкретных вариантах осуществления стабилизирующим реагентом является любой агент, который предотвращает образование, изомеризацию и/или преобразование для получения галоацетильной группы, малеимидной группы, азиридиновой группы, акрилоильной группы, арилирующего агента, винилсульфоновой группы, пиридилдисульфида, TNB-тиола или дисульфидного восстанавливающего агента, который соединен с молекулой или олигомерными частицами.

В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий агент инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с олигомерными частицами. В некоторых вариантах осуществления олигомерной частицей является олигомерный реагент в виде

частиц, который содержит множество тиолированных молекул и активированных молекул, например, активированных и тиолированных тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина. В некоторых вариантах осуществления олигомерная частица содержит больше тиолированных молекул, которые содержат присоединенный N-замещенный имиотиолан. В некоторых вариантах осуществления инкубация и/или обработка NEM насыщает и/или модифицирует все доступные тиоловые функциональные группы, останавливая таким образом реакцию сшивания и/или олигомеризации. Однако, в некоторых вариантах осуществления N-замещенный имиотиолан не реагирует с NEM, и эти изомеры остаются на молекулах и олигомерных частицах после инкубации с NEM. В некоторых вариантах осуществления повторная изомеризация N-замещенного имиотиолана в тиоловый изомер, вследствие этого, может приводить к пост-синтетическому росту олигомерного реагента в виде частиц, например, за счет дополнительных реакций сшивания и/или олигомеризации, например, с остальными доступными малеимидными группами на других олигомерных частицах.

В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий агент представляет собой агент, который модифицирует, удаляет и/или предотвращает или способен модифицировать, удалять и/или предотвращать повторную изомеризацию N-замещенного имиотиолана в тиоловую функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий агент представляет собой или содержит гидроксилламин. В некоторых вариантах осуществления олигомерную частицу и/или молекулу, которая содержит присоединенный N-замещенный имиотиолан, инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт со стабилизирующим агентом, который модифицирует, удаляет и/или предотвращает или способен модифицировать, удалять и/или предотвращать повторную изомеризацию N-замещенного имиотиолана в тиоловую функциональную группу. В конкретных вариантах осуществления олигомерную частицу и/или молекулу, которая содержит присоединенный N-замещенный имиотиолан, инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с гидроксилламином.

В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий реагент, например, гидроксилламин, вводят в контакт, обрабатывают и/или инкубируют с олигомеризированными молекулами, например, олигомерными реагентами в виде частиц, например, для выполнения реакции стабилизации. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий реагент, например, гидроксилламин, добавляют к олигомеризированным молекулам после проведения и/или завершения реакции сшивания между тиоловыми функциональными группами и малеимидными функциональными группами. В конкретных вариантах осуществления стабилизирующий реагент, например, гидроксилламин, вводят в контакт, обрабатывают и/или инкубируют с олигомеризированными молекулами, например, олигомерными реагентами в виде частиц, после окончания, завершения и/или прекращения реакции сшивания путем добавления NEM к олигомеризированным молекулам. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий реагент, например, гидроксилламин, вводят в контакт, обрабатывают и/или инкубируют с олигомеризированными молекулами, например, олигомерными реагентами в виде частиц, после окончания, завершения и/или прекращения реакции сшивания путем добавления NEM к олигомеризированным молекулам. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий реагент вводят в контакт, обрабатывают и/или инкубируют с олигомеризированными молекулами перед длительным хранением, например, хранением приблизительно при или ниже комнатной температуры, 4°C, -20°C или -80°C в течение по меньшей мере 1 дня, 1 недели, 3 недель, 9 недель, 27 недель, 46 недель или 1 или более лет. В некоторых вариантах

осуществления стабилизирующий реагент, например, гидроксилламин, вводят в контакт, обрабатывают и/или инкубируют с олигомеризированными молекулами, например, олигомерными реагентами в виде частиц, после того как олигомеризированные молекулы загружают на, пропускают через и/или элюируют из колонки, такой как хроматографическая колонка и/или SEC колонка. В конкретных вариантах осуществления стабилизирующий реагент вводят в контакт, обрабатывают и/или инкубируют с олигомеризированными молекулами после того как олигомеризированные молекулы загружают на, пропускают через и/или элюируют из SEC колонки. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий реагент вводят в контакт, обрабатывают и/или инкубируют с олигомеризированными молекулами до любой стадии, когда олигомеризированные молекулы загружают на, пропускают через и/или элюируют из SEC колонки.

В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий реагент, например, гидроксилламин, вводят в контакт, обрабатывают и/или инкубируют с олигомеризированными молекулами, например, олигомерными реагентами в виде частиц, в течение, в течение приблизительно или в течение по меньшей мере 1 минуты, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 120 минут, 4 часов, 6 часов, 8 часов, 12 часов, 16 часов или 24 часов. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий реагент вводят в контакт, обрабатывают и/или инкубируют с олигомеризированными молекулами в течение между 1 минутой и 12 часами, между 1 минутой и 1 часом, между 1 минутой и 30 минутами, между 5 минутами и 30 минутами, между 10 минутами и 60 минутами, между 10 минутами и 20 минутами, между 1 часом и 3 часами, между 1 часом и 2 часами или между 6 часами и 12 часами. В конкретных вариантах осуществления стабилизирующий реагент вводят в контакт, обрабатывают и/или инкубируют с олигомеризированными молекулами в течение от 5 минут до 30 минут или в течение или приблизительно в течение 15 минут. В некоторых вариантах осуществления обработку, контакт и/или инкубацию проводят с перемешиванием и/или качанием, например, плавным качанием и/или перемешиванием.

В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий реагент, например, гидроксилламин, вводят в контакт, обрабатывают и/или инкубируют с олигомеризированными молекулами, например, олигомерными реагентами в виде частиц, при температуре приблизительно равной или равной 4°C, 8°C, 12°C, 16°C, 20°C, 24°C, 28°C, 32°C, 37°C, 39°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C или 100°C. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий реагент вводят в контакт, обрабатывают и/или инкубируют с олигомеризированными молекулами при температуре между 4°C и 39°C, между 10°C и 37°C, между 10°C и 25°C, между 20°C и 30°C, между 24°C и 39°C или между 40°C и 100°C. В конкретных вариантах осуществления стабилизирующий реагент вводят в контакт, обрабатывают и/или инкубируют с олигомеризированными молекулами при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий реагент вводят в контакт, обрабатывают и/или инкубируют с олигомеризированными молекулами при или приблизительно при 23°C, 24°C, 25°C или 26°C \pm 2°C, \pm 1°C, \pm 0,5°C, \pm 0,2°C, \pm 0,1°C, \pm 0,05°C или \pm 0,01°C.

В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий реагент, например, гидроксилламин, удаляют и/или отделяют от олигомеризированных молекул, например, олигомерных реагентов в виде частиц. В конкретных вариантах осуществления реакцию стабилизации заканчивают и/или прекращают путем отделения и/или удаления стабилизирующего реагента от олигомеризированных частиц. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий реагент удаляют и/или отделяют от

олигомеризированных частиц с помощью стадии хроматографии. В конкретных вариантах осуществления стадия хроматографии составляет или содержит сек. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий реагент удаляют и/или отделяют от олигомеризированных молекул с помощью колонки и/или фильтра. В некоторых вариантах осуществления колонка или фильтр представляет собой колонку для обессоливания. В некоторых вариантах осуществления колонка для обессоливания содержит смолу, например, смолу, которая представляет собой или содержит сефадекс, декстран и/или эпихлоргидрин.

В конкретных вариантах осуществления стабилизирующий реагент, например, гидроксилламин, вводят в контакт, обрабатывают и/или инкубируют с олигомеризированными молекулами, например, олигомерными реагентами в виде частиц, в течение от 1 минуты до 1 часа при температуре между 4°C и 39°C, между 10°C и 25°C или между 20°C и 30°C. В некоторых вариантах осуществления стабилизирующий реагент, например, гидроксилламин, вводят в контакт, обрабатывают и/или инкубируют с олигомеризированными молекулами, например, олигомерными реагентами в виде частиц, в течение от 5 минут до 30 минут при температуре между 10°C и 25°C.

В конкретных вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц, например, олигомерные реагенты в виде частиц, которые содержат множество тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, которые инкубируют, обрабатывают или вводят в контакт со стабилизирующим агентом, являются стабильными в отношении размера. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц, которые инкубируют, обрабатывают или вводят в контакт со стабилизирующим агентом, не претерпевают изменения размера с течением времени больше чем 1%, больше чем 5%, больше чем 10%, больше чем 20%, больше чем 25%, больше чем 30%, больше чем 40% или больше чем 50%, изменения размера, например, изменения радиуса или молекулярной массы, в течение периода времени, например, 12 часов, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 10 дней, 14 дней, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель или больше чем 16 недель, когда частицы хранят при комнатной температуре, при или приблизительно при 4°C или ниже, при или приблизительно при -20°C или ниже или при или приблизительно при -80°C. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц, которые инкубируют, обрабатывают или вводят в контакт со стабилизирующим агентом, не претерпевают увеличение размера с течением времени больше чем 1%, больше чем 5%, больше чем 10%, больше чем 20%, больше чем 25%, больше чем 30%, больше чем 40% или больше чем 50%, увеличение размера в течение 12 часов, 24 часов, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 10 дней, 14 дней, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель или более чем 16 недель.

В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в данном документе, включают одну или более стадий фильтрующей стерилизации молекул, например, тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, и/или олигомерных реагентов в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц фильтруют со стерилизацией. В некоторых вариантах осуществления молекулы или олигомерные реагенты в виде частиц фильтруют со стерилизацией перед или после инкубации с активирующим агентом или тиолирующим агентом, перед или после сшивания и/или олигомеризации активированных и тиолированных молекул, перед или после проведения SEC для удаления олигомерных реагентов в виде частиц от

неолигомеризированных молекулы, например, тетрамеров, и/или перед или после инкубации олигомерных реагентов в виде частиц со стабилизирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц отфильтрованы со стерилизацией или допускают это. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц не агрегируют, не засоряют или иным образом не предотвращают или не препятствуют процессу фильтрации со стерилизацией. В некоторых вариантах осуществления фильтрация со стерилизацией включает пропускание раствора, содержащего молекулы или олигомерные реагенты в виде частиц, через пористый фильтр или мембрану. В некоторых вариантах осуществления пористый фильтр или мембрана содержит поры, которые составляют или по меньшей мере приблизительно составляют 0,02 мкм, приблизительно 0,05 мкм, приблизительно 0,1 мкм, приблизительно 0,15 мкм, приблизительно 0,2 мкм, приблизительно 0,22 мкм, приблизительно 0,3 мкм, приблизительно 0,4 мкм, приблизительно 0,45 мкм или приблизительно 0,5 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления поры имеют размер между 0,01 мкм и 1,0 мкм, между 0,1 мкм и 0,05 мкм, между 0,2 мкм и 0,25 мкм, 0,4 и 0,45 мкм, или между 0,2 мкм и 0,45 мкм. В некоторых вариантах осуществления олигомерные частицы имеют радиус и/или средний радиус, который составляет 150 нм или ниже. В конкретных вариантах осуществления олигомерные частицы имеют радиус и/или средний радиус, которые составляет, приблизительно составляет 125 нм, 110 нм или 100 нм или ниже.

В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц готовят, создают и/или получают с помощью способов, представленных в данном документе, а затем хранят. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц хранят в течение некоторого периода времени перед любыми обработками или инкубацией для соединения агентов, например, рецептор-связывающих агентов, с олигомерными реагентами в виде частиц. В конкретных вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц хранят в течение некоторого периода времени после одной или более обработок или инкубации для обратимого связывания агентов, например, рецептор-связывающих агентов, с олигомерными реагентами в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц хранят в виде двух или более аликвот. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц хранят в буфере. В некоторых вариантах осуществления буфер имеет нейтральный рН и/или рН между 6,5 и 7,5, между 6,8 и 7,4 или приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2 или приблизительно 7,3. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц хранят в буфере с рН приблизительно 7,2. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой фосфатный буфер, например, натрий-фосфатный буфер. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц хранят при комнатной температуре, при или приблизительно при 4°C или ниже, при или приблизительно при -20°C или ниже или при или приблизительно при -80°C. В конкретных вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц хранят 12 часов, 24 часа, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 10 дней, 14 дней, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель или больше чем 16 недель. В некоторых вариантах осуществления олигомерные реагенты в виде частиц помещают в буфере с нейтральным рН и хранят при температуре при или приблизительно при -80°C.

В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе способы

получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц включают или содержат стадию инкубации, обработки и/или введения в контакт молекул, например, тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, в условиях, подходящих для олигомеризации молекул, стадию отделения олигомерных реагентов в виде частиц от неолигомеризированных молекул с помощью SEC и стадию инкубации частиц со стабилизирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления стадия инкубации, обработки и/или введения в контакт молекул в условиях, подходящих для олигомеризации молекул, составляет или включает в себя инкубацию тиолированных молекул с одной или более присоединенными тиоловыми функциональными группами с активированными молекулами с одной или более присоединенными малеимидными функциональными группами.

В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе способы получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц включают: стадию инкубации множества тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина с тиолирующим агентом в буфере с щелочным pH в течение некоторого периода времени от 15 до 90 минут для тиолирования тетрамеров, стадию инкубации отдельного множества тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина с активирующим агентом в течение некоторого периода времени от 30 минут до 90 минут для добавления тетрамерам одной или более малеимидных функциональных групп с прекращением инкубации 2-иминотиолана и SMPH в одно и то же время или приблизительно в одно и то же время, стадию инкубации тиолированных и активированных тетрамеров в пределах некоторого периода времени от пяти до пятнадцати минут после окончания инкубации с активацией и тиолированием, стадию отделение олигомерных реагентов в виде частиц от неолигомеризированных молекул с помощью SEC и стадию инкубации частиц со стабилизацией для стабилизации размера олигомерных реагентов в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления способы включают стадию хранения олигомерных реагентов в виде частиц в буферном растворе с нейтральным pH приблизительно при или ниже -80°C , -20°C или 4°C .

В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе способы получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц включают: стадию инкубации множества тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина с 2-иминотиоланом в буфере с щелочным pH между 7,7 и 8,5 при температуре приблизительно 24°C в течение 60 минут для тиолирования тетрамеров, стадию инкубации отдельного множества тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина с SMPH при нейтральном pH 7,2 при температуре приблизительно 24°C в течение 1 часа для добавления тетрамерам одной или более малеимидных функциональных групп, стадию прекращения инкубации 2-иминотиолана и SMPH в одно и то же время путем отделения инкубации 2-иминотиолана и SMPH от тетрамеров с помощью хроматографии, например, сек, стадию инкубации тиолированных и активированных тетрамеров десять минут после окончания инкубации 2-иминотиолана и SMPH, стадию прекращения реакции олигомеризации между тиолированными и активированными тетрамерами после 60 минут путем инкубации тетрамеров с NEM, стадию отделения олигомерных реагентов в виде частиц от неолигомеризированных молекул с помощью SEC и стадию инкубации частиц с гидроксиламином для стабилизации размера олигомерных реагентов в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления способы включают стадию хранения олигомерных реагентов в виде частиц в буферном растворе с нейтральным pH при -80°C . В некоторых вариантах осуществления 2-иминотиолан добавляют в буфер с щелочным pH 8,5. В некоторых

вариантах осуществления буфер представляет собой или содержит 100 мМ боратного буфера. В некоторых вариантах осуществления частицы являются стабильными, например, не претерпевают изменения размера больше чем 10%, в течение по меньшей мере 46 недель.

5 В конкретных вариантах осуществления представленные в данном документе способы получения, создания и/или изготовления олигомерных реагентов в виде частиц включают: стадию инкубации множества тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина с 2-иминотиолоном в буфере с щелочным рН между 7,7 и 8,5 при температуре приблизительно 24°C в течение 60 минут для тиолирования тетрамеров;

10 стадию инкубации отдельного множества тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина с SMPH при нейтральном рН 7,2 при температуре приблизительно 24°C в течение 1 часа для добавления тетрамерам одной или более малеимидных функциональных групп; стадию прекращения инкубации 2-иминотиолана и SMPH в одно и то же время путем отделения инкубации 2-иминотиолана и SMPH от тетрамеров

15 с помощью хроматографии, например, сек; стадию инкубации тиолированных и активированных тетрамеров, необязательно в пределах 10 минут после окончания инкубации 2-иминотиолана и SMPH; стадию прекращения реакции олигомеризации между тиолированными и активированными тетрамерами после или после приблизительно 60 минут путем инкубации тетрамеров с NEM, стадию инкубации частиц

20 с гидроксиламином; стадию SEC и необязательно стадию фильтрации частиц, например, через мембрану и/или фильтр с или приблизительно с размером диаметра пор 0,45 мкм и/или 0,2 мкм. В некоторых вариантах осуществления способы включают стадию хранения олигомерных реагентов в виде частиц в буферном растворе с нейтральным рН при -80°C. В некоторых вариантах осуществления частицы являются стабильными,

25 например, претерпевают изменение размера больше чем 10% в течение по меньшей мере 46 недель.

С. Формат реагента

1. Носитель

30 В некоторых вариантах осуществления реагент содержится на носителе, таком как твердый носитель или поверхность, например, шарик, или твердая фаза или неподвижная фаза (матрица для хроматографии). В некоторых таких вариантах осуществления реагент обратимо иммобилизируют на носителе. В некоторых случаях реагент иммобилизируют на носителе посредством ковалентных связей. В некоторых аспектах реагент нековалентно обратимо иммобилизируют на носителе.

35 В некоторых вариантах осуществления носитель представляет собой твердый носитель. любой твердый носитель (поверхность) можно использовать для обратимой иммобилизации реагента. Иллюстративные примеры твердых носителей, на которых может быть иммобилизован реагент, включают магнитный шарик, полимерный шарик, планшет для клеточной культуры, микротитровальный планшет, мембрану,

40 агарозный шарик, полистирольный шарик или полое волокно. В некоторых аспектах полые волокна можно использовать в виде биореактора в системе размножения клеток Quantum®, поставляемой TerumoVCT Inc. (Lakewood, CO, USA). В некоторых вариантах осуществления реагент ковалентно связан с твердым носителем. В других вариантах осуществления нековалентные взаимодействия также можно использовать для

45 иммобилизации, например, на пластмассовых субстратах. В некоторых вариантах осуществления реагентом может быть, например, стрептавидин или мутеин авидина, который обратимо связывает стрептавидин-связывающий пептид. Такие мутеины стрептавидина можно ковалентно связывать с любой поверхностью, например, смолой

(шариками), используемой для хроматографической очистки, и их продает в таком виде IBA GmbH, Göttingen, например, как Strep-Tactin® Sepharose, Strep-Tactin® Superflow®, Strep-Tactin® Superflow® большой емкости или Strep-Tactin® MacroPrep®. Другие иллюстративные примеры, которые легко достать на рынке, представляют собой смолы для аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных металлов (ИМАС), такие как смолы TALON® (Westburg, Leusden, Netherlands), которые можно использовать для обратимой иммобилизации меченных олиго-гистидином (his-меченных) белков, например, для обратимого связывания агента (например, рецептор-связывающего агента или селективного агента), который содержит в качестве партнера С по связыванию олигогистидиновую метку, такую как пента- или гекса-гистидиновая метка. Другие примеры включают кальмодулин сефарозу, поставляемую GE Life Sciences, которую можно использовать вместе с агентом (например, рецептор-связывающим агентом или селективным агентом), который содержит кальмодулин-связывающий пептид в качестве партнера С по связыванию или сефарозу, с которой связан глутатион. В некоторых таких случаях партнером С по связыванию является глутатион-S-трансфераза.

В некоторых вариантах осуществления носитель имеет твердую фазу или неподвижную фазу. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления реагент содержится на твердой фазе или неподвижной фазе (также называемой матрица для хроматографии). В некоторых таких вариантах осуществления реагент обратимо иммобилизуют на твердой фазе или неподвижной фазе. В некоторых случаях реагент обратимо иммобилизуют на неподвижной фазе посредством ковалентных связей. В некоторых аспектах реагент нековалентно обратимо иммобилизуют на неподвижной фазе.

В качестве матрицы для хроматографии можно использовать любой материал. Обычно, подходящий хроматографический материал является по существу безвредным, т.е. в нужных условиях не наносит ущерба жизнеспособности клеток, например, при использовании в наполненной хроматографической колонке. В некоторых вариантах осуществления неподвижная фаза остается в заданном месте, например, в заданном положении, тогда как положение образца изменяется. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления неподвижная фаза является частью хроматографической системы, через которую протекает подвижная фаза (либо в виде сквозного потока, либо в периодическом режиме), и где происходит распределение между фазами компонентов, содержащихся в жидкой фазе (либо растворенных, либо диспергированных).

В некоторых вариантах осуществления матрица для хроматографии имеет вид твердой или полутвердой фазы, тогда как образец, который содержит клетку-мишень, которую нужно выделить/отделить, представляет собой текучую фазу. Матрица для хроматографии может представлять собой материал в виде частиц (любого подходящего размера и формы) или монолитный хроматографический материал, включая бумажную подложку или мембрану. Таким образом, в некоторых аспектах хроматография может представлять собой как колоночную хроматографию, так и плоскостную хроматографию. В некоторых вариантах осуществления в дополнение к стандартным хроматографическим колонкам для методов на основе колонки/проточного режима можно использовать колонки, обеспечивающие двунаправленный поток, такие как колонки PhyTip®, поставляемые PhyNexus, Inc. San Jose, CA, U.S.A., или наконечники для пипеток. Таким образом, в некоторых случаях хроматографические колонки, используемые в настоящих способах, также представляют собой наконечники для

пипеток или колонки, обеспечивающие двунаправленный поток. В некоторых случаях, например, при использовании матричного материала в виде частиц матричный материал в виде частиц может, например, иметь срединный размер частиц от приблизительно 5 мкм до приблизительно 200 мкм или от приблизительно 5 мкм до приблизительно 400 мкм или от приблизительно 5 мкм до приблизительно 600 мкм. В некоторых аспектах матрица для хроматографии может, например, представлять собой или содержать полимерную смолу или оксид металла или оксид металлоида. В некоторых аспектах, например, при использовании плоскостной хроматографии матричным материалом может быть любой материал, подходящий для плоскостной хроматографии, такой как обычные мембраны на основе целлюлозы или на основе органического полимера (например, бумажная мембрана, нитроцеллюлозная мембрана или поливинилидендифторидная (PVDF) мембрана) или стеклянные пластины с покрытием на основе двуокиси кремния. В одном варианте осуществления матрица для хроматографии/неподвижная фаза представляет собой немагнитный материал или не поддающийся намагничиванию материал.

В некоторых вариантах осуществления немагнитные или не поддающиеся намагничиванию неподвижная или твердая фазы для хроматографии, которые подходят для настоящих способов, включают образующий производное диоксид кремния или сшитый гель. В некоторых аспектах сшитый гель может быть на основе природного полимера, например, на основе класс полимеров, которые встречаются в природе. Например, природный полимер, на котором может быть основана неподвижная фаза для хроматографии, представляет собой полисахарид. В некоторых вариантах осуществления твердая фаза или неподвижная фаза представляет собой полистирольный шарик. В некоторых случаях соответствующий полисахарид обычно является сшитым. Пример полисахаридной матрицы включает, но без ограничения, агарозный гель (например, агарозу Superflow® или материал Sepharose®, таких как Superflow® Sepharose®, которые продаются с разными размерами шариков и пор) или гель из сшитого декстрана (декстранов). Дополнительный иллюстративным примером является сшитую агарозную матрицу в виде частиц, с которой декстран ковалентно связан, которая продается (с разными размерами шариков и с разными размерами пор) как Sephadex® или Superdex®, и то и другое поставляется GE Healthcare. Другим иллюстративным примером такого хроматографического материала является Sephacryl®, который также продает GE Healthcare с разными размерами шариков и пор. Другим иллюстративным примером такого хроматографического материала являются полистирольные шарики CytoSorb.

В некоторых вариантах осуществления сшитый гель также может быть на основе синтетического полимера, такого как на класс полимеров, которые не встречаются в природе. В некоторых аспектах таким синтетическим полимером, на котором основана неподвижная или твердая фаза для хроматографии, является полимер, который имеет полярные мономерные звенья и который, вследствие этого, сам является полярным. Таким образом, в некоторых случаях такой полярный полимер является гидрофильным. Гидрофильные молекулы, также называемые липофобными, в некоторых аспектах содержат фрагменты, которые могут образовывать диполь-дипольное взаимодействие с молекулами воды. В общем, гидрофобные молекулы, также называемые липофильными, имеют тенденцию к отделению от воды.

Иллюстративными примерами подходящих синтетических полимеров являются полиакриламид (полиакриламиды), стирол-дивинилбензолный гель и сополимер акрилата и диола или акриламида и диола. Иллюстративным примером является

полиметакрилатный гель, продаваемый как Fractogel®. Дополнительным примером является сополимер этиленгликоля и метакрилата, продаваемый как Toyoparl®. В некоторых вариантах осуществления неподвижная фаза для хроматографии также может содержать природные и синтетические полимерные компоненты, такие как

5 композитная матрица или композит или сополимер полисахарида и агарозы, например, полиакриламид/агарозный композит, или полисахарида и N,N'-метиленабисакриламида. Иллюстративным примером сополимера декстрана и N,N'-метиленабисакриламида является вышеупомянутая серия материала Sephacryl®. В некоторых вариантах

10 осуществления образующий производное диоксид кремния может содержать частицы диоксида кремния, которые связаны с синтетическим или с природным полимером. Примеры таких вариантов осуществления включают, но без ограничения, диоксид кремния с привитым полисахаридом, диоксид кремния с привитым

15 поливинилпирролидоном, диоксид кремния с привитым полиэтиленоксидом, диоксид кремния с привитым поли(2-гидроксиэтиласпартамидом) и диоксид кремния с привитым поли(N-изопропилакриламидом).

В некоторых вариантах осуществления матрица для хроматографии представляет собой матрицу для гель-фильтрации, например, при использовании в картридже для удаления, как описано в данном документе. Обычно, гель-фильтрация может характеризоваться свойством, которое, как предполагается, ей понадобится.

20 Следовательно, матрица для гель-фильтрации в некоторых аспектах позволяет отделять клетки или другие биологические объекты главным образом на основе их размера. В некоторых таких аспектах соответствующая матрица для хроматографии обычно представляет собой пористый материал в виде частиц, который упоминался выше. Матрица для хроматографии может иметь определенный эксклюзионный предел,

25 который обычно определяют в показателях молекулярной массы, выше которой полностью исключается попадание молекул в поры. В некоторых вариантах осуществления можно выбрать соответствующую молекулярную массу, определяющую эксклюзионный предел, чтобы она была ниже массы, соответствующей массе клеточных мишеней. В таком варианте осуществления предотвращают попадание клетки-мишени

30 в поры матрицы для эксклюзионной хроматографии. Также, неподвижная фаза может иметь поры, которые имеют размер, меньший, чем размер выбранной клетки-мишени. В иллюстративных вариантах осуществления матрица для хроматографии имеет срединный размер пор от 0 до приблизительно 500 нм.

В некоторых вариантах осуществления компоненты, присутствующие в образце,

35 такие как агенты (например, рецептор-связывающие агенты или селективные агенты) или конкурентный реагент, могут иметь размер, более низкий, чем эксклюзионный предел пор и, таким образом, могут поступать в поры матрицы для хроматографии. В некоторых аспектах из таких компонентов, которые способны частично или полно поступать в объем пор, первыми могут элюировать более крупные молекулы с меньшим

40 доступом в объем пор, тогда как наименьшие молекулы обычно элюируют последними. В некоторых вариантах осуществления эксклюзионный предел матрицы для хроматографии выбирают так, чтобы он был ниже максимальной ширины клетки-мишени. Следовательно, в некоторых аспектах компоненты, которые имеют доступ в объем пор, могут оставаться в/на матрице для хроматографии дольше, чем клетка-мишень. Таким образом, в некоторых случаях клетки-мишени можно собирать в элюате хроматографической колонки отдельно от других материалов/компонентов образца. Вследствие этого, в некоторых аспектах компоненты, такие как агент (например, рецептор-связывающий агент или селективный агент) или когда применимо

конкурентный реагент, могут элюировать из матрицы для гель-фильтрации в более поздний момент времени, чем клетка-мишень. В некоторых вариантах осуществления этот эффект можно дополнительно увеличить, например, если матрица для гель-проникающей хроматографии содержит реагент (например, ковалентно связанный на нем), который содержит участки Z связывания, которые способны связывать агенты (например, рецептор-связывающие агенты или селективные агенты) и/или конкурентный реагент, присутствующий в образце. В некоторых случаях агент (например, рецептор-связывающий агент или селективный агент) и/или конкурентный реагент может быть связан участками Z связывания реагента и, таким образом, иммобилизован на матрице. В некоторых аспектах этот способ осуществляют в картридже для удаления.

В некоторых вариантах осуществления матрица для хроматографии, используемая в настоящих способах, также может содержать магнитно притягиваемое вещество, такое как одна или более магнитно притягиваемых частиц или ферромагнитная жидкость. Соответствующие магнитно притягиваемые частицы могут содержать реагент с участком связывания, который способен связывать клетку-мишень. В некоторых случаях магнитно притягиваемые частицы могут содержать диамагнитный, ферромагнитный, парамагнитный или суперпарамагнитный материал. В общем, суперпарамагнитный материал реагирует на магнитное поле с индуцированным магнитным полем без полученной в результате постоянной намагниченности. Магнитные частицы на основе оксида железа, например, покупают у Dynal Biotech как Dynabeads®, у Miltenyi Biotec как магнитные MicroBead, у CPG Inc. Как магнитные пористые стеклянные шарики, а также в разных других источниках, таких как Roche Applied Science, BIOCLON, BioSource International Inc. micromod, AMBION, Merck, Bangs Laboratories, Polysciences или Novagen Inc., и упомянуто только несколько. Магнитные наночастицы на основе суперпарамагнитных Co и FeCo, а также ферромагнитных Co нанокристаллов были описаны, например, у Hutten, A. et al. (J. Biotech. (2004), 112, 47-63). В других вариантах осуществления матрица для хроматографии, используемая в настоящих способах, лишена какого-либо магнитно притягиваемого вещества.

В некоторых вариантах осуществления предоставлено устройство, которое содержит по меньшей мере одну компоновку первой и второй неподвижной фазы, такое как хроматографическая колонка для отбора клеток (сортировочный картридж) и вторая хроматографическая колонка (картридж для удаления) для удаления реагентов. Устройство может содержать множество компоновок, в которых первая и вторая неподвижные фазы (хроматографические колонки) последовательно соединены с возможностью прохождения текучей среды. Устройство может содержать впуск для образцов, соединенный с возможностью прохождения текучей среды, с первой неподвижной фазой первой компоновки первой и второй неподвижных фаз. В некоторых вариантах осуществления устройство также может содержать выпуск для образцов для клеток, причем выпуск для образцов соединен с возможностью прохождения текучей среды со второй неподвижной фазой последней из по меньшей мере одной компоновки первой и второй неподвижных фаз для хроматографии. В некоторых аспектах устройство также может содержать контейнер для конкурентных реагентов, который соединен с возможностью прохождения текучей среды по меньшей мере с одной из первых неподвижных фаз компоновок первой и второй неподвижных фаз.

2. Растворимые реагенты

В некоторых вариантах осуществления реагент не связан с твердым носителем, т.е. Он присутствует в растворимой форме или является растворимым. В принципе, можно использовать тот же самый реагент, как в случае реагента, которые иммобилизируют

на носителе, таком как твердый носитель или неподвижная фаза. Например, любой из иллюстративных реагентов, описанных выше, можно использовать без иммобилизации или присоединения такого реагента к носителю, например, не присоединяя твердый носитель или неподвижную фазу. В некоторых вариантах осуществления реагент
5 содержит множество участков связывания, Z, для обратимого связывания со связывающим агентом посредством взаимодействия с партнером по связыванию, С. В некоторых случаях реагент представляет собой олигомер или полимер из отдельных молекул или олигомер или полимер из комплекса субъединиц, которые составляют отдельную молекулу (например, олигомеры или полимеры димерного, тримерного или
10 тетрамерного белка). В некоторых вариантах осуществления реагентом может быть, например, олигомер мутеина стрептавидина, олигомер кальмодулина, соединение (олигомер), которое обеспечивает по меньшей мере две хелатирующие группы К, при этом по меньшей мере две хелатирующие группы способны связываться с ионом переходного металла, таким образом делая реагент, способным связываться с
15 олигогистидиновой аффинной меткой, мультимерной глутатион-S-трансферазой или биотинилированным белком-носителем.

В некоторых вариантах осуществления реагент характеризуется отсутствием твердого носителя (поверхности), соединенного с реагентом. Например, в некоторых вариантах осуществления реагент не содержит или не присоединен (прямо или непрямо) к частице,
20 шарик, наночастицам, микросфере или другому твердому носителю. В некоторых вариантах осуществления реагент не является жестким, негибким или прочным или не содержит или не соединен с жесткой, негибкой или прочной поверхностью. В некоторых вариантах осуществления реагент является гибким или по существу гибким. В некоторых случаях реагент способен приспособляться или адаптироваться к форме поверхности
25 клеток. В некоторых вариантах осуществления реагент не имеет или не содержит форму, которая является сферической или по существу сферической.

В некоторых вариантах осуществления по существу весь реагент, т.е. более чем 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, представляет собой,
30 состоит из или содержит органический материал. Например, в некоторых вариантах осуществления больше чем 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более реагента представляет собой, состоит из или содержит липиды, углеводы, белки, пептиды или их смеси. В некоторых вариантах осуществления реагент по существу не представляет собой, не состоит из или не содержит неорганический материал, неорганический сердечник, например, металлический, например, железный,
35 синтетические или неорганические полимеры, такие как стирольные полимеры, например, полистирольные, латексные, магнитные сердечники или из диоксида кремния. Например, в некоторых вариантах осуществления относительное процентное значение неорганического материала реагента или материала, составляющего часть реагента, менее чем 20%, 15%, 10%, 5% или меньше.

В некоторых вариантах осуществления большая часть (т.е. больше чем 50%),
40 например, больше чем 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более от общего объема реагента в водном растворе состоит из отдельных белковых молекул, которые содержат реагент, такой как олигомеры или полимеры из отдельных молекул или комплекса субъединиц, которые составляют отдельную молекулу (например, тетрамерную молекулу). В некоторых вариантах осуществления общая плотность растворимого
45 реагента меньше чем $1,2 \text{ г/см}^3$, $1,1 \text{ г/см}^3$, $1,0 \text{ г/см}^3$ или менее.

В некоторых вариантах осуществления растворимый реагент, например, не соединенный с носителем или твердым носителем (например, не соединенный с

шариком), имеет относительно маленький размер, например, размера обычно менее чем или приблизительно менее чем 20 нм, например, менее чем или приблизительно менее чем 15 нм, менее чем или приблизительно менее чем 10 нм, менее чем или приблизительно менее чем 5 нм или меньший.

5 В некоторых вариантах осуществления растворимый реагент, например, не соединенный с носителем или твердым носителем (например, не соединенный с шариком), является биологически инертным, т.е. Нетоксичным к живым клеткам. В некоторых вариантах осуществления реагент может быть биоразлагаемым, например, он может разлагаться за счет ферментативной активности или расщепляться
10 фагоцитарными клетками.

В некоторых вариантах осуществления можно вводить реагент (например, стрептавидин или мутеин, например, тетрамерные мутеины стрептавидина) в реакцию с носителем, таким как органический носитель. В некоторых аспектах в дополнение к реакции с полисахаридом в качестве белка-носителя также можно использовать
15 физиологически или фармацевтически приемлемые белки, такие как сывороточный альбумин (например, человеческий сывороточный альбумин (HSA) или бычий сывороточный альбумин (BSA)). В таких случаях реагент, такой как стрептавидин или мутеин стрептавидина (либо в виде отдельного тетрамера, либо также в виде олигомеров), можно соединить с белком-носителем посредством нековалентного
20 взаимодействия. В некоторых таких вариантах осуществления биотинилированный BSA (который продается разными поставщиками, такими как ThermoFisher Scientific, Sigma Aldrich или Vectorlabs, причем упомянуто только несколько) можно вводить в реакцию с реагентом (например, мутеином стрептавидина). В некоторых аспектах некоторые из олигомеров реагента (например, олигомеры стрептавидина) могут
25 нековалентно связываться посредством одного или более участков Z связывания с биотинилированным белком-носителем, оставляя большую часть участков Z связывания олигомера доступными для связывающего агента (например, рецептор-связывающего агента или селективного агента) и любого дополнительного агента, который описан в данном документе. Таким образом, с помощью такого подхода можно получать
30 растворимый реагент с множеством участков Z связывания.

В некоторых вариантах осуществления реагент, такой как мутеин стрептавидина (либо в виде отдельного тетрамера, либо также в виде олигомера), может быть ковалентно связан с синтетическим носителем, таким как молекула полиэтиленгликоля (PEG). Для этой цели можно использовать любую подходящую молекулу PEG, например,
35 и молекула PEG и соответствующий реагент могут быть растворимыми. Обычно, молекулы PEG до молекулярной массы 1000 Да являются растворимыми в воде или в культуральной среде, которую можно использовать в настоящих способах. В некоторых случаях такой реагент на основе PEG можно получать с использованием продаваемых активированных молекул PEG (например, производных PEG-NHS, поставляемых NOF
40 North America Corporation, Irvine, California, USA, или активированных производных PEG, поставляемых Creative PEGWorks, Chapel Hills, North Carolina, USA) с аминогруппами мутеина стрептавидина.

3. Агенты

В некоторых вариантах осуществления агент (например, рецептор-связывающий
45 агент или селективный агент) имеет один или более участков связывания, В, для связывания с молекулой на поверхности клетки, например, с молекулой клеточной поверхности. Таким образом, в некоторых случаях агент (например, рецептор-связывающий агент или селективный агент) содержит участок В связывания или

множество участков В связывания, при этом специфическое связывание между агентом (рецептор-связывающим агентом или селективным агентом) и молекулой на поверхности клеток-мишеней включает взаимодействие между В и молекулой. В некоторых вариантах осуществления агент содержит только один участок связывания, т.е. является

5 моновалентным. В некоторых вариантах осуществления агент (например, рецептор-связывающий агент или селективный агент) имеет по меньшей мере два, например, множество участков В связывания, включая три, четыре или пять участков В связывания, способных связываться с молекулой клеточной поверхности. В некоторых таких

10 аспектах по меньшей мере два или множество участков В связывания могут быть идентичными. В некоторых вариантах осуществления один или более из по меньшей мере двух или множества участков В связывания могут быть разными (например, В1 и В2).

В некоторых вариантах осуществления один или более разных агентов (например, один или более разных рецептор-связывающих агентов, селективных агентов или других

15 агентов, которые связываются с молекулой на клетке) обратимо связаны с реагентом. В некоторых вариантах осуществления реагент представляет собой олигомерный реагент в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 2, 3, 4 или более разных агентов обратимо связаны с одним и тем же реагентом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два разных агента обратимо связаны с

20 одним и тем же реагентом, за счет чего каждый реагент содержит участок В связывания или множество участков В связывания для специфического связывания между агентом и молекулой. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два или более агентов содержат одинаковый участок В связывания, например, для связывания одинаковой или по существу одинаковой молекулы. В некоторых вариантах

25 осуществления по меньшей мере два или более агентов содержат разные участки В связывания, например, для связывания с разными молекулами. В некоторых вариантах осуществления первый агент (например, первый рецептор-связывающий агент или первый селективный агент) содержит участок В1, В2, В3, В4 связывания и т.д., а второй агент (например, второй рецептор-связывающий агент или второй селективный агент)

30 содержит другой участок В1, В2, В3, В4 связывания и т.д. В некоторых вариантах осуществления первый агент (например, первый селективный агент) содержит участок В1 связывания, а второй агент (например, второй селективный агент) содержит участок В3 связывания. В некоторых вариантах осуществления первый агент (например, первый рецептор-связывающий агент) содержит участок В2 связывания, а второй агент

35 (например, второй рецептор-связывающий агент) содержит участок В4 связывания. В любом из таких вариантов осуществления первый агент и второй агент может содержать партнер по связыванию, С1 или С2. В некоторых вариантах осуществления С1 и С2 могут быть одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления С1 и С2 разные. В некоторых вариантах осуществления первый агент и второй агент содержат одинаковый

40 партнер по связыванию, С1.

В некоторых случаях константа диссоциации (K_d) связывания между агентом (например, посредством участка В связывания) и участком Z связывания реагента могут иметь значение в диапазоне от приблизительно 10^{-2} М до приблизительно 10^{-13} М или

45 от приблизительно 10^{-3} М до приблизительно 10^{-12} М или от приблизительно 10^{-4} М до приблизительно 10^{-11} М, или от приблизительно 10^{-5} М до приблизительно 10^{-10} М. В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) для связывания между связывающим агентом и молекулой имеет низкую аффинность, например, в диапазоне

от K_d приблизительно 10^{-3} до приблизительно 10^{-7} М. В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) для связывания между связывающим агентом и молекулой является имеет высокую аффинность, например, в диапазоне от K_d приблизительно 10^{-7} до приблизительно 1×10^{-10} М.

В некоторых вариантах осуществления диссоциация связывания агента посредством участка В связывания и молекулы происходит достаточно быстро, например, обеспечивая только временное окрашивание клетки-мишени, или связывание с агентом после нарушения обратимой связи между реагентом и агентом. В некоторых случаях при выражении в показателях скорости k_{off} (также называемой константа скорости диссоциации для связывания между агентом (через участок В связывания) и молекулой скорость k_{off} составляет приблизительно $0,5 \times 10^{-4}$ сек $^{-1}$ или более, приблизительно 1×10^{-4} сек $^{-1}$ или более, приблизительно 2×10^{-4} сек $^{-1}$ или более, приблизительно 3×10^{-4} сек $^{-1}$ или более, приблизительно 4×10^{-4} сек $^{-1}$ или более, приблизительно 5×10^{-4} сек $^{-1}$ или более, приблизительно 1×10^{-3} сек $^{-1}$ или более, приблизительно $1,5 \times 10^{-3}$ сек $^{-1}$ или более, приблизительно 2×10^{-3} сек $^{-1}$ или более, приблизительно 3×10^{-3} сек $^{-1}$ или более, приблизительно 4×10^{-3} сек $^{-1}$, приблизительно 5×10^{-3} сек $^{-1}$ или более, приблизительно 1×10^{-2} SECили более или приблизительно 5×10^{-1} сек $^{-1}$ или более. Уровень квалификации специалиста позволяет эмпирически определять диапазон скорости k_{off} , подходящий для взаимодействия конкретных молекул агента и клетки (см., например, опубликованную заявку США № US2014/0295458). Например, можно использовать агент с довольно высокой скоростью k_{off} , например, больше чем $4,0 \times 10^{-4}$ сек $^{-1}$, так что после нарушения связывания комплексов, большую часть агента можно удалить или диссоциировать в течение одного часа. В других случаях можно использовать агент с более низкой скоростью k_{off} , например, $1,0 \times 10^{-4}$ сек $^{-1}$, так что после нарушения связывания комплексов большую часть агента можно удалить или диссоциировать из клетки в течение приблизительно 3 с половиной часов.

В некоторых вариантах осуществления K_d этой связи, а также скорость K_d , k_{off} и k_{on} связи, образованной между участком В связывания агента (например, рецептор-связывающего агента или селективного агента) и молекулой клеточной поверхности, можно определить с помощью любого подходящего средства, например с помощью флуоресцентного титрования, равновесного диализа или поверхностного плазмонного резонанса.

В некоторых аспектах молекула клеточной поверхности представляет собой молекулу, против которой можно направить агент (например, рецептор-связывающий агент или селективный агент). В некоторых вариантах осуществления молекула клеточной поверхности представляет собой пептид или белок, такой как рецептор, например, рецепторный белок мембраны. В некоторых вариантах осуществления рецептор представляет собой липид, полисахарид или нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления молекулой клеточной поверхности, которая представляет собой белок, может быть периферический мембранный белок или интегральный мембранный белок. В некоторых вариантах осуществления молекула клеточной поверхности может иметь один или более доменов, которые охватывают мембрану. В виде нескольких иллюстративных примеров мембранным белком с трансмембранным

доменом может быть G-белоксопряженный рецептор, такой как рецепторы запахов, родопсиноподобный рецептор, рецептор феромона и родопсина, рецептор пептидных гормонов, вкусовой рецептор, GABA рецептор, опиатный рецептор, рецептор серотонина, Ca²⁺ рецептор, меланопсин, нейротрансмиссерный рецептор, такой как лиганд-управляемый, потенциал-управляемый или механически-управляемый рецептор, включая ацетилхолиновый, никотиновый, адренергический, норэпинефриновый, катехоламиновый, L-DOPA-, допаминовый и серотониновый (биогенный аминовый, эндофриновый/энкефалиновый) нейропептидный рецептор, рецепторкиназа, такая как серин/треонинкиназа, тирозинкиназа, пориновый канал, такой как хлоридный канал, калиевый канал, натриевый канал, OMP белок, ABC транспортер (АТФ-связывающий кассетный транспортер), такой как аминокислотный транспортер, Na-глюкозный транспортер, Na/йодидный транспортер, ионный транспортер, такой как светособирающий комплекс, цитохром с оксидаза, АТФаза Na/K, H/K, Ca, рецептор адгезии клеток, такой как металлопротеаза, интегрин или катерин.

В некоторых вариантах осуществления молекулой клеточной поверхности может быть антиген, определяющий нужную популяцию или субпопуляцию клеток, например, популяцию или субпопуляцию клеток крови, например, лимфоцитов (например, Т-клеток, Т-хелперов, например, CD4+ Т-хелперов, В-клеток или естественных клеток-киллеров), моноцитов или стволовых клеток, например, CD34-положительных периферических стволовых клеток или экспрессирующих Nanog или Oct-4 стволовых клеток. Примеры Т-клеток включают такие клетки, как CMV-специфические CD8+ Т-лимфоциты, цитотоксические Т-клетки, Т-клетки памяти и регуляторные Т-клетки (Treg). Иллюстративным примером Treg являются клетки CD4 CD25 CD45RA Treg, а иллюстративным примером Т-клеток памяти являются CD62L CD8+ специфические центральные Т-клетки памяти. Молекулой клеточной поверхности также может быть маркер для опухолевой клетки.

Как описано выше, в некоторых вариантах осуществления агент (например, рецептор-связывающий агент или селективный агент) в дополнение к участку В связывания, который способен соединять молекулу клеточной поверхности, имеет партнер С по связыванию. В некоторых аспектах данный партнер С по связыванию способен связываться с участком Z связывания реагента, при этом реагент имеет один или более участков связывания для партнера С по связыванию. В некоторых вариантах осуществления нековалентная связь, которая может быть образована между партнером С по связыванию, который содержится в агенте (например, рецептор-связывающем агенте или селективном агенте), и участком (участками) Z связывания реагента, может иметь любую из нужной силы и аффинности и может быть разрываемой или обратимой в условиях, в которых выполняют способ. Агент (например, рецептор-связывающий агент или селективный агент) может содержать по меньшей мере один, в том числе два, три или более дополнительных партнеров С по связыванию, и реагент может содержать по меньшей мере два, например, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или более участков Z связывания для партнера С по связыванию, который содержится в агенте (например, рецептор-связывающем агенте или селективном агенте). Как описано в патенте США 7776562, патент США 8298782 или международной заявке на выдачу патента WO 2002/054065, можно выбрать любую комбинацию партнера С по связыванию и реагента с одним или более соответствующими участками Z связывания, например, таким образом, чтобы партнер С по связыванию и участок Z связывания были способны обратимо связываться в комплексе, например, чтобы вызвать эффект авидности.

Партнер С по связыванию, содержащийся в агенте (например, рецептор-связывающем

агенте или селективном агенте), например, может иметь углеводородную основу (в том числе полимерную) и содержать группы азота, фосфора, серы, карбена, галогена или псевдогалогена. В некоторых аспектах это может быть спирт, органическая кислота, неорганическая кислота, амин, фосфин, тиол, дисульфид, алкан, аминокислота, пептид, олигопептид, полипептид, белок, нуклеиновая кислота, липид, сахарид, олигосахарид или полисахарид. В виде дополнительных примеров, это также может быть катион, анион, поликатион, полианион, поликатион, электролит, полиэлектролит, углеродная нанотрубка или углеродная нанопена. Обычно, такой партнер С по связыванию имеет более высокую аффинность с участком связывания реагента, чем с другим веществом. Примеры соответствующего партнера С по связыванию включают, но без ограничения, краун-эфир, иммуноглобулин, его фрагмент и белковую связывающую молекулу с антителоподобными функциями.

В некоторых вариантах осуществления партнер С по связыванию, который содержится в агенте (например, рецептор-связывающем агенте или селективном агенте), содержит биотин, а реагент содержит аналог стрептавидина или аналог авидина, который обратимо связывается с биотином. В некоторых вариантах осуществления партнер С по связыванию, который содержится в агенте (например, рецептор-связывающем агенте или селективном агенте), содержит аналог биотина, который обратимо связывается со стрептавидином или авидином, а реагент содержит стрептавидин, авидин, аналог стрептавидина или аналог авидина, который обратимо связывается с соответствующим аналогом биотина. В некоторых вариантах осуществления партнер С по связыванию, который содержится в агенте (например, рецептор-связывающем агенте или селективном агенте), содержит стрептавидин или авидин-связывающий пептид, а реагент содержит стрептавидин, авидин, аналог стрептавидина или аналог авидина, который обратимо связывается с соответствующим стрептавидин или авидин-связывающим пептидом.

В некоторых вариантах осуществления реагент представляет собой стрептавидин, такой как мутеин стрептавидина, включая любой описанный выше (например, приведенный в SEQ ID №№: 3-6 или 60-61), а партнер С по связыванию, который содержится в агенте (например, рецептор-связывающем агенте или селективном агенте), может содержать стрептавидин-связывающий пептид. В некоторых вариантах осуществления стрептавидин-связывающий пептид может содержать последовательность с общей формулой, приведенной в SEQ ID NO: 9, например, содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления пептидная последовательность имеет общую формулу, приведенную в SEQ ID NO: 11, такую как приведена в SEQ ID NO: 12. В одном примере пептидной последовательностью является Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (также называется Strep-tag®, приведено в SEQ ID NO: 7). В одном примере пептидной последовательностью является Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (также называемая Strep-tag® II, приведенная в SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления лиганд пептида содержит последовательное расположение по меньшей мере двух стрептавидин-связывающих модулей, при этом расстояние между двумя модулями составляет по меньшей мере 0 и не больше чем 50 аминокислот, при этом один связывающий модуль имеет 3-8 аминокислот и содержит по меньшей мере последовательность His-Pro-Xaa (SEQ ID NO: 9), где Xaa представляет собой глутамин, аспарагин или метионин, и, при этом другой связывающий модуль имеет такой же или другой лиганд пептида стрептавидина, такой как приведен в SEQ ID NO: 11 (см., например, международную опубликованную заявку PCT № WO02/077018; патент США № 7981632). В некоторых вариантах

осуществления лиганд пептида содержит последовательность, имеющую формулу, приведенную в любой из SEQ ID NO: 13 или 14. В некоторых вариантах осуществления лиганд пептида имеет последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 15-19.

5 В некотором варианте осуществления партнер С по связыванию агента (например, рецептор-связывающего агента или селективного агента) содержит фрагмент, известный специалисту как аффинная метка. В таком варианте осуществления реагент может
 10 содержать соответствующий партнер по связыванию, например, антитело или фрагмент антитела, как известно связывающийся с аффинной меткой. В виде нескольких иллюстративных примеров известных аффинных меток партнер С по связыванию,
 который содержится в агенте (например, рецептор-связывающем агенте или селективном агенте), может содержать динитрофенол или дигоксигенин, олигогистидин,
 полигистидин, домен иммуноглобулина, мальтозосвязывающий белок, глутатион-S-
 15 трансферазу (GST), хитин-связывающий белок (CBP) или тиоредоксин, кальмодулин-связывающий пептид (CBP), FLAG'-пептид, HA-tag (последовательность: Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala) (SEQ ID NO: 20), VSV-G-tag (последовательность: Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys) (SEQ ID NO: 21), HSV-tag (последовательность: Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp) (SEQ ID NO: 22), T7-эпитоп (Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly) (SEQ ID NO: 22), мальтозосвязывающий белок (MBP), HSV-
 20 эпитоп последовательности Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp (SEQ ID NO: 24) гликопротеина D вируса простого герпеса, эпитоп «myc» фактора транскрипции c-myc последовательности Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu (SEQ ID NO: 25), V5-tag (последовательность: Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr) (SEQ ID NO: 26) или глутатион-S-трансферазу (GST). В таких вариантах осуществления
 25 комплекс, образованный между одним или более участками Z связывания реагента, которым может быть антитело или фрагмент антитела, и антигеном, можно конкурентно разрушить путем добавления свободного антигена, т.е. свободного пептида (эпитопной метки) или свободного белка (такого как MBP или CBP). В некоторых вариантах осуществления аффинной меткой также может быть олигонуклеотидная метка. В
 30 некоторых случаях такую олигонуклеотидную метку можно использовать, например, для гибридизации с олигонуклеотидом с комплементарной последовательностью, связанной с реагентом или содержащейся в нем.

Дополнительные примеры подходящего партнера С по связыванию включают, но без ограничения, лектин, белок А, белок G, металл, ион металла, производные нитрил
 35 триуксусной кислоты (NTA), RGD-мотивы, декстран, полиэтиленимин (PEI), редокс-полимер, гликопротеины, аптамеры, краситель, амилозу, мальтозу, целлюлозы, хитин, глутатион, кальмодулин, желатин, полимиксин, гепарин, NAD, NADP, лизин, аргинин, бензамидин, поли U, или олиго-dT. Известно, что лектины, такие как конкавалин, связываются с полисахаридами и гликозилированными белками. Иллюстративным
 40 примером красителя является триазиновый краситель, такой как Cibacron blue F3G-A (CB) или Red HE-3B, которые специфически связывают NADH-зависимые ферменты. Обычно, Green A связывается с Co A белками, человеческим сывороточным альбумином и дегидрогеназами. В некоторых случаях красители 7-аминоактиномицин D и 4'-6-
 45 диамидин-2-фенилиндол связываются с ДНК. Обычно, катионы металлов, таких как Ni, Cd, Zn, Co или Cu, обычно используют для связывания аффинных меток, таких как олигогистидинсодержащая последовательность, содержащих гексагистидиновую метку или метку His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys (MAT tag) (SEQ ID NO: 35) и сложный метиловый эфир N-метакрилоил-(L)-цистеина.

В некоторых вариантах осуществления связывание между партнером С по связыванию, который содержится в агенте (например, рецептор-связывающем агенте или селективном агенте), и одним или более участками Z связывания реагента, происходит в присутствии двухвалентного, трехвалентного или четырехвалентного катиона. В связи с этим, в некоторых вариантах осуществления реагент содержит двухвалентный, трехвалентный или четырехвалентный катион, обычно удерживаемый, например, в виде комплекса, посредством подходящего хелатора. В некоторых вариантах осуществления партнер С по связыванию, который содержится в агенте (например, рецептор-связывающем агенте или селективном агенте), может содержать фрагмент, который содержит, например, в виде комплексов, двухвалентный, трехвалентный или четырехвалентный катион. Примеры соответствующего металлического хелатора, включают, но без ограничения, этилендиамин, этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), этиленгликольтетрауксусную кислоту (EGTA), диэтилентри-аминпентауксусную кислоту (DTPA), N, N-бис(карбоксиметил)глицин (также называемый нитрилтриуксусная кислота, NTA), 1,2-бис(о-аминофенокси)этан-N, N,N',N'-тетрауксусную кислоту (ВАРТА), 2,3-димер-капто-1-пропанол (димеркапрол), порфин и гем. Например, EDTA образует комплекс с большинством моновалентных, двухвалентных, трехвалентных и четырехвалентных ионов металлов, таких как, например, серебро (Ag^+), кальций (Ca^{2+}), марганец (Mn^{2+}), медь (Cu^{2+}), железо (Fe^{2+}), кобальт (Co^+) и цирконий (Zr^{4+}), тогда как ВАРТА является специфической к Ca^{2+} . В качестве иллюстративного примера, стандартным способом, используемым в данной области, является образование комплекса между олигогистидиновой меткой и ионами меди (Cu^{2+}), никеля (Ni^{2+}), кобальта (Co^{2+}) или цинка (Zn^{2+}), которые представлены посредством хелатирующей нитрилтриуксусной кислоты (NTA).

В некоторых вариантах осуществления партнер С по связыванию, который содержится в агенте (например, рецептор-связывающем агенте или селективном агенте), содержит кальмодулин-связывающий пептид, а реагент содержит мультимерный кальмодулин, который описан, например, в патенте США 5985658. В некоторых вариантах осуществления партнер С по связыванию, который содержится в агенте (например, рецептор-связывающем агенте или селективном агенте), содержит FLAG-пептид, а реагент содержит антитело, которое связывается с FLAG-пептидом, например, FLAG-пептидом, который связывается с моноклональным антителом 4E11, как описано в патенте США 4851341. В одном варианте осуществления партнер С по связыванию, который содержится в агенте (например, рецептор-связывающем агенте или селективном агенте), содержит олигогистидиновую метку, а реагент содержит антитело или ион переходного металла, связывающий олигогистидиновую метку. В некоторых случаях нарушение всех этих связывающих комплексов можно осуществлять с помощью хелатирования ионов металлов, например, хелатирования кальция, например, путем добавления EDTA или EGTA. В некоторых вариантах осуществления кальмодулин, антитела, такие как 4E11, или хелатированные ионы металлов или свободные хелаторы можно мультимеризировать с помощью обычных способов, например, с помощью биотинилирования и комплексообразования со стрептавидином или авидином или их олигомерами или с помощью введения на первой стадии в полисахарид карбоксильных остатков, например, декстрана, по существу, как описано в Noguchi, et al. *Bioconjugate Chemistry* (1992) 3, 132-137, и связывания на второй стадии кальмодулина или антител или хелатированных ионов металлов или свободных хелаторов посредством первичных аминогрупп с карбоксильными группами в полисахариде, например, декстране, каркасе

с использованием обычной карбодиимидной химии. В некоторых таких вариантах осуществления связывание между партнером С по связыванию, который содержится в агенте (например, рецептор-связывающем агенте или селективном агенте), и одним или более участками Z связывания реагента можно разрушить с помощью хелатирования иона металла. Хелатирование металла, например, можно выполнить путем добавления EGTA или EDTA.

В некоторых вариантах осуществления агент (например, рецептор-связывающий агент или селективный агент), который специфически связывается с молекулой клеточной поверхности, например, может быть представлен антителом, его фрагментом или белковой связывающей молекулой с антителоподобными функциями. В некоторых вариантах осуществления участком В связывания агента является антитело-комбинирующий участок, такой как представляет собой или содержит одну или более определяющих комплементарность областей (CDR) антитела. Примеры фрагментов (рекомбинантных) антител включают, но без ограничения, Fab-фрагменты, Fv-фрагменты, одноцепочечные Fv-фрагменты (scFv), фрагмент двухвалентного антитела, такой как (Fab)²'-фрагмент, диатела, триатела (Piades, P. et al, FEB S Lett (1997) 409, 437-441), декатела (Stone, E. et al, Journal of Immunological Methods (2007) 318, 88-94) и другие доменные антитела (Holt, L.J. et al, Trends Biotechnol. (2003), 21, 11, 484-490), однодоменные антитела (nanobodies®). В некоторых вариантах осуществления агент (например, рецептор-связывающий агент или селективный агент) может содержать двухвалентную белковую искусственную связывающую молекулу, такую как димерный мутеин липокалина, который также известен как «дуокалин».

В некоторых вариантах осуществления агент (например, рецептор-связывающий агент или селективный агент) может иметь один участок В связывания, т.е. Он может быть моновалентным. Примеры моновалентных агентов (например, рецептор-связывающих агентов или селективных агентов) включают, но без ограничения, фрагмент моновалентного антитела, белковую связывающую молекулу с антителоподобными связывающими свойствами или МНС молекулу. Примеры фрагментов моновалентных антител включают, но без ограничения Fab-фрагмент, Fv-фрагмент, однодоменные антитела, например, полученные от верблюдовых нанотела® и одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv), включая двухвалентный одноцепочечный Fv-фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как Fab-фрагменты, Fv-фрагменты, одноцепочечные Fv-фрагменты (scFv), однодоменные антитела, например, полученные от верблюдовых нанотела®, фрагмент двухвалентного антитела, такой как (Fab)²'-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой, или его получают из исходного антитела, которое, как известно, связывается с интересующей молекулой клетки. Разные молекулы антител против молекул клеточной поверхности или их фрагменты хорошо известны в данной области, и любое из множества таких антител можно использовать в качестве агентов в способах согласно данному документу. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой антитело или его фрагмент, который содержит одну или более аминокислотных замен в вариабельной тяжелой цепи исходного или эталонного антитела, например, для создания антитела с измененной аффинностью или которое демонстрирует достаточно быструю скорость диссоциации, как описано выше. Например, пример таких мутации известен в контексте мутантов антитела против CD4 13B8.2 (см., например, патент США № 7482000, заявку на патент США № US 2014/0295458 или международную заявку на выдачу патента №

WO 2013/124474), и любую из таких мутаций можно создать из другого исходного или эталонного антитела.

В некоторых аспектах агенты (например, рецептор-связывающий агент или селективный агент), которые могут быть моновалентными, например, содержат
 5 фрагмент моновалентного антитела или моновалентную искусственную связывающую молекулу (белковую или другую), такую как мутеин на основе полипептида семейства липокалинов (также известный как «Антикалин®), или двухвалентную молекулу, такую как антитело или фрагмент, в которой оставлены оба участка связывания, такие как F (ab')₂ фрагмент.

10 Пример белковой связывающей молекулы с антителоподобными функциями включает мутеин на основе полипептида семейства липокалинов (см., например, WO 03/029462, Beste et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1999) 96, 1898-1903). Обычно, липокалина, такие как билин-связывающий белок, липокалин, ассоциированный с желатиназой
 15 нейтрофилов человека, человеческий Аро липопротеин D или липокалин слезной жидкости человека обладают природными участками связывания лигандов, которые можно модифицировать так, чтобы они связывали заданную мишень. Дополнительные примеры белковой связывающей молекулы с антителоподобными связывающими
 20 свойствами, которые можно использовать в качестве агента (например, рецептор-связывающего агента или селективного агента), который специфически связывается с молекулой клеточной поверхности, включают, но без ограничения, так называемые
 25 глутела (см., например, международную заявку на выдачу патента WO 96/23879), белки на основе анкиринового каркаса (Mosavi, L.K. et al, Protein Science (2004) 13, 6, 1435-1448) или кристаллического каркаса (например, международная заявка на выдачу патента WO 01/04144), белки, описанные в Skerra, J. Mol. Recognit. (2000) 13, 167-187,
 30 Аднектины, тетранектины и авимеры. Обычно, авимеры, включая поливалентные авимерные белки, выявленные путем перемешивания экзонов семейства доменов человеческих рецепторов, включают так называемые А-домены, которые встречаются в виде цепочек множества доменов в нескольких рецепторах поверхности клетки (Silverman, J. et al, Nature Biotechnology (2005) 23, 1556-1561). Аднектины, обычно
 35 получаемые из домена человеческого фибронектина, обычно содержат три петли, которые могут быть сконструированы для иммуноглобулиноподобного связывания с мишенями (Gill, D.S. & Damle, N.K. Current Opinion in Biotechnology (2006) 17, 653-658). Тетранектины, обычно получаемые из соответствующего человеческого гомотримерного белка, также обычно содержат петлевые области в домене лектина С-типа, которые
 40 могут быть сконструированы для нужного связывания. Пептоиды, которые в некоторых случаях могут выступать в качестве лигандов белков, обычно представляют собой олиго (N-алкил) глицины, которые отличаются от пептидов тем, что боковая цепь связана с азотом амида, а не с атомом углерода. Пептоиды обычно устойчивы к протеазам и другим модифицирующим ферментам и могут иметь значительно более высокие клеточную проницаемость, чем пептиды (см., например, Kwon, Y.-U. И Kodadek, T. J. Am. Chem. Soc. (2007) 129, 1508-1509).

Дополнительные примеры подходящих белковых связывающих молекул включают, но без ограничения, EGF-подобный домен, Kringle-домен, домен фибронектина I типа, домен фибронектина II типа, домен фибронектина III типа, PAN домен, Gla домен, SRCR
 45 домен, домен Куница/ингибитора трипсина поджелудочной железы быка, тендамистат, домен ингибитора сериновых протеаз типа Kazal, домен Trefoil (P-типа), домен фактора Виллебранда С-типа, анафилатоксин-подобный домен, CUB домен, повтор I типа тиреоглобулина, домен LDL-рецептора А класса, Sushi домен, Link домен, домен

тромбоспондина I типа, домен иммуноглобулина или иммуноглобулиноподобный домен (например, доменные антитела или верблюжьих антитела из тяжелых цепей), домен лектина C-типа, МАМ домен, домен фактора Виллебранда А-типа, соматомедин В домен, коровий домен WAP-типа с четырьмя дисульфидными связями, домен F5/8 С-типа, домен гемопексина, SH2 домен, SH3 домен, EGF-подобный домен ламининового типа, C2 домен, «Kappabodies» (Ill et al. Protein Eng (1997) 10, 949-57, так называемые «миниантитела» (Martin et al, EMBO J (1994) 13, 5303-5309), диатело (Holliger et al, PNAS USA (1993)90, 6444-6448), так называемые «Janusis» (Traunecker et al, EMBO J (1991) 10, 3655-3659 или Traunecker et al, Int J Рак (1992) Suppl 7, 51-52), нанотело, микроантитело, аффилин, аффитело, ноттин, убиквитин, белок цинковый палец, автофлуоресцирующий белок, DARPs или белок с богатым лейцином повтором. В некоторых вариантах осуществления молекулой нуклеиновой кислоты с антителоподобными функциями может быть аптамер. Обычно, аптамер складывается в определенный трехмерный мотив и показывает высокую аффинность к данной целевой структуре.

В некоторых вариантах осуществления один или более агентов, например, агентов, содержащих партнер по связыванию, такой как партнер С по связыванию, присоединяют, соединяют и/или связывают с олигомерным реагентом в виде частиц. В конкретных вариантах осуществления один или более агентов обратимо присоединяют, соединяют и/или связывают с олигомерным реагентом в виде частиц.

В некоторых вариантах осуществления один или более агентов присоединяют, соединяют и/или связывают, например, обратимо связывают с олигомерными реагентами в виде частиц путем введения в контакт, обработки и/или инкубации одного или более агентов с олигомерными реагентами в виде частиц. В некоторых вариантах осуществления обработку, контакт и/или инкубацию проводят с перемешиванием и/или качанием, например, плавным качанием и/или перемешиванием.

В некоторых вариантах осуществления один или более агентов инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с олигомерными реагентами в виде частиц в течение, в течение приблизительно или в течение по меньшей мере 1 минуты, 5 минут, 10 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут, 120 минут, 4 часов, 6 часов, 8 часов, 12 часов, 16 часов или 24 часов. В некоторых вариантах осуществления один или более агентов инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с олигомерными реагентами в виде частиц в течение между 1 минутой и 12 часами, между 1 минутой и 1 часом, между 1 минутой и 30 минутами, между 10 минутами и 60 минутами, между 10 минутами и 20 минутами, между 1 часом и 3 часами, между 1 часом и 2 часами или между 6 часами и 12 часами. В некоторых вариантах осуществления один или более агентов инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с олигомерными реагентами в виде частиц в течение от 5 минут до 30 минут или в течение или приблизительно в течение 15 минут.

В конкретных вариантах осуществления один или более агентов инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с олигомерными реагентами в виде частиц при температуре составляющей, приблизительно составляющей или составляющей по меньшей мере 4°C, 8°C, 12°C, 16°C, 20°C, 24°C, 28°C, 32°C, 37°C, 39°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C или 100°C. В некоторых вариантах осуществления один или более агентов инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с олигомерными реагентами в виде частиц при температуре между 4°C и 39°C, между 10°C и 37°C, между 10°C и 25°C, между 20°C и 30°C, между 24°C и 39°C или между 40°C и 100°C. В конкретных вариантах осуществления один или более агентов инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с олигомерными реагентами в виде частиц при комнатной температуре. В

некоторых вариантах осуществления один или более агентов инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с олигомерными реагентами в виде частиц при или приблизительно при 23°C, 24°C, 25°C или 26°C ± 2°C, ± 1°C, ± 0,5°C, ± 0,2°C, ± 0,1°C, ± 0,05°C или ± 0,01°C.

5 В некоторых вариантах осуществления один или более агентов инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с олигомерными реагентами в виде частиц в количестве, составляющем, приблизительно составляющем или составляющем по меньшей мере 0,1 мкг, 0,2 мкг, 0,3 мкг, 0,4 мкг, 0,5 мкг, 0,6 мкг, 0,7 мкг, 0,8 мкг, 0,9 мкг, 1,0 мкг, 1,2 мкг, 1,4 мкг, 1,6 мкг, 1,8 мкг, 2,0 мкг, 2,2 мкг, 2,4 мкг, 2,6 мкг, 2,8 мкг или 10 3,0 мкг агентов на 0,5 мкг, 1,0 мкг, 1,5 мкг, 2,0 мкг, 2,5 мкг, 3,0 мкг, 4,0 мкг, 5,0 мкг, 6 мкг, 7 мкг, 8 мкг, 9 мкг или 10 мкг олигомерного реагента в виде частиц. В конкретных вариантах осуществления один или более агентов инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с олигомерными реагентами в виде частиц в количестве, равном или приблизительно равном 1,0 мкг агентов на 2 мкг, 3 мкг, 4 мкг или 5 мкг олигомерного 15 реагента в виде частиц.

В некоторых вариантах осуществления один или более агентов, например, агентов, содержащих партнер по связыванию, такой как партнер С по связыванию, присоединяют, соединяют и/или связывают с олигомерным реагентом в виде частиц путем инкубации, обработки и/или введения в контакт олигомерных реагентов в виде 20 частиц с одним или более агентами. В некоторых вариантах осуществления один или более агентов инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с олигомерными реагентами в виде частиц в количестве, равном или приблизительно равном 1,0 мкг агентов на 2 мкг, 3 мкг, 4 мкг или 5 мкг олигомерного реагента в виде частиц в течение от 1 минуты до 1 часа при температуре между 4°C и 39°C, между 10°C и 25°C или между 25 20°C и 30°C. В конкретных вариантах осуществления один или более агентов инкубируют, обрабатывают и/или вводят в контакт с олигомерными реагентами в виде частиц в количестве, равном или приблизительно равном 1,0 мкг агентов на 3 мкг олигомерного реагента в виде частиц в течение от 5 минут до 30 минут при температуре между 10°C и 25°C. В некоторых вариантах осуществления один или более агентов 30 представляют собой агенты, описанные в данном документе, например, в разделе II-C-3. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой антитело против CD3 и/или против CD28 или его антиген-связывающий фрагмент, например, антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который содержит партнер по связыванию, например, streptag. В конкретных вариантах осуществления один или более агентов 35 представляют собой Fab против CD3 и/или против CD28, содержащий партнер по связыванию, например, стрептавидин-связывающий пептид, такой как Strep-tagII.

а. Рецептор-связывающие агенты

В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой рецептор-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий 40 агент связывается с молекулой (например, рецептором) на поверхности клетки, причем это связывание между агентом и молекулой способно индуцировать или модулировать сигнал в клетках. В некоторых случаях молекула клеточной поверхности (например, рецептор) представляет собой сигнальную молекулу. В некоторых таких случаях рецептор-связывающий агент способен специфически связываться с сигнальной 45 молекулой, экспрессируемой одной или более клетками. В некоторых случаях рецептор-связывающий агент представляет собой стимулирующий агент, которым может быть любой агент, который способен индуцировать сигнал в клетке (например, Т-клетке) при связывании с молекулой клеточной поверхности, такой как рецептор. В некоторых

вариантах осуществления сигнал может быть иммуностимулирующий, в каком случае рецептор-связывающий агент или стимулирующий агент способен индуцировать или модулировать сигнал, который участвует или который стимулирует иммунный ответ клеткой (например, Т-клеткой), например, увеличивает пролиферацию или размножение иммунных клеток, активацию иммунных клеток, дифференциацию иммунных клеток, секрецию цитокинов, цитотоксическую активность или одну или более другую функциональную активность иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления сигнал может быть ингибирующим, в каком случае рецептор-связывающий агент или стимулирующий агент способен индуцировать или модулировать сигнал в клетке (например, Т-клетке), которая вовлечена или которая ингибирует иммунный ответ, например, ингибирует или уменьшает пролиферацию или размножение иммунных клеток, активацию иммунных клеток, дифференциацию иммунных клеток, секрецию цитокинов, цитотоксическую активность или одну или более другую функциональную активность иммунной клетки.

В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент представляет собой первый рецептор-связывающий агент, например, первый стимулирующий агент. В некоторых аспектах первый рецептор-связывающий агент, например, первый стимулирующий агент, связывается с рецепторной молекулой на поверхности клеток. Таким образом, в некоторых случаях первый рецептор-связывающий агент, например, первый стимулирующий агент, вызывает или модулирует сигнал. В некоторых аспектах индуцирование или модулирование сигнала первым рецептор-связывающим агентом, например, первым стимулирующим агентом, влияет на активацию, стимуляцию и/или размножение (пролиферацию) клеток. Таким образом, в некоторых случаях первый рецептор-связывающий агент, например, первый стимулирующий агент, предоставляет в клетки первичный активационный сигнал, активируя таким образом клетки.

В некоторых вариантах осуществления популяцией клеток может быть популяция лимфоцитов, включая, но без ограничения популяцию В-клеток, популяцию Т-клеток или популяцию естественных клеток-киллеров. Иллюстративными примерами популяций клеток являются В-клетки, несущие CD40 или CD137 (обе популяции клеток можно пролиферировать при связывании только первого агента, который обеспечивает активационный сигнал, например, лиганд 4-1BBa; или молекула антитела α CD40 или молекула антитела α CD137 (см., например, Zhang et al. 2010, J Immunol, 184:787-795)). Другими иллюстративными примерами агентов (либо первого, либо второго), которые можно использовать для размножения В-клеток, являются агенты, которые связываются с IgG, CD19, CD28 или CD14, например, молекулы антител α CD19, α IgG, α CD28 или α CD14. Также предполагается, что первый или второй агенты для размножения В-клеток могут содержать лиганды для толл-подобных рецепторов или интерлейкинов, таких как IL-21 (см., например, Dienz O, et al. 2009. J. Exp. Med. 206:69). Следует заметить, что липополисахарид-зависимая активация В-клеток также включена в настоящее изобретение, так как липополисахарид также можно использовать в качестве первого агента, и в рамках настоящего изобретения его можно снабдить партнером C1 по связыванию.

Другие иллюстративные примеры подходящих популяций клеток включают популяцию Т-клеток, которые размножаются после активации путем связывания первого агента с TCR/CD3 и связывания второго агента с вспомогательной молекулой на Т-клетке, такой как CD28. В данном случае первый агент стимулирует связанный с комплексом TCR/CD3 сигнал в Т-клетках, а второй агент обеспечивает вторичный

стимул путем связывания CD28 в качестве вспомогательной молекулы. Агенты, которые можно использовать для размножения Т-клеток, также могут включать интерлейкины, такие как IL-2, IL-7, IL-15 или IL-21 (см., например, Cornish et al. 2006, Blood. 108(2):600-8, Bazdar и Sieg, 2007, Journal of Virology, 2007, 81(22):12670-12674, Battalia et al, 2013, Immunology, 139(1):109-120). Другими иллюстративными примерами агентов, которые можно использовать для размножения Т-клеток, являются агенты, которые связываются с CD8, CD45 или CD90, например, антитела α CD8, α CD45 или α CD90. Иллюстративные примеры популяции Т-клеток, включая антиген-специфические Т-клетки, Т-хелперы, цитотоксические Т-клетки, Т-клетки памяти (иллюстративным примером Т-клеток памяти являются CD62L⁺CD8⁺ специфические центральные Т-клетки памяти) или регуляторные Т-клетки (иллюстративным примером Treg являются CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺ Treg клетки).

Другой иллюстративный пример подходящей популяции клеток включает естественные клетки-киллеры (NK-клетки), которые можно, например, размножить с помощью агентов, которые связываются с CD16 или CD56, такие как, например, антитела α CD16 или α CD56. Иллюстративным примером такого антитела α CD16 является антитело 3G8 с VH последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 52, и VL последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 53 (см., например, Hoshino et al, Blood. 1991 Dec 15;78(12):3232-40.). Другим агентом, который можно использовать для размножения NK-клеток, может быть IL-15 (см., например, Vitale et al. 2002. Anatomical Record. 266:87-92). Еще один иллюстративный пример подходящей популяции клеток включает моноциты, которые можно, например, размножить с использованием агента, который связывается с CD14, например, молекула антитела α CD14.

В некоторых аспектах рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент, специфически выделяет молекулу, экспрессируемую на поверхности клеток-мишеней, в которых молекула представляет собой TCR или химерный антигенный рецептор. Например, молекулу, экспрессируемую на поверхности клетки-мишени, выбирают из Т-клеточного или В-клеточного антигенного рецепторного комплекса, CD3 цепи, CD3 zeta, антигенсвязывающей части Т-клеточного рецептора или В-клеточного рецептора или химерного антигенного рецептора. В некоторых случаях рецептор-связывающий агент выделяет комплексы пептид:МНС I класса. В некоторых аспектах рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент, специфически связывается с частью антитела рекомбинантного рецептора, например, CAR. В некоторых случаях часть антитела рекомбинантного рецептора включает по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина, например, шарнирную область, например, шарнирную область IgG4, и/или CH1/CL и/или Fc-область. В некоторых вариантах осуществления константной областью или частью является человеческий IgG, такой как IgG4 или IgG1. В некоторых случаях реагент загружают α IgG, который распознает IgG4 спейсер.

В некоторых вариантах осуществления первый рецептор-связывающий агент, например, первый стимулирующий агент, может стимулировать связанный с комплексом TCR/CD3 сигнал в клетках, например, Т-клетках. В некоторых аспектах первым рецептор-связывающим агентом, например, первым стимулирующим агентом, может быть связывающий агент, который специфически связывает CD3. В некоторых случаях первый рецептор-связывающий агент, например, первый стимулирующий агент, который специфически связывает CD3, можно выбрать из группы, состоящей из антитела против CD3, фрагмента двухвалентного антитела против CD3, фрагмента моновалентного антитела против CD3 и белковой CD3 связывающей молекулой с антителоподобными

связывающими свойствами. Фрагментом двухвалентного антитела может быть (Fab)₂'-фрагмент или двухвалентный одноцепочечный Fv-фрагмент, тогда как фрагмент моновалентного антитела можно выбрать из группы, состоящей из Fab-фрагмента, Fv-фрагмента, нанотела (sdАнтитела) и одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv). В некоторых случаях белковой CD3 связывающей молекулой с антителоподобными связывающими свойствами может быть аптамер, мутеин на основе полипептида семейства липокалинов, глутело, белок на основе анкиринового каркаса, белок на основе кристаллического каркаса, аднектин, дарпин или авимер.

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент против CD3 можно получить из связывающего CD3 моноклонального антитела, продуцируемого линией гибридомных клеток ОКТ3 (ATCC® CRL-8001™; см. также патент США № 4361549). Вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи антитела ОКТ3 против CD3 описаны в Arakawa et al J. Biochem. 120, 657-662 (1996) и содержат аминокислотные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 31 и 32, соответственно.

В некоторых аспектах рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент, представляет собой второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент. В некоторых случаях второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент, связывается с молекулой на поверхности клеток, такой как молекула клеточной поверхности, например, рецепторная молекула. В некоторых вариантах осуществления второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент, способен усиливать, ослаблять или модифицировать сигнал, доставляемый посредством первой молекулы. В некоторых вариантах осуществления второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент, вызывает или модулирует сигнал, например, второй или дополнительный сигнал. В некоторых аспектах второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент, может усиливать или активировать сигнал, индуцированный первым рецептор-связывающим агентом, например, первым стимулирующим агентом. В некоторых вариантах осуществления второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент, связывается с вспомогательной молекулой и/или может стимулировать или индуцировать дополнительный или вторичный сигнал в клетке. В некоторых аспектах второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент, связывается с костимулирующей молекулой и/или обеспечивает костимулирующий сигнал.

В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент, которым может быть второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент, связывается, например, специфически связывается, со второй молекулой, которой может быть костимулирующая молекула, вспомогательная молекула, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор, молекула иммунной контрольной точки, или член семейства TNF или семейства рецепторов TNF.

В некоторых вариантах осуществления молекулой на клетке, например, Т-клетке, может быть CD28, а рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент) специфически связывает CD28. В некоторых аспектах рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент), который специфически связывает CD28, можно выбрать из группы, состоящей из антитела против CD28, фрагмента двухвалентного антитела против CD28, фрагмента моновалентного антитела против CD28 и белковой связывающей CD28 молекулы с

антителоподобными связывающими свойствами. Фрагментом двухвалентного антитела может быть (Fab)₂'-фрагмент или двухвалентный одноцепочечный Fv-фрагмент, тогда как фрагмент моновалентного антитела можно выбрать из группы, состоящей из Fab-фрагмента, Fv-фрагмента и одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv). белковой

5 связывающей молекулой CD28 с антителоподобными связывающими свойствами может быть аптамер, мутеин на основе полипептида семейства липокалинов, глутело, белок на основе анкиринового каркаса, белок на основе кристаллического каркаса, аднектин и авимер. В некоторых случаях рецептор-связывающий агент, например, первый, второй и/или дополнительный рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент,

10 который специфически связывает рецептор, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, например, Fab-фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающим агентом, например, стимулирующим агентом, может быть лиганд, который связывается, например, специфически связывается, с рецептором, например, молекулой клеточной поверхности,

15 которая стимулирует или активирует сигнал 2 активации Т-клеток, например, костимулирующий сигнал, при связывании агента. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, первый, второй и/или дополнительный рецептор-связывающий агент, представляет собой эндогенный лиганд, когнатный лиганд, синтетический лиганд и/или его часть, вариант или

20 модифицированную форму. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающим агентом, например, стимулирующим агентом, может быть внеклеточный домен эндогенного лиганда и/или когнатного лиганда или его часть.

В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент способен связываться с любым одним или более из CD28, CD5,

25 CD4, CD8, МНСI, МНСII, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BBL, CD30L и LIGHT. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающим агентом, например, стимулирующим агентом, может быть антитело, двухвалентное антитело (например, F(ab')₂-фрагмент или двухвалентный одноцепочечный Fv-фрагмент), моновалентное антитело (например, Fab-фрагмент, Fv-фрагмент или одноцепочечный

30 Fv-фрагмент (scFv)) или лиганд для любого одного или более из CD28, CD5, CD4, CD8, МНСI, МНСII, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BBL, CD30L и LIGHT, причем такой агент способен индуцировать или моделировать сигнал в клетках при связывании рецептор-связывающего агента, например, стимулирующего агента с молекулой.

В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающим агентом, например, стимулирующим агентом, может быть лиганд для любого одного или более из CD28, CD5, CD4, CD8, МНСI, МНСII, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BBL, CD30L и LIGHT, причем такой агент способен индуцировать или моделировать сигнал в клетках при связывании рецептор-связывающего агента, например, стимулирующего агента с

40 молекулой. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающим агентом, например, стимулирующим агентом, может быть внеклеточный домен эндогенного лиганда и/или когнатного лиганда или его часть. Например, в некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент представляет собой или содержит внеклеточный домен или его часть, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), ICOS-L, PD-L1, OX40L, CD27, 4-1BB (CD137) и/или CD30.

45

В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент, способен специфически связываться с молекулой на поверхности клеток-мишеней, не являющихся CD28, CD3, CD137 или CD40. В некоторых случаях

связывание рецептор-связывающего агента, например, стимулирующего агента, с молекулой на поверхности клеток-мишеней, не являющихся CD28, CD3, CD137 или CD40, вызывает или модулирует сигнал в клетках-мишенях и/или изменяет функцию клеток-мишеней, создавая таким образом культивируемые клетки-мишени.

5 В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент способен связываться с любым одним или более из членов семейства TNF или семейства рецепторов TNF, например, членом суперсемейства рецепторов TNF, и/или рецептором или корецептором Wnt, например, семейства рецепторов Frizzled (Fz).

10 В некоторых вариантах осуществления молекула на клетке представляет собой элемент суперсемейства рецепторов TNF, таких как рецептор 1 фактора некроза опухоли (CD120a), рецептор 2 фактора некроза опухоли (CD120b), рецептор лимфотоксина бета (CD18), OX40 (CD134), CD40 (Bp50), Fas-рецептор (Apo-1, CD95), рецептор-ловушка 3 (TR6, M68), CD27 (S152, Tr55), CD30 (Ki-1), 4-1BB (CD137), рецептор смерти 4 (TRAILR1, 15 Apo-2, CD261), рецептор смерти 5 (TRAILR2, CD262), рецептор-ловушка 1 (TRAILR3, LIT, TRID, CD263), рецептор-ловушка 2 (TRAILR4, TRUNDD, CD264), RANK (CD265), остеопротегерин (OCIF, TR1), рецептор TWEAK (Fn14, CD266), TACI (IGAD2, CD267), рецептор BAFF (CD268), входной медиатор герпесвируса (ATAR, TR2, CD270), рецептор фактора роста нервов (p75NTR, CD271), В-клеточный антиген созревания (TNFRSF13A, 20 CD269), глюкокортикоид-индуцированный TNFR (AITR, CD357), TROY (TAJ, TRADE), рецептор смерти 6 (CD358), рецептор смерти 3 (Apo-3, TRAMP, LARD, WS-1) или рецептор эктодисплазина A2 (XEDAR).

В некоторых случаях рецептор-связывающим агентом, который специфически связывает белок суперсемейства рецепторов TNF, является антитело или его 25 антигенсвязывающий фрагмент, например, Fab-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающим агентом, который специфически связывает белок суперсемейства рецепторов TNF, может быть лиганд, который связывается, например, специфически связывается, с рецептором и/или внеклеточным доменом или его частью. В некоторых вариантах осуществления лиганд составляет или содержит 30 TNF α , лимфотоксин бета (TNF-C), OX40L, CD154, FasL, FasL, LIGHT, TL1A, CD70, Siva, CD153, лиганд 4-1BB, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, CAMLG, BAFF, LIGHT, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, BAFF, лиганд GITR, TL1A или EDA-A2, или внеклеточный домен или его часть любого из трансмембранных белков.

В некоторых вариантах осуществления молекула на клетке представляет собой 35 рецептор или корецептор Wnt, рецепторы, наподобие рецептора семейства Frizzled (Fz), белок, связанный с рецептором липопротеина (LRP)-5/6, рецепторную тирозинкиназу (RTK) и связанный с рецепторами орфановый рецептор 2 (ROR2). В некоторых вариантах осуществления молекула на клетке представляет собой, например, Frizzled-1 (FZD1), Frizzled-2 (FZD2), Frizzled-3 (FZD3), Frizzled-4 (FZD4), Frizzled-5 (FZD5), Frizzled-6 (FZD6), 40 Frizzled-7 (FZD7), Frizzled-8 (FZD8), Frizzled-9 (FZD9) или Frizzled-10 (FZD10).

В некоторых случаях рецептор-связывающий агент, который специфически связывает рецептор или корецептор Wnt, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий 45 фрагмент, например, Fab-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающим агентом, который специфически связывает рецептор или корецептор Wnt, может быть лиганд, который связывается, например, специфически связывается, с рецептором. В некоторых вариантах осуществления лиганд составляет или содержит, например, WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11 или

WNT16.

В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент способен связываться с любым одним или более из CD28, CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 и HVEM. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающим агентом, например, стимулирующим агентом, может быть антитело, двухвалентное антитело (например, F(ab')₂-фрагмент или двухвалентный одноцепочечный Fv-фрагмент), моновалентное антитело (например, Fab-фрагмент, Fv-фрагмент или одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv)) или лиганд для любого одного или более из CD28, CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 и HVEM, причем такой агент способен индуцировать или моделировать сигнал в клетках при связывании рецептор-связывающего агента, например, стимулирующего агента с молекулой.

В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающим агентом, например, стимулирующим агентом, может быть лиганд для любого одного или более из CD28, 4-1BB (CD137), CD40, CD40L, линкера для активации Т-клеток (LAT), CD27, OX40 (CD134) и входного медиатора герпесвируса (HVEM), причем такой агент способен индуцировать или моделировать сигнал в клетках при связывании рецептор-связывающего агента, например, стимулирующего агента с молекулой. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающим агентом, например, стимулирующим агентом, может быть внеклеточный домен эндогенного лиганда и/или когнатного лиганда или его часть. Например, в некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент представляет собой или содержит внеклеточный домен или его часть, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), 4-1BBL, CD40, CD40L, CD27L (CD70) и/или OX40L.

В некоторых вариантах осуществления молекулой на клетке, например, Т-клетке, может быть CD28, а рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент) специфически связывает CD28.

В некоторых вариантах осуществления молекулой на клетке, например, Т-клетке, может быть CD28, а рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент) специфически связывает CD28. В некоторых аспектах рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент), который специфически связывает CD28, можно выбрать из группы, состоящей из антитела против CD28, фрагмента двухвалентного антитела против CD28, фрагмента моновалентного антитела против CD28 и белковой связывающей CD28 молекулы с антителоподобными связывающими свойствами. Фрагментом двухвалентного антитела может быть F(ab')₂-фрагмент или двухвалентный одноцепочечный Fv-фрагмент, тогда как фрагмент моновалентного антитела можно выбрать из группы, состоящей из Fab-фрагмента, Fv-фрагмента, нанотела и одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv).

В некоторых вариантах осуществления Fab-фрагмент против CD28 можно получить из антитела CD28.3 (помещенного в виде синтетической одноцепочечной Fv-конструкции под учетным номером GenBank AF451974,1; см. также Vanhove et al, BLOOD, 15 July 2003, Vol. 102, № 2, pages 564-570), тяжелая и легкая цепь которой содержат SEQ ID NO: 33 и 34, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления молекулой на клетке, например, Т-клетке, может быть CD90, а рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть второй рецептор-связывающий агент, например,

второй стимулирующий агент) специфически связывает CD90. В некоторых аспектах рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент), который специфически связывает CD90, можно выбрать из группы, состоящей из антитела против CD90, фрагмента двухвалентного антитела против CD90, фрагмента моновалентного антитела против CD90 и белковой связывающей CD90 молекулы с антителоподобными связывающими свойствами. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент можно получить из любого, известного в данной области. См., например, антитело против CD90 G7 (Biolegend, cat. № 105201).

В некоторых вариантах осуществления молекулой на клетке, например, Т-клетке, может быть CD95, а рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент) специфически связывает CD95. В некоторых аспектах рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент), который специфически связывает CD95, можно выбрать из группы, состоящей из антитела против CD95, фрагмента двухвалентного антитела против CD95, фрагмента моновалентного антитела против CD95 и белковой связывающей CD95 молекулы с антителоподобными связывающими свойствами. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент можно получить из любого, известного в данной области. Например, в некоторых аспектах антитело против CD90 может быть моноклональным мышинным против CD95 CH11 человека (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) или может быть mAb 7C11 против CD95 или против APO-1, например, как описано в Paulsen et al. *Cell Death & Differentiation* 18.4 (2011): 619-631.

В некоторых вариантах осуществления молекулой на клетке, например, Т-клетке или В-клетке, может быть CD137, а рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент) специфически связывает CD137. В некоторых аспектах рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент), который специфически связывает CD137, можно выбрать из группы, состоящей из антитела против CD137, фрагмента двухвалентного антитела против CD137, фрагмента моновалентного антитела против CD137 и белковой связывающей CD137 молекулы с антителоподобными связывающими свойствами. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент можно получить из любого, известного в данной области. Например, антитело против CD137 могут быть LOB12, IgG2a или LOB12.3, IgG1, как описано в Taraban et al. *Eur J Immunol.* 2002 Dec;32(12):3617-27. См. также, например, US6569997, US6303121, Mittler et al. *Immunol Res.* 2004;29(1-3):197-208.

В некоторых вариантах осуществления молекулой на клетке, например, В-клетке, может быть CD40, а рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент) специфически связывает CD40. В некоторых аспектах рецептор-связывающий агент (которым может быть второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент), который специфически связывает CD40, можно выбрать из группы, состоящей из антитела против CD40, фрагмента двухвалентного антитела против CD40, фрагмента моновалентного антитела против CD40 и белковой связывающей CD40 молекулы с антителоподобными связывающими свойствами. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент можно получить из любого,

известного в данной области. Например, антителом против CD40 может быть химерное моноклональное антитело против CD40 человека Teneliximab и против CD40 человека (Affymetrix cat. № 14-0409-80) или любое описанное, например, в US 2002/0142358, US 2007/0077242, WO 2001/083755, Zhang et al. 2010, J Immunol, 184:787-795.

5 В некоторых вариантах осуществления молекулой на клетке, например, Т-клетке, может быть CD40L (CD154), а рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент) специфически связывает CD40L. В некоторых аспектах рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым
10 может быть второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент), который специфически связывает CD40L, можно выбрать из группы, состоящей из антитела против CD40L, фрагмента двухвалентного антитела против CD40L, фрагмента моновалентного антитела против CD40L и белковой связывающей CD40L молекулы с антителоподобными связывающими свойствами. Антитело или
15 антигенсвязывающий фрагмент можно получить из любого, известного в данной области. Например, в некоторых аспектах антитело против CD40L может быть Hu5C8, как описано в Blair et al. JEM vol. 191 № 4 651-660. См. также, например, WO1999061065, US20010026932, US7547438, WO2001056603. В некоторых вариантах осуществления молекулой на клетке, например, Т-клетке, может быть индуцируемый Т-клеточный
20 костимулятор (ICOS), линкер для активации Т-клеток (LAT), CD27, OX40 (CD134), входной медиатор герпесвируса (HVEM), CD90 и/или CD95, а рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент) специфически связывает ICOS, LAT, CD27, CD134, HVEM, CD90 и/или CD95, соответственно. В
25 некоторых аспектах рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть второй рецептор-связывающий агент, например, второй стимулирующий агент), который специфически связывает ICOS, LAT, CD27, CD134, HVEM, CD90 и/или CD95, можно выбрать из группы, состоящей из антитела, его фрагмента двухвалентного антитела, его фрагмента моновалентного антитела и
30 белковой связывающей молекулы с антителоподобными связывающими свойствами. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент можно получить из любого, известного в данной области.

В некоторых вариантах осуществления молекула на клетке, например, Т-клетке, на которой рецептор-связывающий агент, которым может быть второй или
35 дополнительный рецептор-связывающий агент, связывается с молекулой клеточной поверхности, которая стимулирует или активирует цитокиновый сигнал, хемокиновый сигнал, сигнал адгезии клеток, сигнал активации Т-клеток или дополнительные сигналы, например, сигналы окружающей среды, при связывании агента. В некоторых вариантах осуществления молекула на клетке, например, Т-клетке, с которой специфически
40 связывается рецептор-связывающий агент, которым может быть второй или дополнительный рецептор-связывающий агент, представляет собой цитокиновый рецептор или хемокиновый рецептор. В некоторых случаях рецептор-связывающий агент, например, дополнительный рецептор-связывающий агент, представляет собой или содержит молекулу адгезии, представляет собой фактор, который вызывает
45 выработку цитокина, выработку хемокина, экспрессию молекулы адгезии и/или вовлечен в стимулирование и/или модулирование вспомогательного сигнала и/или дополнительного сигнала, например, сигнала окружающей среды.

В любом из вариантов осуществления, представленных в данном документе, рецептор-

связывающим агентом, например, первым, вторым и/или дополнительным рецептор-связывающим агентом, например, стимулирующим агентом, может быть связывающий агент, который специфически связывает рецептор, например, рецептор, экспрессируемый на поверхности клетки.

5 В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, например, антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который связывается с молекулой клеточной поверхности, которая стимулирует или активирует цитокиновый сигнал, хемокиновый сигнал, сигнал адгезии клеток, сигнал активации Т-клеток или дополнительные сигналы, например, сигналы окружающей среды, при связывании агента. В некоторых случаях рецептор-связывающий агент, например, первый, второй и/или дополнительный рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент, который специфически связывает рецептор, можно выбрать из группы, состоящей из антитела против рецептора, фрагмента двухвалентного антитела против рецептора, фрагмента моновалентного антитела против рецептора и белковой рецептор-связывающей молекулы с антителоподобными связывающими свойствами. Фрагментом двухвалентного антитела может быть $F(ab')_2$ -фрагмент или двухвалентный одноцепочечный Fv-фрагмент, тогда как фрагмент моновалентного антитела можно выбрать из группы, состоящей из Fab-фрагмента, Fv-фрагмента и одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv). В некоторых случаях белковой рецептор-связывающей молекулой с антителоподобными связывающими свойствами может быть аптамер, мутеин на основе полипептида семейства липокалинов, глутело, белок на основе анкиринового каркаса, белок на основе кристаллического каркаса, аднектин, дарпин или авимер. В некоторых случаях рецептор-связывающий агент, например, первый, второй и/или дополнительный рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент, который специфически связывает рецептор, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, например, Fab-фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающим агентом, например, стимулирующим агентом, может быть лиганд, который связывается, например, специфически связывается, с рецептором, например, молекулой клеточной поверхности, которая стимулирует или активирует цитокиновый сигнал, хемокиновый сигнал, сигнал адгезии клеток, сигнал активации Т-клеток или дополнительные сигналы, например, сигналы окружающей среды, при связывании агента. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, первый, второй и/или дополнительный рецептор-связывающий агент, представляет собой эндогенный лиганд, когнатный лиганд, синтетический лиганд и/или его часть, вариант или модифицированную форму. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающим агентом, например, стимулирующим агентом, может быть внеклеточный домен эндогенного лиганда и/или когнатного лиганда или его часть.

40 В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, второй или дополнительный рецептор-связывающий агент, представляет собой или содержит лиганд, который специфически связывается с цитокиновым рецептором. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, второй или дополнительный рецептор-связывающий агент, представляет собой или содержит лиганд цитокинового рецептора, например, цитокина или его части. Иллюстративные цитокиновые рецепторы включают, но без ограничения, IL-2R, IL-7R, IL-21R, CD132 (общая гамма цепь рецептора IL), IL-1R, IL-15R, IFN-гаммаR, TNF-альфаR, IL-4R, IL-10R, IFNR I типа, IL-12R, IL-17R, TNFR1 и TNFR2. Иллюстративные лиганды, например,

цитокины, включают, но без ограничения, IL-2, IL-7, IL-21, IL-1, IL-15, IFN-гамма, TNF-альфа, IL-4, IL-10, интерфероны I типа (например, IFN α и/или IFN β), IL-12, IL-17, IL-9 и TNF, и их биологически активные фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, второй или дополнительный рецептор-связывающий агент, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с цитокиновым рецептором. В некоторых случаях рецептор-связывающий агент, например, второй или дополнительный рецептор-связывающий агент, который специфически связывает цитокиновый рецептор можно выбрать из группы, состоящей из антитела против цитокинового рецептора, фрагмента двухвалентного антитела против цитокинового рецептора, фрагмента моновалентного антитела против цитокинового рецептора и белковой связывающей цитокиновый рецептор молекулы с антителоподобными связывающими свойствами. Фрагментом двухвалентного антитела может быть F(ab')₂-фрагмент или двухвалентный одноцепочечный Fv-фрагмент, тогда как фрагмент моновалентного антитела можно выбрать из группы, состоящей из Fab-фрагмента, Fv-фрагмента и одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv).

В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, дополнительный рецептор-связывающий агент, представляет собой или содержит лиганд, который специфически связывается с хемокиновым рецептором. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, второй или дополнительный рецептор-связывающий агент, представляет собой или содержит лиганд хемокинового рецептора, например, хемокина или его части. Иллюстративные хемокиновые рецепторы включают, но без ограничения, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR9, CXCR1, CXCR3 и CXCR4. Иллюстративные лиганды, например, хемокины, включают, но без ограничения, CXCL9, CXCL10, CCL19, CCL21 и CCL25 или их биологически активные фрагменты.

В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, второй или дополнительный рецептор-связывающий агент, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с хемокиновым рецептором. В некоторых случаях рецептор-связывающий агент, например, второй или дополнительный рецептор-связывающий агент, который специфически связывает хемокиновый рецептор, можно выбрать из группы, состоящей из антитела против хемокинового рецептора, фрагмента двухвалентного антитела против хемокинового рецептора, фрагмента моновалентного антитела против хемокинового рецептора и белковой связывающей хемокиновый рецептор молекулы с антителоподобными связывающими свойствами. Фрагментом двухвалентного антитела может быть F(ab')₂-фрагмент или двухвалентный одноцепочечный Fv-фрагмент, тогда как фрагмент моновалентного антитела можно выбрать из группы, состоящей из Fab-фрагмента, Fv-фрагмента и одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv).

В некоторых случаях рецептор-связывающий агент, который специфически связывает молекулу адгезии или факторы, которые индуцируют цитокин, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, например, Fab-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающим агентом, который специфически связывает молекулу адгезии или факторы, которые индуцируют цитокин, может быть лиганд, который связывается, например, специфически связывается, с рецептором. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент представляет собой эндогенный лиганд, когнатный лиганд, синтетический лиганд и/или его часть, вариант или модифицированную форму, молекулы адгезии и/или рецептора. В некоторых

вариантах осуществления рецептор-связывающим агентом, например, стимулирующим агентом, может быть внеклеточный домен эндогенного лиганда и/или когнатного лиганда или его часть, который сам представляет собой поверхность клетки или трансмембранный белок.

5 В некоторых случаях молекула на клетке, например, молекула адгезии, представляет собой CD44, CD31, CD18/CD11a (LFA-1; полноразмерную последовательность альфа и бета цепи, приведенную в SEQ ID №№: 36 и 37, соответственно), CD29, CD54 (ICAM-1), CD62L (L-селектин; полноразмерную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38), CD29/CD49d (VLA-4; полноразмерную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:40), CD106 (VCAM-1; полноразмерную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:39), или представляет собой их биологически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается, например, специфически связывается с молекулой адгезии, например, CD44, CD31, CD18/CD11a (LFA-1), CD29, 10 CD54 (ICAM-1), CD62L (L-селектин), CD29/CD49d (VLA-4), CD106 (VCAM-1), или представляет собой их биологически активный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент представляет собой лиганд или его часть, которая связывается, например, специфически связывается с молекулой адгезии, например, CD44, CD31, CD18/CD11a (LFA-1), CD29, CD54 (ICAM-1), CD62L (L-селектин), 20 CD29/CD49d (VLA-4), CD106 (VCAM-1). Такие рецептор-связывающие агенты включают агент, который представляет собой или содержит внеклеточный домен (ECD) эндогенного лиганда и/или когнатного лиганда молекулы адгезии или его часть. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент представляет собой внеклеточный домен молекулы адгезии или его часть, и может связывать одну или 25 более молекул адгезии на поверхности клетки. Примеры таких рецептор-связывающих агентов включают внеклеточный домен LFA-1 α (ECD, приведенный в SEQ ID NO: 54); LFA-1 β (ECD, приведенный в SEQ ID NO: 55); L-селектин (ECD, приведенный в SEQ ID NO: 57); VCAM-1 (ECD, приведенный в SEQ ID NO: 56); и VLA-4 (ECD, приведенный в SEQ ID NO: 58) или любую его часть.

30 В некоторых вариантах осуществления фактор, который вызывает выработку цитокина, выработку хемокина и/или экспрессию молекулы адгезии, представляет собой или содержит ядерный фактор, такой как орфановый рецептор гамма, связанный с рецепторами ретиноевой кислоты (RORгамма) или RORальфа.

В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, 35 второй или дополнительный рецептор-связывающий агент, представляет собой или содержит лиганд, который специфически связывается с цитокиновым рецептором.

В некоторых вариантах осуществления молекулой на клетке, например, Т-клетке, может быть IL-2R, IL-7R (CD127), IL-21R (CD360), общая гамма цепь рецептора IL (γ ; или CD132), IL-1R (CD121), такой как IL-1R1 или IL-1R2, IL-15R (CD215), рецептор интерферона гамма (IFN γ R; CD119), рецептор фактора некроза опухоли альфа (TNF α R), 40 включая TNFR1 (CD120a) и TNFR2 (CD120b), IL-4R, IL-10R, рецептор интерферона I типа, например, рецептор IFN α (IFNAR), включая IFNAR1 и IFNAR2, IL-17R (CD217) и/или IL-12R, а рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент, специфически связывается с молекулой. В некоторых аспектах рецептор-связывающий 45 агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть дополнительный рецептор-связывающий агент, например, дополнительный стимулирующий агент), который специфически связывает молекулу на клетке, можно выбрать из группы, состоящей из антитела, фрагмента двухвалентного антитела,

фрагмента моновалентного антитела и белковой связывающей молекулы с антителоподобными связывающими свойствами.

В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть дополнительный рецептор-связывающий агент, например, дополнительный стимулирующий агент), может
5 содержать лиганд стимулирующего рецептора или другого рецептора, способный индуцировать сигнал в клетке, такой как лиганд IL-2, лиганд IL-7, лиганд IL-21, лиганд IL-1, лиганд IL-15, лиганд IL-9, лиганд IFN γ , лиганд TNF α , лиганд IL-4, лиганд IL-10, лиганд IL-12, лиганд IL-17 или его биологически активную часть или вариант. В
10 некоторых вариантах осуществления биологически активная часть или вариант сохраняет активность связывания с рецептором и/или функциональную активность для модулирования одного или более сигналов рецептору.

В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть дополнительный рецептор-связывающий агент, например, дополнительный стимулирующий агент), может
15 содержать лиганд стимулирующего рецептора или другого рецептора, способный индуцировать сигнал в клетке, например, интерферон I типа, например, IFN α , IFN β , IFN κ , IFN δ , IFN ϵ , IFN τ , IFN ω и IFN ζ (также известный как лимитин) или его биологически активную часть.

В некоторых вариантах осуществления молекулой на клетке, например, Т-клетке, может быть CXCR3, CCR7, CXCR1 или CXCR4, а рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть дополнительный рецептор-связывающий агент, например, дополнительный стимулирующий агент),
20 специфически связывается CXCR3, CCR7, CXCR1 или CXCR4. В некоторых аспектах рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть дополнительный рецептор-связывающий агент, например, дополнительный стимулирующий агент), который специфически связывается CXCR3, CCR7, CXCR1 или CXCR4, можно выбрать из группы, состоящей из антитела, фрагмента двухвалентного антитела, фрагмента моновалентного антитела и белковой связывающей молекулы с
25 антителоподобными связывающими свойствами.

В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть дополнительный рецептор-связывающий агент, например, дополнительный стимулирующий агент), может
30 содержать лиганд стимулирующего рецептора или другого рецептора, способный индуцировать сигнал в клетке, такой как лиганд CXCL9, лиганд CXCL10, лиганд CCL19, лиганд CCL21, лиганд CCL25 или его биологически активную часть, которая сохраняет активность связывания с рецептором и/или функциональную активность для модулирования одного или более сигналов рецептору.

В некоторых случаях рецептор-связывающий агент, например, дополнительный
40 рецептор-связывающий агент, представляет собой или содержит молекулу адгезии или представляет собой фактор, который вызывает выработку цитокина, выработку хемокина, экспрессию молекулы адгезии и/или вовлечен в стимулирование и/или модулирование вспомогательного сигнала и/или дополнительного сигнала. В некоторых вариантах осуществления молекулой на клетке, например, Т-клетке, может быть CD62L, а рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть дополнительный рецептор-связывающий агент, например, дополнительный стимулирующий агент), специфически связывает CD62L. В некоторых вариантах осуществления молекулой на клетке, например, Т-клетке, может быть ROR γ t, а рецептор-

связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть дополнительный рецептор-связывающий агент, например, дополнительный стимулирующий агент), специфически связывает ROR γ t. В некоторых вариантах осуществления молекулой на клетке, например, T-клетке, может быть ROR α , а рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент (например, которым может быть дополнительный рецептор-связывающий агент, например, дополнительный стимулирующий агент), специфически связывает ROR α .

В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент способен связываться с любым одним или более из CD28, CD5, CD4, CD8, MHC I, MHC II, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BBL, CD30L и LIGHT, и рецептор-связывающим агентом, например, стимулирующим агентом, может быть антитело, двухвалентное антитело (например (Fab)₂'-фрагмент или двухвалентный одноцепочечный Fv-фрагмент), моновалентное антитело (например, Fab-фрагмент, Fv-фрагмент или одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv)) или лиганд для любого одного или более из CD28, CD5, CD4, CD8, MHC I, MHC II, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BBL, CD30L и LIGHT, причем такой агент способен индуцировать или моделировать сигнал в клетках при связывании рецептор-связывающего агента, например, стимулирующего агента с молекулой.

В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент, способен специфически связываться с молекулой на поверхности клеток-мишеней, не являющихся CD28, CD3, CD137 или CD40. В некоторых случаях связывание рецептор-связывающего агента, например, стимулирующего агента, с молекулой на поверхности клеток-мишеней, не являющихся CD28, CD3, CD137 или CD40, вызывает или модулирует сигнал в клетках-мишенях и/или изменяет функцию клеток-мишеней, создавая таким образом культивируемые клетки-мишени.

В любом из приведенных выше примеров фрагментом двухвалентного антитела может быть (Fab)₂'-фрагмент или двухвалентный одноцепочечный Fv-фрагмент, тогда как фрагмент моновалентного антитела можно выбрать из группы, состоящей из Fab-фрагмента, Fv-фрагмента и одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv). В любом из приведенных выше примеров белковой связывающей молекулой с антителоподобными связывающими свойствами может быть аптамер, мутеин на основе полипептида семейства липокалинов, глутело, белок на основе анкиринового каркаса, белок на основе кристаллического каркаса, аднектин, нанотело, дарпин и авимер.

b. Селективные агенты

В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой селективный агент. В некоторых вариантах осуществления селективный агент связывается с молекулой на поверхности клетки, такой как молекула клеточной поверхности. В некоторых случаях молекула клеточной поверхности представляет собой селективный маркер. В некоторых таких случаях селективный агент способен специфически связываться с селективным маркером, экспрессируемым одной или более клетками. В некоторых вариантах осуществления селективный агент или агенты, которые обратимо связаны с реагентом, можно использовать для облегчения отбора или выделения клеток.

В любом из вариантов осуществления, представленных в данном документе, рецептор-связывающим агентом, например, первым, вторым и/или дополнительным рецептор-связывающим агентом, например, стимулирующим агентом, может быть связывающий агент, который специфически связывает рецептор, например, рецептор, экспрессируемый на поверхности клетки. В некоторых случаях рецептор-связывающий агент, например, первый, второй и/или дополнительный рецептор-связывающий агент, например,

стимулирующий агент, который специфически связывает рецептор можно выбрать из группы, состоящей из антитела против рецептора, фрагмента двухвалентного антитела против рецептора, фрагмента моновалентного антитела против рецептора и белковой рецептор-связывающей молекулы с антителоподобными связывающими свойствами.

5 Фрагментом двухвалентного антитела может быть F(ab')₂-фрагмент или двухвалентный одноцепочечный Fv-фрагмент, тогда как фрагмент моновалентного антитела можно выбрать из группы, состоящей из Fab-фрагмента, Fv-фрагмента и одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv). В некоторых случаях белковой рецептор-связывающей молекулой с антителоподобными связывающими свойствами может быть аптамер, мутеин на основе
10 полипептида семейства липокалинов, глутело, белок на основе анкиринового каркаса, белок на основе кристаллического каркаса, аднектин, нанотело, дарпин или авимер. В некоторых случаях рецептор-связывающий агент, например, первый, второй и/или дополнительный рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент, который специфически связывает рецептор, представляет собой антитело или его
15 антигенсвязывающий фрагмент, например, Fab-фрагмент.

В некоторых аспектах молекулой клеточной поверхности, например, селективным маркером, может быть антиген, определяющий нужную популяцию или субпопуляцию клеток, например, популяцию или субпопуляцию клеток крови, например, лимфоцитов (например, Т-клеток, Т-хелперов, например, CD4+ Т-хелперов, В-клеток или
20 естественных клеток-киллеров), моноцитов или стволовых клеток, например, CD34-положительных периферических стволовых клеток или экспрессирующих Nanog или Oct-4 стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления селективным маркером может быть маркер, экспрессируемый на поверхности Т-клеток или подмножества Т-клеток, таких как CD25, CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO. Примеры Т-клеток включают такие клетки, как CMV-специфические CD8+ Т-лимфоциты, цитотоксические Т-клетки, Т-клетки памяти и регуляторные Т-клетки (Treg). Иллюстративный пример Treg включает CD4 CD25 CD45RA Treg клетки, а иллюстративный пример Т-клеток памяти включает CD62L CD8+ специфические центральные Т-клетки памяти. Молекулой клеточной поверхности, например,
25 селективным маркером, также может быть маркер для опухолевой клетки.

В некоторых вариантах осуществления селективным маркером может быть CD4, а селективный агент специфически связывает CD4. В некоторых аспектах селективный агент, который специфически связывает CD4, можно выбрать из группы, состоящей из антитела против CD4, фрагмента двухвалентного антитела против CD4, фрагмента
35 моновалентного антитела против CD4 и белковой связывающей CD4 молекулы с антителоподобными связывающими свойствами (например, антикалина или нанотела). В некоторых вариантах осуществления антитело против CD4, например, фрагмент двухвалентного антитела или фрагмент моновалентного антитела (например, CD4 Fab-фрагмент), можно получить из антитела 13B8.2 или функционально активного мутанта
40 13B8.2, который сохраняет специфическое связывание для CD4. Например, иллюстративные мутанты антитела 13B8.2 или m13B8.2 описаны в патенте США №№ 7482000, заявке на патент США № US2014/0295458 или международной заявке на выдачу патента № WO2013/124474; и Bes, C, et al. J Biol Chem 278, 14265-14273 (2003). Мутантный Fab-фрагмент, называемый «m13B8.2», несет вариабельный домен связывающего CD4 мышинового антитела 13B8.2 и константный домен, содержащий константный домен
45 СН1 человека типа гамма для тяжелой цепи и константный домен легкой цепи человека типа капша, как описано в патенте США 7482000. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD4, например, мутант антитела 13B8.2, содержит аминокислотную

замену H91A в вариабельной легкой цепи, аминокислотную замену Y92A в вариабельной легкой цепи, аминокислотную замену H35A в вариабельной тяжелой цепи и/или аминокислотную замену R53A в вариабельной тяжелой цепи, каждая согласно нумерации Kabat. В некоторых аспектах по сравнению с вариабельными доменами Fab-фрагмента 13B8.2 в m13B8.2 остаток His в позиции 91 легкой цепи (позиция 93 в SEQ ID NO: 30) мутирован в остаток Ala, а Arg в позиции 53 тяжелой цепи (позиция 55 в SEQ ID NO: 29) мутирован в Ala. В некоторых вариантах осуществления реагент, который обратимо связан с антителом против CD4 или его фрагментом, имеется на рынке, или его получают из имеющегося на рынке реагента (например, каталог № 6-8000-206 или 6-8000-205 или 6-8002-100; IBA GmbH, Gottingen, Germany).

В некоторых вариантах осуществления селективным маркером может быть CD8, а селективный агент специфически связывает CD8. В некоторых аспектах селективный агент, который специфически связывает CD8, можно выбрать из группы, состоящей из антитела против CD8, фрагмента двухвалентного антитела против CD8, фрагмента моновалентного антитела против CD8 и белковой связывающей CD8 молекулы с антителоподобными связывающими свойствами. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD8, например, фрагмент двухвалентного антитела или фрагмент моновалентного антитела (например, CD8 Fab-фрагмент) можно получить из антитела ОКТ8 (например, ATCC CRL-8014) или его функционально активного мутанта, который сохраняет специфическое связывание для CD8. В некоторых вариантах осуществления реагент, который обратимо связан с антителом против CD8 или его фрагментом, имеется на рынке, или его получают из имеющегося на рынке реагента (например, каталог № 6-8003 или 6-8000-201; IBA GmbH, Gottingen, Germany).

В некоторых вариантах осуществления селективным маркером может быть CD3, а селективный агент специфически связывает CD3. В некоторых аспектах селективный агент, который специфически связывает CD3, можно выбрать из группы, состоящей из антитела против CD3, фрагмента двухвалентного антитела против CD3, фрагмента моновалентного антитела против CD3 и белковой связывающей CD3 молекулы с антителоподобными связывающими свойствами. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD3, например, фрагмент двухвалентного антитела или фрагмент моновалентного антитела (например, CD3 Fab-фрагмент), можно получить из антитела ОКТ3 (например, ATCC CRL-8001; см., например, Stemberger et al. PLoS One. 2012; 7(4): e35798) или его функционально активного мутанта, который сохраняет специфическое связывание для CD3. В некоторых вариантах осуществления реагент, который обратимо связан с антителом против CD3 или его фрагментом, имеется на рынке, или его получают из имеющегося на рынке реагента (например, каталог № 6-8000-201, 6-8001-100; IBA GmbH, Gottingen, Germany).

В некоторых вариантах осуществления селективным маркером может быть CD25, а селективный агент специфически связывает CD25. В некоторых аспектах селективный агент, который специфически связывает CD25, можно выбрать из группы, состоящей из антитела против CD25, фрагмента двухвалентного антитела против CD25, фрагмента моновалентного антитела против CD25 и белковой связывающей CD25 молекулы с антителоподобными связывающими свойствами. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD25, например, фрагмент двухвалентного антитела или фрагмент моновалентного антитела (например, CD25 Fab-фрагмент), можно получить из антитела FRT5 (см., например, Stemberger et al. 2012) или его функционально активного мутанта, который сохраняет специфическое связывание для CD25. В некоторых вариантах осуществления реагент, который обратимо связан с антителом против CD4 или его

фрагментом, имеется на рынке, или его получают из имеющегося на рынке реагента (например, каталог № 6-8000-205 или 6-8000-207 или 6-8004-050; IBA GmbH, Gottingen, Germany).

5 В некоторых вариантах осуществления селективным маркером может быть CD62L, а селективный агент специфически связывает CD62L. В некоторых аспектах селективный агент, который специфически связывает CD62L, можно выбрать из группы, состоящей из антитела против CD62L, фрагмента двухвалентного антитела против CD62L, фрагмента моновалентного антитела против CD62L и белковой связывающей CD62L молекулы с антителоподобными связывающими свойствами. В некоторых вариантах
10 осуществления антитело против CD62L, например, фрагмент двухвалентного антитела или фрагмент моновалентного антитела (например, CD62L Fab-фрагмент) можно получить из антитела DREG56 (например, ATCC HB300; см., например, Stemberger et al. 2012) или его функционально активного мутанта, который сохраняет специфическое связывание для CD62L. В некоторых вариантах осуществления реагент, который
15 обратимо связан с антителом против CD62L или его фрагментом, имеется на рынке, или его получают из имеющегося на рынке реагента (например, каталог № 6-8000-204 или 6-8005-050; IBA GmbH, Gottingen, Germany).

В некоторых вариантах осуществления селективным маркером может быть CD45RA, а селективный агент специфически связывает CD45RA. В некоторых аспектах
20 селективный агент, который специфически связывает CD45RA, можно выбрать из группы, состоящей из антитела против CD45RA, фрагмента двухвалентного антитела против CD45RA, фрагмента моновалентного антитела против CD45RA и белковой связывающей CD45RA молекулы с антителоподобными связывающими свойствами. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD45RA, например, фрагмент
25 двухвалентного антитела или фрагмент моновалентного антитела (например, CD45RA Fab-фрагмент) можно получить из антитела MEM56 (например, Millipore 05-1413; см., например, Stemberger et al. 2012) или его функционально активного мутанта, который сохраняет специфическое связывание для CD45RA. В некоторых вариантах осуществления реагент, который обратимо связан с антителом против CD45RA или его
30 фрагментом, имеется на рынке, или его получают из имеющегося на рынке реагента (например, каталог № 6-8000-208 или 6-8007-050; IBA GmbH, Gottingen, Germany).

В некоторых вариантах осуществления селективным маркером может быть CD45RO, а селективный агент специфически связывает CD45RO. В некоторых аспектах
35 селективный агент, который специфически связывает CD45RO, можно выбрать из группы, состоящей из антитела против CD45RO, фрагмента двухвалентного антитела против CD45RO, фрагмента моновалентного антитела против CD45RO и белковой связывающей CD45RO молекулы с антителоподобными связывающими свойствами. В некоторых вариантах осуществления реагент, который обратимо связан с антителом против CD45RO или его фрагментом, имеется на рынке, или его получают из имеющегося
40 на рынке реагента (например, каталог № 6-8000-209 или 6-8012-020; IBA GmbH, Gottingen, Germany).

В некоторых вариантах осуществления селективным маркером может быть CD154, а селективный агент специфически связывает CD154. В некоторых аспектах селективный агент, который специфически связывает CD154, можно выбрать из группы, состоящей
45 из антитела против CD154, фрагмента двухвалентного антитела против CD154, фрагмента моновалентного антитела против CD154 и белковой связывающей CD154 молекулы с антителоподобными связывающими свойствами. В некоторых вариантах осуществления реагент, который обратимо связан с антителом против CD154 или его

фрагментом, имеется на рынке, или его получают из имеющегося на рынке реагента (например, каталог № 6-8000-202 или 6-5510-050; IBA GmbH, Göttingen, Germany).

В некоторых вариантах осуществления селективным маркером может быть CD16, а селективный агент специфически связывает CD16. В некоторых аспектах селективный агент, который специфически связывает CD16, можно выбрать из группы, состоящей из антитела против CD16, фрагмента двухвалентного антитела против CD16, фрагмента моновалентного антитела против CD16 и белковой связывающей CD16 молекулы с антителоподобными связывающими свойствами. В некоторых вариантах осуществления реагент, который обратимо связан с антителом против CD16 или его фрагментом, имеется на рынке, или его получают из имеющегося на рынке реагента. В некоторых аспектах связывающая CD16 молекула содержит последовательности тяжелой цепи и/или легкой цепи, приведенные в SEQ ID NO: 52 и 53, соответственно.

В любом из приведенных выше примеров фрагментом двухвалентного антитела может быть (Fab)₂'-фрагмент или двухвалентный одноцепочечный Fv-фрагмент, тогда как фрагмент моновалентного антитела можно выбрать из группы, состоящей из Fab-фрагмента, Fv-фрагмента и одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv). В любом из приведенных выше примеров белковой связывающей молекулой с антителоподобными связывающими свойствами может быть аптамер, мутеин на основе полипептида семейства липокалинов, глутело, белок на основе анкиринового каркаса, белок на основе кристаллического каркаса, аднектин, нанотело, дарпин и авимер.

III. Способы культивирования клеток

В данном документе представлены способы культивирования клеток, которые включают инкубацию композиции, содержащей клетки-мишени (например, Т-клетки), в присутствии агента (например, первого или второго рецептор-связывающих агентов, например, стимулирующих агентов или селективных агентов), который способен связываться с молекулой на поверхности клеток-мишеней (например, Т-клеток) в композиции и который обратимо связан с реагентом, содержащим множество участков связывания, способных обратимо связываться с агентом. В некоторых вариантах осуществления реагент представляет собой олигомерный реагент в виде частиц, например, любой из описанного. В некоторых вариантах осуществления инкубацию проводят в условиях, в которых агент связывается, например, специфически связывается, с молекулой на клетке. В некоторых случаях для определенных рецептор-связывающих агентов (например, стимулирующих агентов) такое связывание может индуцировать или модулировать сигнал в клетках-мишенях (например, Т-клетках) в композициях, например, первичный сигнал или дополнительный сигнал, как описано. В некоторых вариантах осуществления связывание агента с молекулой приводит к одному или более из стимуляции, активации, размножения (пролиферации) и/или дифференциации клеток-мишеней в композиции.

В некоторых вариантах осуществления представленный способ можно использовать для селективного индуцирования размножения *ex vivo* популяции клеток, таких как В-клетки, Т-клетки или естественные клетки-киллеры. В некоторых случаях стимуляцию можно проводить в отсутствие экзогенных факторов роста, таких как лимфокины, и дополнительных клеток. В некоторых вариантах осуществления пролиферацию этих клеток, таких как В-клетки или Т-клетки, можно индуцировать без необходимости в антигене, обеспечивая таким образом популяцию размноженных клеток, например, популяцию Т-клеток, которая является поликлональной относительно реактивности антигена. Способы, раскрытые в данном документе, могут предусматривать замедленную пролиферацию выбранной популяции Т-клеток, таких как Т-клетки CD4+

или CD8+, в течение продолжительного периода времени для получения многократного увеличения количества этих клеток относительно исходной популяции Т-клеток. В общем, в случае (клонального) размножения популяции лимфоцитов, как описано в данном документе, все потомство может иметь такую же антигенную специфичность, как у популяции клеток, которые выбрали для размножения.

В некоторых вариантах осуществления способы относятся к размножению популяции антиген-специфических Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления для получения популяции антиген-специфических Т-клеток Т-клетки вводят в контакт с антигеном в форме, подходящей для запуска первичного активационного сигнала в Т-клетке, т.е.

Антиген представляют Т-клетке таким образом, чтобы запускать в Т-клетке сигнал через комплекс TCR/CD3. Например, антиген можно представлять Т-клетке с помощью антигенпредставляющей клетки в сочетании с молекулой МНС. Антигенпредставляющую клетку, такую как В-клетка, макрофаг, моноцит, дендритная клетка, клетка Лангеранса или другая клетка, которая может представлять антиген Т-клетке, можно инкубировать с Т-клеткой в присутствии антигена (например, растворимого антигена) таким образом, чтобы антигенпредставляющая клетка представляла антиген Т-клетке. Альтернативно, с Т-клеткой можно инкубировать клетку, экспрессирующую интересующий антиген.

Например, опухолевую клетку, экспрессирующую опухоль-ассоциированные антигены, можно инкубировать вместе с Т-клеткой, чтобы индуцировать опухоль-специфический ответ. Аналогично, с Т-клеткой можно инкубировать клетку, инфицированную патогеном, например, вирусом, который представляет антигены патогена. После антиген-специфической активации популяции Т-клеток клетки можно размножить в соответствии с представленными способами. Например, после установления специфичности антигена Т-клетки можно размножить путем культивирования с антителом против CD3 (используемым в качестве первого агента) и антителом против CD28 (используемым в качестве второго агента) в соответствии со способами, описанными в данном документе. В другом варианте осуществления первым агентом может быть комплекс МНС I:пептид, который связывается с антигенспецифической популяцией Т-клеток. В таком варианте осуществления можно использовать любой известный антиген-специфический пептид, который может образовывать комплекс с соответствующей молекулой МНС I. Альтернативно, в качестве первого агента также можно использовать природный лиганд рецептора, который запускает размножение клеток. Например, внеклеточный домен CD19 можно использовать для вызова активации внутриклеточных сигнальных каскадов клеток, трансдуцированных для экспрессии химерного связывающего CD19 антигенного рецептора (CAR). Приведенные выше иллюстративные аспекты показаны в примерах.

В некоторых вариантах осуществления представлен способ культивирования популяции клеток *in vitro*, включающий введение в контакт образец, содержащий композицию, содержащую множество клеток, с реагентом мультимеризации и/или олигомерным реагентом в виде частиц, связанными с одним или более агентами. В некоторых вариантах осуществления реагент мультимеризации представляет собой олигомерный реагент в виде частиц. Реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, имеет обратимо иммобилизованный на нем (связанный с ним) агент (первый или второй, рецептор-связывающий, например, стимулирующий агент или селективный агент), который можно использовать для отбора, стимуляции, размножения и/или дифференциации клеток. В некоторых вариантах осуществления первый агент предоставляет в клетки первичный активационный сигнал, при этом реагент мультимеризации и/или

олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, содержит по меньшей мере один участок Z1 связывания для обратимого связывания первого агента. Первый агент содержит по меньшей мере один партнер C1 по связыванию, при этом партнер C1 по связыванию способен обратимо связываться с участком Z1 связывания реагента мультимеризации и/или олигомерного реагента в виде частиц, связанного с одним или более агентами, при этом первый агент связан с реагентом мультимеризации посредством обратимой связи, образованной между партнером C1 по связыванию и участком Z1 связывания. Первый агент связывается с рецепторной молекулой на поверхности клеток, предоставляя таким образом первичный активационный сигнал в клетки и активируя таким образом клетки.

В некоторых вариантах осуществления реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, иммобилизируют на носителе, таком как твердая поверхность. В некоторых вариантах осуществления реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, не связан с носителем, например, не связан с твердой поверхностью или неподвижной фазой.

Например, в некоторых вариантах осуществления предоставлен способ размножения популяции клеток *in vitro*, включающий введение в контакт образец, содержащий популяцию клеток, с реагентом мультимеризации и/или олигомерным реагентом в виде частиц, связанными с одним или более агентами, при этом реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, не иммобилизован на твердом носителе, т.е. Находится в растворимой форме, и имеет связанный с ним агент (первый или второй, рецептор-связывающий, например, стимулирующий агент или селективный агент), который можно использовать для отбора, стимуляции, размножения и/или дифференциации клеток. В некоторых вариантах осуществления первый агент, который предоставляет в клетки первичный активационный сигнал, обратимо связан с реагентом мультимеризации и/или олигомерным реагентом в виде частиц, связанными с одним или более агентами. Реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, содержит по меньшей мере один участок связывания, например, Z1, для связывания первого агента, при этом первый агент содержит по меньшей мере один партнер по связыванию, например, C1, при этом партнер C1 по связыванию способен связываться с участком Z1 связывания реагента мультимеризации и/или олигомерного реагента в виде частиц, связанного с одним или более агентами. В некоторых вариантах осуществления первый агент связан с реагентом мультимеризации и/или олигомерным реагентом в виде частиц, связанными с одним или более агентами, посредством связи, образованной между партнером C1 по связыванию и участком Z1 связывания, и первый агент связывается с рецепторной молекулой на поверхности клеток, предоставляя таким образом первичный активационный сигнал в клетки и активируя таким образом клетки. В некоторых вариантах осуществления при использовании растворимого агента мультимеризации нет необходимости, чтобы связь между участком C связывания, например, C1, и участком Z связывания, например, Z1, была обратимой.

Например, в некоторых вариантах осуществления представленные способы также включают использование реагента мультимеризации и/или олигомерного реагента в виде частиц, связанного с одним или более агентами, имеющими связанный с ними второй агент, такой как дополнительные или костимулирующие молекулы, который стимулирует вспомогательную молекулу на поверхности клеток. В некоторых случаях агент мультимеризации иммобилизируют на носителе, например, твердом носителе,

твердой фазе или неподвижной фазе. В некоторых вариантах осуществления агент мультимеризации не иммобилизован на носителе, т.е. Находится в растворимой форме. В некоторых вариантах осуществления второй агент содержит партнер по связыванию, например, С2, при этом партнер по связыванию, например, С2, способен 5 обратимо связываться с участком связывания, например, Z2, реагента мультимеризации и/или олигомерного реагента в виде частиц, при этом второй агент связан с реагентом мультимеризации и/или олигомерным реагентом в виде частиц посредством обратимой связи, образованной между партнером С2 по связыванию и участком Z2 связывания. В некоторых вариантах осуществления связь, образованная между партнером С1 по 10 связыванию и участком Z1 связывания, может быть обратимой, и связь, образованная между партнером С2 по связыванию и участком Z2 связывания, может быть обратимой. В данном случае константа (Kd) диссоциации для обратимого связывания между указанным участком Z1 связывания и указанным партнером С1 по связыванию и/или для обратимого связывания между указанным участком Z2 связывания и указанным 15 партнером С2 по связыванию может быть в диапазоне от 10^{-2} М до 10^{-13} М. В некоторых аспектах, например, когда реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, не связан с носителем (например, не связан с твердым носителем или неподвижной фазой), связь, образованная между партнером С1 по связыванию и участком Z1 связывания, может быть необратимой, и/или также связь, образованная между партнером С2 по связыванию и участком Z2 20 связывания, может быть необратимой.

В некоторых случаях второй агент связывается с вспомогательной молекулой на поверхности клеток, стимулируя таким образом активированные клетки. В данном варианте осуществления первый агент может стимулировать связанный с комплексом 25 TCR/CD3 сигнал в Т-клетках и может быть связывающий агент, который специфически связывает CD3. В данном варианте осуществления вспомогательной молекулой на Т-клетке может быть CD28, а второй агент, который связывает вспомогательную молекулу, представляет собой связывающий реагент, который специфически связывает CD28. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления обнаружено, что также можно 30 использовать выделение других дополнительных молекул, которые в некоторых случаях могут изменять, например, улучшать одну или более особенностей, свойств или характеристик культивируемых клеток. В некоторых вариантах осуществления вспомогательной молекулой может быть одно или более из IL-12R, IFN γ R, IL-4R, IL-17R, ROR γ t, ROR α , CXCR3, CCR7, CD62L, CXCR1 или CXCR4 (например, антитело 35 против IL-12R, антитело против IFN γ R, антитело против IL-4R и антитело против IL-17R, антитело против ROR γ t, антитело против ROR α , антитело против CXCR3, антитело против CCR7, антитело против CD62L, антитело против CXCR1 или антитело против CXCR4, соответственно. Иллюстративные агенты, такие как рецептор-связывающие агенты (например, стимулирующие агенты), описаны ниже.

В некоторых вариантах осуществления представленный способ можно осуществлять при любой температуре, при которой жизнеспособность популяции клеток по меньшей мере существенно не затрагивается. В некоторых вариантах осуществления условия, при которых осуществляют инкубацию или культивирование, включают любые условия, 40 которые по меньшей мере не являются существенно вредными, не наносят ущерба или по меньшей мере существенно не влияют на жизнеспособность, например, при которых процентное значение популяции клеток, которые необходимо размножить с полной жизнеспособностью, составляет по меньшей мере 70%, включая по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере

92%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5%. В некоторых вариантах осуществления представленный способ осуществляют при температуре приблизительно 20°C или выше. В зависимости от популяции клеток, подлежащих размножению, подходящий диапазон температур может быть, например, от приблизительно 20°C до приблизительно 45°C, в том числе от приблизительно 25°C до приблизительно 40°C или от приблизительно 32°C до 37°C. В некоторых вариантах осуществления способ согласно изобретению осуществляют при постоянном значении температуры или при выбираемом значении температуры \pm приблизительно 5°C, \pm приблизительно 4°C, \pm приблизительно 3°C, \pm приблизительно 2°C, \pm приблизительно 1°C или \pm приблизительно 0,5°C. Специалист в данной области способен эмпирически определить подходящую температуру, принимая в расчет природу клеток и условия размножения. Обычно человеческие клетки размножают при такой температуре, как 37°C.

В рамках настоящего изобретения также представлены мультимеризированные агенты или композиция, содержащая мультимеризационные реагенты и/или олигомерные реагенты в виде частиц, связанные с одним или более агентами, которые способны размножать популяцию клеток. Таким мультимеризированным агентом и/или олигомерным реагентом в виде частиц, связанным с одним или более агентами, который способен размножать популяцию клеток, является реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, который не связан с носителем (например, в растворимой форме) и содержит по меньшей мере один участок Z связывания, например, Z1, для обратимого связывания первого агента, который предоставляет в клетки первичный активационный сигнал, при этом реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, имеет обратимо связанный с ним указанный первый агент, который предоставляет в клетки первичный активационный сигнал; при этом первый агент содержит по меньшей мере один партнер C по связыванию, например, C1, при этом партнер C1 по связыванию способен обратимо связываться по меньшей мере с одним участком Z1 связывания реагента мультимеризации и/или олигомерного реагента в виде частиц, связанного с одним или более агентами, при этом первый агент связан с реагентом мультимеризации и/или олигомерным реагентом в виде частиц, связанными с одним или более агентами посредством обратимой связи, образованной между партнером C1 по связыванию и участком Z1 связывания. В данном случае следует заметить, что такой агент мультимеризации может иметь иммобилизованный на нем любой из первых агентов, которые описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления мультимеризированный реагент, представленный в данном документе, может дополнительно содержать по меньшей мере один участок связывания, например, Z2, для обратимого связывания второго агента, который стимулирует вспомогательную молекулу на поверхности клеток, при этом реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, имеет обратимо связанный с ним второй агент, который стимулирует вспомогательную молекулу на поверхности клеток, при этом второй агент содержит партнер по связыванию, например, C2, при этом партнер C2 по связыванию способен связываться по меньшей мере с одним участком Z2 связывания реагента мультимеризации и/или олигомерного реагента в виде частиц. В данном варианте осуществления второй агент связан с реагентом мультимеризации и/или олигомерным реагентом в виде частиц посредством связи, образованной между партнером C2 по связыванию и участком Z2 связывания. В некоторых вариантах осуществления вторым

агентом является любой, который может связываться с IL-12R, IFN γ R, IL-4R, IL-17R, ROR γ t, ROR α , CXCR3, CCR7, CD62L, CXCR1 или CXCR4 (например, антитело против IL-12R, антитело против IFN γ R, антитело против IL-4R и антитело против IL-17R, антитело против ROR γ t, антитело против ROR α , антитело против CXCR3, антитело против CCR7, антитело против CD62L, антитело против CXCR1 или антитело против CXCR4, соответственно).

В некоторых вариантах осуществления культивирование композиции, содержащей клетки-мишени (например, Т-клетки) с мультимеризированным агентом (например, мутеином стрептавидина против CD3/против CD28 или его олигомером) можно осуществлять в биореакторе, таком как половолоконный биореактор (например, половолоконный биореактор системы размножения клеток Quantum®) или биореактор с пластиковой емкостью (например, Cellbag®, используемый в Xuri Cell Expansion System W25 от GE Healthcare).

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение в контакт культивируемых клеток-мишеней (например, Т-клеток) в реакционной смеси (например, содержащей клетки-мишени, например, Т-клетки, связанные с реагентом мультимеризации и/или олигомерным реагентом в виде частиц, например, посредством первого агента и второго агента) с (i) конкурентным реагентом (например, свободным первым партнером С по связыванию, например, С1) или его аналогом, способным разрывать связь между первым партнером по связыванию, например, С1, и участком связывания, например, Z1, и/или (например, если необходимо) (ii) вторым конкурентным реагентом, например, свободным вторым партнером по связыванию, например, С2, или его аналогом, способным разрывать связь между вторым партнером С2 по связыванию и участком Z2 связывания. За счет этого разрывают обратимую связь между указанным партнером С1 по связыванию первого агента и указанными участками Z1 связывания, а также обратимую связь между указанным партнером С2 по связыванию второго агента и указанным участком Z2 связывания указанного реагента мультимеризации и/или олигомерного реагента в виде частиц, таким образом высвобождая в элюате Т-клетки, связанные с реагентом мультимеризации и/или олигомерным реагентом в виде частиц посредством первого агента и второго агента, и нарушая стимуляцию и/или размножение Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления конкурентный реагент (например, первый и/или второй конкурентный реагент) добавляют в пределах 14 дней, 10 дней, 7 дней или 5 дней после начала инкубации, например, в пределах 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней, 4 дней, 3 дней, 2 дней или 1 дня после начала инкубации. В конкретных вариантах осуществления конкурентный реагент добавляют в пределах 5 дней после начала инкубации, например, в пределах 4 дней, 3 дней, 2 дней или 1 дня после начала инкубации. В некоторых вариантах осуществления конкурентный реагент добавляют в пределах 1 дня после начала инкубации, например, в пределах 18 часов, 16 часов, 12 часов, 8 часов, 6 часов, 4 часов, 3 часов, 2 часов, 90 минут, 60 минут или 30 минут после начала инкубации. Следовательно, путем регулирования времени, в которое нарушают стимуляцию, можно изменить одну или более отдельных особенностей культивируемых Т-клеток, элюированных из мультимеризированного агента, как описано в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления, если добавление конкурентного реагента начинают в пределах 5 дней, 4 дней, 3 дней, 2 дней или 1 дня после инкубации, это будет увеличивать стимуляцию, активацию, обогащение, размножение, отбор и/или пролиферацию одной или более культивируемых клеток.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает отделение

или удаление одного или более компонентов, оставшихся после обратимой диссоциации компонентов. В некоторых вариантах осуществления любой несвязанный или остаточный биотин в культивируемых клетках-мишенях (например, Т-клетках) можно отделить или удалить. В некоторых вариантах осуществления реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц удаляют или отделяют от клеток в композиции культивируемых клеток-мишеней. Например, в некоторых вариантах осуществления отделение/удаление можно осуществлять с использованием второй неподвижной фазы. Для этой цели смесь, содержащую клетки-мишени (например, Т-клетки) и растворимый реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, перед или после нанесения на первую неподвижную фазу, описанную выше, подвергают хроматографии на подходящей второй неподвижной фазе. Этой вторичной неподвижной фазой может быть матрица для гель-фильтрации и/или матрица для аффинной хроматографии, при этом матрица для гель-фильтрации и/или аффинной хроматографии содержит аффинный реагент. Аффинный реагент, состоящий из на хроматографической смолы, включают партнер D по связыванию, который (специфически) связывается с участком Z1 связывания и/или участком Z2 связывания, при наличии, реагента мультимеризации и/или олигомерного реагента в виде частиц, связанного с одним или более агентами, таким образом иммобилизируя на неподвижной фазе реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами. Если используют основанный на стрептавидине реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, а первый и второй агенты в качестве партнера С1 или С2 по связыванию имеют стрептавидин-связывающий пептид, партнером D по связыванию, который содержится в аффинном реагенте данной второй неподвижной фазы, может быть биотин. Растворимый олигомер стрептавидина или мутеина стрептавидина, который используют в качестве реагента мультимеризации и/или олигомерного реагента в виде частиц, затем связывается с биотином, который обычно ковалентно соединен с матрицей для хроматографии, такой как имеющаяся на рынке биотин-сефароза™. В некоторых таких вариантах осуществления культивируемые клетки (например, культивируемые Т-клетки) могут быть извлечены из реагента мультимеризации и/или олигомерного реагента в виде частиц.

А. Клетки

Клетки, содержащиеся в композиции, содержащей клетки-мишени, обычно являются эукариотическими клетками, такими как клетки млекопитающих, и обычно являются человеческими клетками. В некоторых вариантах осуществления клетки получают из крови, костного мозга, лимфы или лимфоидных органов, или они являются клетками иммунной системы, такими как клетки врожденного или адаптивного иммунитета, например, миелоидные или лимфоидные клетки, включая лимфоциты, обычно Т-клетки и/или НК-клетки. Другие иллюстративные клетки включают стволовые клетки, такие как мультипотентные и плюрипотентные стволовые клетки, включая индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). Клетками обычно являются первичные клетки, такие как клетки, выделенные прямо у субъекта и/или выделенные у субъекта и замороженные.

В некоторых вариантах осуществления обратимо связанные агенты, например, мультимеризированные агенты, представленные в данном документе, способны размножать популяцию лимфоцитов или субпопуляцию, содержащуюся в популяции лимфоцитов. Популяцией лимфоцитов, подлежащих размножению, может любая подходящая популяция, например, популяция В-клеток, популяция Т-клеток или

популяция клеток естественных киллеров. Популяцией Т-клеток может быть популяция антиген-специфических Т-клеток, популяция Т-хелперов, цитотоксических Т-клеток, Т-клеток памяти, регуляторных Т-клеток или популяция Т-клеток естественных киллеров. Соответственно, в таких вариантах осуществления мультимеризованного реагента первый агент способен стимулировать в Т-клетках связанный с комплексом TCR/CD3 сигнал. Первым агентом, присутствующим в мультимеризованном агенте, таким образом может быть связывающий реагент, который специфически связывает CD3, тогда как вторым агентом, который связывает вспомогательную молекулу, например, может быть связывающий агент, который специфически связывает CD28, CD137, IL-12R, IFN γ R, IL-4R, IL-17R, ROR γ t, ROR α , CXCR3, CCR7, CD62L, CXCR1 или CXCR4.

В некоторых вариантах осуществления клетки включают одну или более подгрупп Т-клеток или клеток других типов, таких как все популяции Т-клеток, CD4+ клетки, CD8+ клетки и их субпопуляции, такие как субпопуляции, определяемые функцией, состоянием активации, зрелостью, потенциалом для способности дифференциации, размножения, рециркуляции, локализации и/или персистенции, антиген-специфичностью, типом антигенного рецептора, присутствием в конкретном органе или компартменте, маркером или профилем секреции цитокинов и/или степенью дифференциации. Со ссылкой на субъект, подлежащего лечению, клетки могут быть аллогенными и/или аутологичными. В число способов входят стандартные способы. В некоторых аспектах, например, для стандартных технологий, клетки являются плюрипотентными и/или мультипотентными, например, стволовыми клетками, такими как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). В некоторых вариантах осуществления способы включают выделение клеток у субъекта, получение, обработку, культивирование и/или их конструирование, как описано в данном документе, и повторное их введение тому же пациенту перед или после криоконсервирования.

Среди подтипов и субпопуляций Т-клеток и/или CD4+ и/или Т-клеток CD8+ находятся наивные (T_N) Т-клетки, эффекторные Т-клетки (T_{EFF}), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как стволовые Т-клетки памяти (T_{SCM}), центральные Т-клетки памяти (T_{CM}), эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM}) или терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти, инфильтрирующие опухоли лимфоциты (TIL), незрелые Т-клетки, зрелые Т-клетки, Т-хелперы, цитотоксические Т-клетки, связанные со слизистой оболочкой инвариантные Т-клетки (MAIT), существующие в природе и адаптивные регуляторные Т-клетки (Treg), Т-хелперы, такие как TH1-клетки, TH2-клетки, TH3-клетки, TH17-клетки, TH9-клетки, TH22-клетки, фолликулярные Т-хелперы, альфа/бета Т-клетки и дельта/гамма Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления клетками являются клетки-естественные киллеры (NK). В некоторых вариантах осуществления клетками являются моноциты или гранулоциты, например, миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы.

1. Получение клеток

В некоторых вариантах осуществления получение клеток включает одну или более стадий культивирования и/или получения. Клетки можно выделить из образца, такого как биологический образец, например, образец, произошедший или полученный у субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъектом, у которого выделяют клетки, является субъект, имеющий заболевание или состояние или нуждающийся в клеточной терапии или для которого будут применять клеточную терапию. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек, нуждающийся в конкретном

терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой выделяют, обрабатывают и/или конструируют клетки.

Соответственно, клетками в некоторых вариантах осуществления являются первичные клетки, например, первичные человеческие клетки. Образцы включают ткань, текучую среду и другие образцы, взятые прямо у субъекта, а также образцы, полученные на одной или более стадиях обработки, таких как отделения, центрифугирования, генной инженерии (например, трансдукции с помощью вирусного вектора), промывания и/или инкубации. биологическим образцом может быть образец, полученный прямо из биологического источника, или обработанный образец. биологические образцы включают, но без ограничения, текучие среды организма, такие как кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот, образцы тканей и органов, включая полученные из них обработанные образцы.

В некоторых аспектах образцом, из которого получают или выделяют клетки, является кровь или полученный из крови образец, или он представляет собой, или его получают из продукта афереза или лейкофереза. Иллюстративные образцы включают цельную кровь, моноядерные клетки периферической крови (РВМС), лейкоциты, костный мозг, тимус, биопсию ткани, опухоль, лейкемию, лимфому, лимфотический узел, кишечную лимфоидную ткань, лимфоидную ткань слизистых оболочек, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкие, желудок, кишечник, толстую кишку, почки, поджелудочную железу, молочную железу, кости, предстательную железу, шейку матки, яички, яичники, миндалины или другие органы и/или полученные из них клетки. В контексте клеточной терапии, например, адоптивной клеточной терапии, образцы включают образцы из аутологичных и аллогенных источников.

В некоторых вариантах осуществления клетки получают из линий клеток, например, линий Т-клеток. Клетки в некоторых вариантах осуществления получают из ксеногенного источника, например, от мыши, крысы, нечеловеческого примата или свиньи.

В некоторых вариантах осуществления выделение клеток включает одну или более стадий получения и/или разделения клеток на основе отсутствия аффинности. В некоторых примерах клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или более реагентов, например, для удаления нежелательных компонентов, обогащения нужными компонентами, лизирования или удаления клеток, чувствительных к конкретным реагентам. В некоторых примерах клетки разделяют на основе одного или более свойств, таких как плотность, адгезивные свойства, размер, чувствительность и/или устойчивость к конкретным компонентам.

В некоторых примерах клетки из циркулирующей крови субъекта получают, например, путем афереза или лейкофереза. В некоторых аспектах образцы содержат лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядродержащие белые кровяные клетки, красные кровяные клетки и/или тромбоциты, и в некоторых аспектах содержат клетки, не являющиеся красными кровяными клетками и тромбоцитами.

В некоторых вариантах осуществления кровяные клетки, взятые у субъекта, промывают, например, для удаления фракции плазмы и для помещения клеток в подходящий буфер или среду для последующих стадий обработки. В некоторых вариантах осуществления клетки промывают забуференным фосфатом физиологическим раствором (PBS). В некоторых вариантах осуществления в промывающем растворе отсутствует кальций и/или магний и/или многие или все двухвалентные катионы. В некоторых аспектах стадию промывания выполняют с помощью полуавтоматической

«проточной» центрифуги (например, Cobe 2991 cell processor, Baxter) в соответствии с инструкциями изготовления. В некоторых аспектах стадию промывания выполняют путем фильтрации в тангенциальном потоке (TFF) в соответствии с инструкциями изготовления. В некоторых вариантах осуществления после промывания клетки ресуспендируют во множестве биосовместимых буферов, таких как, например, не содержащий $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ PBS. В некоторых вариантах осуществления компоненты образцов кровяных клеток удаляют, и клетки прямо ресуспендируют в культуральной среде.

В некоторых вариантах осуществления способы включают способы разделения клеток на основе плотности, такие как получение белых кровяных клеток из периферической крови путем лизирования красных кровяных клеток и центрифугирования через градиент перколла или фиколла.

В некоторых вариантах осуществления способы выделения включают разделение клеток разных типов на основе экспрессии или присутствия в клетке одной или более специфических молекул, таких как маркеры поверхности, например, поверхность белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления можно использовать любой известный способ разделения на основе таких маркеров. Способы разделения могут включать любой из способов, раскрытых в данном документе, включая способы с применением обратимых систем реагентов, например, агентов (таких как рецептор-связывающие агенты или селективные агенты) и реагентов, которые описаны в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления разделение представляет собой разделение на основе аффинности или иммуноаффинности. Например, выделения в некоторых аспектах включает разделение клеток и популяций клеток на основе клеточной экспрессии или уровня экспрессии одного или более маркеров, обычно маркеров клеточной поверхности, например, путем инкубации с антителом или партнером по связыванию, который специфически связывается с такими маркерами, обычно с последующими стадиями промывания и отделения клеток, имеющих связанное антитело или партнер по связыванию, от тех клеток, которые не связаны с антителом или партнером по связыванию.

Такие стадии разделения могут быть основаны на положительном отборе, в котором для дальнейшего использования оставляют клетки, имеющие связанные реагенты, и/или на отрицательном отборе, в котором оставляют клетки, не связанные с антителом или партнером по связыванию. В некоторых примерах для дальнейшего использования оставляют обе фракции. В некоторых аспектах может быть особенно полезен отрицательный отбор, когда не доступно антитело, которое специфически идентифицирует тип клетки в гетерогенной популяции таким образом, чтобы наилучшим образом осуществлять разделение на основе маркеров, экспрессируемых клетками, не являющимися нужной популяцией.

Разделение не должно приводить к 100% обогащению или удалению конкретной популяции клеток или клеток, экспрессирующих конкретный маркер. Например, положительный отбор или обогащение клетками конкретного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к увеличению количества или процентного значения таких клеток, но не обязательно приводит к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих маркер. Также, отрицательный отбор, удаление или убавление клеток конкретного типа, таких как клетки, экспрессирующие маркер, относится к уменьшению количества или процентного значения таких клеток, но не обязательно приводит к полному удалению всех таких клеток.

В некоторых примерах осуществляют множество циклов стадий отделения, когда положительно или отрицательно отобранную фракцию из одной стадии подвергают другой стадии разделения, такой как последующий положительный или отрицательный отбор. В некоторых примерах на одной стадии разделение можно убавлять клетки, экспрессирующие одновременно множество маркеров, например, путем инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, каждый из которых является специфическим к маркеру, выделенному для отрицательного отбора. Также, можно одновременно подвергать положительному отбору множество типов клеток путем инкубации клеток с множеством антител или партнеров по связыванию, экспрессируемых на клетках разных типов.

Например, в некоторых аспектах конкретные субпопуляции Т-клеток, таких как клетки, положительные или экспрессирующие высокие уровни одного или более маркеров поверхности, например, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺ и/или CD45RO⁺ Т-клетки, выделяют с помощью методик положительного или отрицательного отбора.

Например, можно проводить положительный отбор CD3⁺, CD28⁺ Т-клеток с использованием конъюгированных с CD3/CD28 магнитных шариков (например, DYNABEADS® M-450 устройство выращивания Т-клеток CD3/CD28).

В некоторых вариантах осуществления выделения осуществляют путем обогащения конкретной популяцией клеток с помощью положительного отбора или убавления конкретной популяции клеток с помощью отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления положительный или отрицательный отбор выполняют путем инкубации клеток с одним или более антителами или другим связывающим агентом, которые специфически связываются с одним или более маркерами поверхности, экспрессируемыми или экспрессируемыми (маркер⁺) на относительно более высоком уровне (маркер^{high}) на положительно или отрицательно отобранных клетках, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют из образца РВМС путем отрицательного отбора маркеров, экспрессированных не на Т-клетках, например, на В-клетках, моноцитах или других белых кровяных клетках, таких как CD14. В некоторых аспектах стадию отбора CD4⁺ или CD8⁺ используют для разделения CD4⁺ хелперных и CD8⁺ цитотоксических Т-клеток. Такие CD4⁺ и CD8⁺ популяции можно дополнительно сортировать на подпопуляции путем положительного или отрицательного отбора на маркеры, экспрессированные или экспрессированные с относительно более высокой степенью на одной или более субпопуляции наивных, памяти и/или эффекторных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления CD8⁺ клетки дополнительно обогащают или обедняют наивными, центральными памяти, эффекторными памяти и/или центральными стволовыми клетками памяти, например, путем положительного или отрицательного отбора на основе антигенов поверхности, связанных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления обогащение центральными Т-клетками памяти (T_{CM}) осуществляют для повышения эффективности, например, для улучшения долговременного выживания, размножения и/или приживания после введения, которое в некоторых аспектах является особенно большим в таких подпопуляциях. См. Terakura et al. (2012) Blood. 1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701. В некоторых

вариантах осуществления комбинирование T_{CM}-обогащенных T-клеток CD8⁺ и T-клеток CD4⁺ дополнительно повышает эффективность.

В вариантах осуществления T-клетки памяти присутствуют и в CD62L⁺ и в CD62L⁻ подгруппах CD8⁺ лимфоцитов периферической крови. РВМС можно обогащать или обеднять CD62L⁻CD8⁺ и/или CD62L⁺CD8⁺ фракциями, например, с использованием антител против CD8 и против CD62L.

В некоторых вариантах осуществления обогащение центральными T-клетками памяти (TCM) основано на положительной или высокой экспрессии CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD 127 на поверхности; в некоторых аспектах оно основано на отрицательном отборе клеток, экспрессирующих или сильно экспрессирующих CD45RA и/или гранзим В. В некоторых аспектах выделение CD8⁺ популяции, обогащенной T_{CM} клетками, осуществляют путем обеднения клетками, экспрессирующими CD4, CD14, CD45RA, и положительного отбора или обогащения клетками, экспрессирующими CD62L. В одном аспекте обогащение центральными T-клетками памяти (TCM) осуществляют, начиная с отрицательной фракции клеток, выбираемых на основе экспрессии CD4, которые подвергают отрицательному отбору на основе экспрессии CD14 и CD45RA, и положительному отбору на основе CD62L. Такие отборы в некоторых аспектах осуществляют одновременно, а в других аспекты осуществляют последовательно, в любом порядке. В некоторых аспектах ту же стадию отбора на основе экспрессии CD4, используемую при получении CD8⁺ популяции или субпопуляции клеток, также используют для создания CD4⁺ популяции или подпопуляция клеток таким образом, чтобы и положительную и отрицательную фракции в результате разделения на основе CD4 оставлять и использовать на последующих стадиях способов, необязательно после одной или более дополнительных стадий положительного или отрицательного отбора.

CD4⁺ T-хелперы сортируют на наивные, центральные памяти и эффекторные клетки путем идентификации популяции клеток, которые имеют антигены клеточной поверхности. CD4⁺ лимфоциты можно получать с помощью стандартных способов. В некоторых вариантах осуществления наивными T-лимфоцитами CD4⁺ являются T-клетки CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD4⁺. В некоторых вариантах осуществления центральными клетками памяти CD4⁺ являются CD62L⁺ и CD45RO⁺. В некоторых вариантах осуществления эффекторными CD4⁺ клетками являются CD62L⁻ и CD45RO⁻

В одном примере для обогащения CD4⁺ клетками путем отрицательного отбора смесь моноклональных антител обычно включает антитела против CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, и CD8. В некоторых вариантах осуществления антитело или партнер по связыванию связывают с твердым носителем или матрицей, такой как магнитный шарик или парамагнитный шарик, обеспечивая разделение клеток для положительного и/или отрицательного отбора. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки и популяции клеток разделяют или выделяют с использованием методик иммуномагнитного (или аффинномагнитного) разделения (рассмотрено в способах в Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro и In Vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks и U. Schumacher © Humana Press Inc. Totowa, NJ).

В некоторых аспектах образец или композицию клеток, подлежащих разделению, инкубируют с небольшим, намагничивающимся или реагирующим на намагничивание

материалом, таким как реагирующие на намагничивание частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные шарики (например, такие как шарики Dynalbeads или MACS). Реагирующий на намагничивание материал, например, частицы, обычно прямо или
5 непрямо связывают с партнером по связыванию, например, антителом, которое специфически связывается с молекулой, например, маркером поверхности, присутствующим на клетке, клетках или популяции клеток, которые нужно разделить, например, которые нужно подвергнуть отрицательному или положительному отбору.

В некоторых вариантах осуществления магнитная частица или шарик содержит реагирующий на намагничивание материал, связанный со специфическим связывающим
10 элементом, таким как антитело или другой партнер по связыванию. Существует множество хорошо известных реагирующих на намагничивание материалов, используемых в способах магнитного разделения. Подходящие магнитные частицы включают частицы, описанные в Molday, патент США № 4452773 и в Описании Европейского патента EP 452342 B, которые включены в настоящий документ
15 посредством ссылки. Другими примерами являются частицы коллоидного размера, такие как частицы, описанные у Owen в патенте США № 4795698 и у Liberti et al. В патенте США № 5200084.

Инкубацию обычно осуществляют в условиях, в которых антитела или партнеры по связыванию или молекулы, такие как вторичные антитела или другие реагенты,
20 которые специфически связываются с такими антителами или партнерами по связыванию, которые соединены с магнитной частицей или шариком, если присутствуют на клетках в образце, специфически связываются с молекулами клеточной поверхности.

В некоторых аспектах образец помещают в магнитное поле, и те клетки, которые имеют присоединенные к ним реагирующие на намагничивание или намагничивающиеся
25 частицы, будут притягиваться к магниту и отделяться от немеченых клеток. Для положительного отбора оставляют клетки, которые притягиваются к магниту; для отрицательного отбора оставляют клетки, которые не притягиваются (немеченые клетки). В некоторых аспектах в процессе одной и той же стадии отбора проводят комбинацию положительного и отрицательного отбора, где положительные и
30 отрицательные фракции оставляют и дополнительно обрабатывают или подвергают дополнительным стадиям разделения.

В некоторых вариантах осуществления реагирующие на намагничивание частицы покрывают первичными антителами или другими партнерами по связыванию, вторичными антителами, лектинами, ферментами или стрептавидином. В некоторых
35 вариантах осуществления магнитные частицы присоединяют к клеткам посредством покрытия первичными антителами, специфическими к одному или более маркерам. В некоторых вариантах осуществления первичными антителами или партнером по связыванию метят клетки, а не шарики, а затем добавляют магнитные частицы, покрытые вторичными антителами или другим партнером по связыванию (например,
40 стрептавидином), специфическим к данному типу клеток. В некоторых вариантах осуществления покрытые стрептавидином магнитные частицы используют в сочетании с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

В некоторых вариантах осуществления реагирующие на намагничивание частицы оставляют присоединенными к культивируемым и/или сконструированным клеткам,
45 которые впоследствии необходимо инкубировать; в некоторых аспектах частицы оставляют присоединенными к клеткам для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления намагничивающиеся или реагирующие на намагничивание частицы удаляют из клеток. Способы удаления намагничивающихся частиц из клеток известны

и включают, например, использование конкурирующих немеченых антител, намагничивающихся частиц или антител, конъюгированных с расщепляемыми линкерами, и т.д. В некоторых вариантах осуществления намагничивающиеся частицы являются биоразлагаемыми.

5 В некоторых вариантах осуществления отбор на основе аффинности осуществляют посредством сортировки магнитно активированных клеток (MACS) (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). Системы сортировки магнитно активированных клеток (MACS) способны с высокой чистотой отбирать клетки, имеющие присоединенные к ним намагниченные частицы. В некоторых вариантах осуществления MACS работает в режиме, в котором
10 частицы не мишени и мишени последовательно элюируют после приложения внешнего магнитного поля, то есть, клетки, соединенные с намагниченными частицами, удерживают на месте, тогда как неприсоединенные частицы элюируют. Затем после завершения этой первой стадии элюирования частицы, которые были захвачены в магнитном поле и элюирование которых было предотвращено, каким-то образом
15 освобождаются, так что их можно элюировать и извлекать. В некоторых вариантах осуществления клетки не-мишени метят и удаляют из гетерогенной популяции клеток.

В некоторых вариантах осуществления выделение или отделение осуществляют с использованием системы, устройства или аппарата, который выполняет одну или более из стадий способов выделения, получения, отделения, обработки, инкубации,
20 культивирования и/или получения готовой формы клеток. В некоторых аспектах систему используют для выполнения каждой из этих стадий в замкнутой или стерильной окружающей среде, например, чтобы минимизировать ошибку, обработку пользователем и/или загрязнение. В одном примере система представляет собой систему, которая описана в публикации международной заявки на выдачу патента номер WO 2009/072003
25 или US 20110003380 A1.

В некоторых вариантах осуществления система или устройство выполняет одну или более, например, все стадии выделения, обработки, конструирования и получения готовой формы в интегрированной или автономной системе и/или в автоматическом или программируемом режиме. В некоторых аспектах система или устройство содержит
30 компьютер и/или компьютерную программу, взаимодействующую с системой или устройством, которая позволяет пользователю программировать, управлять, оценивать результат и/или регулировать разные аспекты стадий обработки, выделения, конструирования и получения готовой формы.

В некоторых аспектах стадии отделения и/или другие осуществляют с использованием системы CliniMACS (Miltenyi Biotec), например, для автоматического разделения клеток на уровне клинического масштаба в замкнутой и стерильной системе. Компоненты могут включать интегрированный микрокомпьютер, блок магнитного разделения, перистальтический насос и разные запорные клапаны. В некоторых аспектах интегрированный компьютер управляет всеми компонентами инструмента и направляет
40 систему для выполнения повторяющихся методик в стандартизированной последовательности. блок магнитного разделения в некоторых аспектах содержит подвижный постоянный магнит и держатель для колонки для отбора. Перистальтический насос управляет скоростью потока по всему набору трубок и вместе с запорными клапанами обеспечивает управляемый поток буфера через систему и непрерывную
45 суспензию клеток.

в некоторых аспектах в системе CliniMACS используют связанные с антителами намагничивающиеся частицы, которые подают в стерильном непирогенном растворе. В некоторых вариантах осуществления после мечения клеток магнитными частицами

клетки промывают для удаления лишних частиц, затем мешок для получения клеток соединяют с набором трубок, которые, в свою очередь, соединяют с мешком, содержащих буфер и мешок для получения клеток. Набор трубок состоит из заранее собранных стерильных трубок, включая предколону и разделительную колонку, и предназначенных только для одного использования. После начала программы разделения система автоматически помещает образец клеток на разделительную колонку. Меченые клетки оставляют внутри колонки, тогда как немеченые клетки удаляют с помощью серии стадий промывания. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток для использования со способами, описанными в данном документе, являются немечеными и не остаются в колонке. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток для использования со способами, описанными в данном документе, являются мечеными и остаются в колонке. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток для использования со способами, описанными в данном документе, элюируют из колонки после удаления магнитного поля, и собирают в мешке для получения клеток.

В некоторых вариантах осуществления стадии отделения и/или другие осуществляют с использованием системы CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec). В некоторых аспектах систему CliniMACS Prodigy оборудуют блоком обработки клеток, который обеспечивает автоматическое промывание и фракционирование клеток путем центрифугирования. Система CliniMACS Prodigy также может содержать встроенную камеру и программное обеспечение для распознавания изображений, которое определяет оптимальную конечную точку фракционирования клеток путем распознавания макроскопических слоев продукта с исходными клетками. Например, периферическую кровь можно автоматически разделить на слои эритроцитов, белых кровяных клеток и плазму. Система CliniMACS Prodigy также может содержать интегрированную камеру культивирования клеток, которая осуществляет протоколы культивирования клеток, таких как, например, дифференциация и размножение клеток, загрузка антигена и долговременное культивирование клеток. Впускные порты могут обеспечивать стерильное удаление и пополнение среды, а клетки можно контролировать с использованием интегрированного микроскопа. См., например, Klebanoff et al. (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) *Blood.* 1:72-82, и Wang et al. (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701.

В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, описанных в данном документе, собирают и обогащают (или истощают) посредством проточной цитометрии, в которой клетки, окрашенные на множество маркеров клеточной поверхности, переносят в текучей струе. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, описанных в данном документе, собирают и обогащают (или истощают) посредством препаративной сортировки (FACS). В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, описанных в данном документе, собирают и обогащают (или истощают) посредством использования чипов микроэлектромеханических систем (MEMS) в комбинации с системой обнаружения на основе FACS (см., например, WO 2010/033140, Cho et al. (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; и Godin et al. (2008) *J Biophoton.* 1(5):355-376. В обоих случаях клетки могут быть мечены множеством маркеров, обеспечивая выделение хорошо определенных подгрупп Т-клеток с высокой чистотой.

В некоторых вариантах осуществления антитела или партнеры по связыванию метят одним или более обнаруживаемыми маркерами для облегчения разделения для положительного и/или отрицательного отбора. Например, разделение может быть основано на связывании с флуоресцентно мечеными антителами. В некоторых примерах

разделение клеток на основе связывания антител или других партнеров по связыванию, специфических к одному или более маркерам клеточной поверхности, выполняют в текучей струе, например, с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), включая чипы препаративной (FACS) и/или микроэлектромеханической систем (MEMS), например, в комбинации с системой обнаружения посредством проточной цитометрии. Такие способы предусматривают положительный и отрицательный отбор одновременно на основе множества маркеров.

В некоторых вариантах осуществления способы получения включают стадии замораживания, например, криоконсервации клеток, либо перед, либо после выделения, инкубации и/или конструирования. В некоторых вариантах осуществления на стадии замораживания и последующего оттаивания в популяции клеток удаляют гранулоциты и до некоторой степени моноциты. В некоторых вариантах осуществления клетки суспендируют в растворе для замораживания, например, после стадия промывания для удаления плазмы и тромбоцитов. В некоторых аспектах можно использовать любые из множества известных растворов и параметров замораживания. Один пример включает использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% человеческого сывороточного альбумина (HSA) или другую подходящую среду для замораживания клеток. Затем ее разбавляют 1:1 со средой, так что итоговая концентрация DMSO и HSA составляет 10% и 4%, соответственно. Затем клетки замораживают до -80°C со скоростью 1° в минуту и хранят в парообразной фазе резервуара для хранения жидкого азота.

В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют и/или культивируют перед или вместе с генной инженерией. Стадии инкубации могут включать культивирование, выращивание, стимуляцию, активацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления композиции или клетки инкубируют в присутствии условий стимулирования или стимулирующего агента. Такие условия включают условия, разработанные, чтобы индуцировать пролиферацию, размножение, активацию и/или выживание клеток в популяции, чтобы имитировать воздействие антигена и/или чтобы примировать клетки для генной инженерии, например, для введения рекомбинантного антигенного рецептора.

Условия могут включать одно или более из конкретной среды, температуры, содержания кислорода, содержания углекислого газа, времени, агентов, например, питательных веществ, аминокислот, антибиотиков, ионов и/или стимулирующих факторов, таких как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, белки слияния, рекомбинантные растворимые рецепторы и любые другие агенты, разработанные для активации клеток.

В некоторых вариантах осуществления условия или агенты стимуляции включают один или более агентов, например, лиганд, который способен активировать внутриклеточный сигнальный домен комплекса TCR. В некоторых аспектах агент включает или инициирует внутриклеточный сигнальный каскад TCR/CD3 в Т-клетке. Такие агенты могут включать антитела, таких как антитела, специфические к компоненту TCR и/или костимулирующему рецептору, например, против CD3, против CD28, например, связанные с твердым носителем, таким как шарик, и/или один или более цитокины. Необязательно, способ размножения может дополнительно включать стадию добавления в культуральную среду антитела против CD3 и/или против CD28 (например, в концентрации по меньшей мере приблизительно 0,5 пг/мл). В некоторых вариантах осуществления стимулирующие агенты включают IL-2 и/или IL-15, например, концентрация IL-2 составляет по меньшей мере приблизительно 10 единиц/мл.

В некоторых аспектах инкубацию осуществляют в соответствии с таких методиками,

как методики, описанные в патенте США № 60401 77 Riddell et al. Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood. 1:72-82, и/или Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701.

5 В некоторых вариантах осуществления Т-клетки размножают путем добавления в композицию питающих клеток, таких как непрофилирующие моноядерные клетки периферической крови (РВМС) (например, таким образом, чтобы полученная популяция клеток содержала по меньшей мере приблизительно 5, 10, 20 или 40 или более питающих клеток РВМС для каждого Т-лимфоцита в первоначальной популяции, подлежащей размножению); и инкубации культуры (например, в течение времени, достаточного для 10 размножения ряда Т-клеток). В некоторых аспектах непрофилирующие питающие клетки могут включать гамма-облученные питающие клетки РВМС. В некоторых вариантах осуществления РВМС облучают гамма излучением в диапазоне от приблизительно 3000 до 3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых аспектах питающие клетки добавляют в культуральную среду перед добавлением 15 популяции Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления условия стимуляции включают температуру, подходящую для роста человеческих Т-лимфоцитов, например, по меньшей мере приблизительно 25 градусов по Цельсию, обычно по меньшей мере приблизительно 30 20 градусов и обычно при или приблизительно при 37 градусов по Цельсию.

Необязательно, инкубация может дополнительно включать добавление в качестве питающих клеток непрофилирующих EBV-трансформированных лимфобластоидных клеток (LCL). LCL можно облучать гамма излучением в диапазоне от приблизительно 6000 до 10000 рад. В некоторых аспектах питающие клетки LCL предоставляют в любом 25 подходящем количестве, например, в соотношении питающих клеток LCL и первичных Т-лимфоцитов по меньшей мере приблизительно 10:1.

В вариантах осуществления антиген-специфические Т-клетки, такие как антиген-специфические Т-клетки CD4+ и/или CD8+, получают путем стимуляции антигеном наивных или антиген-специфических Т-лимфоцитов. Например, антиген-специфические линии или клоны Т-клеток можно создавать для цитомегавирусных антигенов путем 30 выделения Т-клеток у инфицированных субъектов и стимуляции клеток *in vitro* тем же антигеном.

В. Устройство и Изделия Изготовителей

В некоторых вариантах осуществления также предоставлено устройство или готовое изделие. В некоторых вариантах осуществления предоставлено биореакторное 35 устройство и первая неподвижная фаза для хроматографии. биореактор подходит для размножения клеток, а неподвижная фаза подходит для разделения клеток и удаления реагентов. Первая неподвижная фаза представляет собой матрицу для гель-фильтрации и/или матрицу для аффинной хроматографии, при этом матрица для гель-фильтрации и/или аффинной хроматографии содержит аффинный реагент, при этом аффинный 40 реагент содержит участок Z1 связывания, специфически связывающийся с партнером С1 по связыванию, содержащимся в первом агенте, и/или аффинный реагент содержит участок Z2 связывания, специфически связывающийся с партнером С2 по связыванию, содержащимся во втором агенте. Первая неподвижная фаза таким образом подходит для иммобилизации на ней первого агента и/или второго агента, первого партнера С1 45 по связыванию и/или свободного второго партнера С2 по связыванию. Кроме того, биореактор и неподвижную фазу соединяют с возможностью прохождения текучей среды. Данное устройство можно использовать для серийного размножения, как объяснялось выше, и можно интегрировать в известные системы размножения клеток,

такие как система размножения клеток Quantum®) или система W25 размножения клеток Xuri.

В данном устройстве первая неподвижная фаза либо содержится в хроматографической колонке, либо представляет собой плоскостную неподвижную фазу. Устройство может дополнительно содержать вторую неподвижную фазу, которая соединена с возможностью прохождения текучей среды с первой неподвижной фазой. Вторичной неподвижной фазой может быть матрица для гель-фильтрации и/или матрица для аффинной хроматографии, при этом матрица для гель-фильтрации и/или аффинной хроматографии содержит аффинный реагент. Данный аффинный реагент может содержать партнер D по связыванию, который (специфически) связывается с участком Z1 связывания реагента мультимеризации и/или олигомерного реагента в виде частиц, и таким образом подходит для иммобилизации реагента мультимеризации и/или олигомерного реагента в виде частиц на неподвижной фазе.

Кроме того, изобретение направлено на устройство для очистки (например, отбора) и культивирования, такого как стимуляция или размножение, композиции клеток, причем устройство содержит по меньшей мере одно биореакторное устройство и первую неподвижную фазу и/или вторую неподвижную фазу для хроматографии, как определено выше.

Устройство может дополнительно содержать множество биореакторных устройств и неподвижную фазу, последовательно соединенных с возможностью прохождения текучей среды.

Устройство может содержать впуск для образцов, соединенный с возможностью прохождения текучей среды с биореактором биореакторного устройства и неподвижной фазой для хроматографии. Устройство также может содержать выпуск для образцов для очищенных и размноженных клеток-мишеней, причем выпуск для образцов соединен с возможностью прохождения текучей среды с неподвижной фазой последнего из по меньшей мере одного биореакторного устройства и неподвижной фазы для хроматографии.

В некоторых вариантах осуществления устройство может быть разработано в виде функционально замкнутой системы.

С. Иллюстративные Особенности Культивируемых Клеток

В некоторых вариантах осуществления культивируемые клетки-мишени (например, культивируемые Т-клетки), которые могут включать культивируемые клетки, созданные или полученные согласно способам, представленным в данном документе, демонстрируют одну или более указанных фенотипических и/или функциональных особенностей, основанных или связанных с их способностью к пролиферации, экспрессией маркера поверхности, состоянием дифференциации, состоянием активации и/или метаболическим профилем. В некоторых вариантах осуществления культивирование клеток-мишеней (например, культивирование Т-клеток) согласно любому из представленных способов приводит к изменению параметра, связанного с функцией (например, увеличением или уменьшением функциональной активности) или фенотипом (например, более высокой или более низкой экспрессией маркера или маркеров) клеток по сравнению с подобной или соответствующей функцией или фенотипом клеток в композиции перед инкубацией согласно способам, представленным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления культивируемые Т-клетки демонстрируют изменение в отношении параметра из числа способности к размножению и/или пролиферации, распределения или отношения CD4+/Т-клеток CD8+, экспрессии маркера поверхности, функциональной активности или метаболического профиля.

В некоторых вариантах осуществления изменение параметра при измерении у культивируемых Т-клеток сравнивают или сопоставляют с таким же или аналогичным параметром при измерении эталонной композиции или препарата Т-клеток. Обычно, Т-клетки в эталонной композиции или препарате Т-клеток включают или получены из той же или по существу той же композиции Т-клеток перед инкубацией с обратимо связанным агентом (например, мультимеризированным агентом, например, перед инкубацией со стимулирующим агентом, обратимо связанным с олигомерным мутеином стрептавидина), за исключением того, что такие клетки не подвергали инкубации или не подвергали другой инкубации. В некоторых вариантах осуществления эталонный препарат Т-клеток подвергают инкубации с использованием по существу такого же протокола или условий (например, типа стимулирующих агентов или агента, формата стимулирующих агентов или агента, по существу одинаковых количеств исходных клеток, промывок, наличия или отсутствия дополнительных реагентов, синхронизации инкубации, температуры инкубации) за исключением того, что по меньшей мере один аспект, а в некоторых случаях только один аспект такой инкубации в эталонном препарате Т-клеток отличается от инкубации с получением культивируемых Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления эталонной композицией или препаратом Т-клеток является композиция, содержащая Т-клетки перед инкубацией с обратимо связанным агентом (например, мультимеризированным агентом, например, перед инкубацией со стимулирующим агентом, обратимо связанным с олигомерным мутеином стрептавидина).

В некоторых вариантах осуществления культивируемые Т-клетки создают путем инкубации с обратимо связанным агентом (например, мультимеризированным агентом, например, инкубации со стимулирующим агентом, обратимо связанным с олигомерным мутеином стрептавидина) в течение менее 28 дней, 21 дня, 14 дней, 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней, 4 дней, 3 дней, 2 дней или 1 дня и/или когда связь такого агента с одной или более молекулами на клетке нарушается (например, в присутствии конкурентного реагента, например, биотина или аналога биотина), например, нарушается за 28 дней, 21 день, 14 дней, 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней, 4 дня, 3 дня, 2 дня или 1 день с начала инкубации с таким агентом. Например, в некоторых аспектах культивируемые Т-клетки создают или получают после инкубации с обратимо связанным агентом (например, мультимеризированным агентом, например, после инкубации со стимулирующим агентом, обратимо связанным с олигомерным мутеином стрептавидина), как описано в данном документе, при этом инкубацию прекращают и/или нарушают в течение 28 дней, 21 дней, 14 дней, 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней после начала такой инкубации (например, в течение или приблизительно 4, 3, 2 или 1 дня или менее), и/или когда конкурирующий агент (например, биотин), который диссоциирует обратимо связанный агент из клеток, добавляют к инкубированным клеткам в течение 28 дней, 21 дня, 14 дней, 10 дней, 9 дней, 8 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней после начала такой инкубации (например, в течение или приблизительно 4, 3, 2 или 1 дня или менее). В некоторых вариантах осуществления эталонный препарат Т-клеток создают или получают после инкубации с одинаковым или по существу одинаковым обратимо связанным агентом (например, мультимеризированным агентом, например, после инкубации со стимулирующим агентом, обратимо связанным с олигомерным мутеином стрептавидина), но, где инкубацию проводят в течение более 5 дней, не прекращают и/или не нарушают для ослабления или прекращения сигнала, индуцированного или модулированного в клетке, и/или где препарат Т-клеток получают без добавления конкурирующего агента

(например, биотина или аналога биотина), который диссоциирует реагент из клеток.

В некоторых вариантах осуществления культивируемые Т-клетки создают путем инкубации с обратимо связанным агентом (например, мультимеризированным агентом, например, инкубации со стимулирующим агентом, обратимо связанным с олигомерным мутеином стрептавидина), причем рецептор-связывающим агентом (например, стимулирующим агентом) является агент, который не связывается с CD28 и/или не вызывает передачу сигналов, т.е. Не является антителом против CD28 или его фрагментом. Например, в некоторых вариантах осуществления культивируемые Т-клетки получают или создают после инкубации с обратимо связанным реагентом, в которой один или более стимулирующих агентов обратимо связывают с мутеином стрептавидина, причем по меньшей мере один стимулирующий агент является специфическим к CD3 (например, антителом против CD3 или его фрагментом), а второй стимулирующий агент может быть специфическим к одному или более из CD90, CD95, CD137, CD154, ICOS, LAT, CD27, OX40 или HVEM (например, антителом против CD90, антителом против CD95, антителом против CD137 и антителом против CD154, антителом против ICOS, антителом против LAT, антителом против CD27, антителом против OX40 или антителом против HVEM, соответственно, или их антигенсвязывающими фрагментами). В некоторых вариантах осуществления эталонный препарат Т-клеток представляет собой Т клеточную культуру, созданную или полученную после инкубации с обратимо связанным агентом (например, мультимеризированным агентом, например, после инкубации со стимулирующим агентом, обратимо связанным с олигомерным мутеином стрептавидина), но где реагент содержит агент, который специфически связывает CD28 и/или вызывает или модулирует передачу сигналов CD28. Например, в некоторых вариантах осуществления эталонный препарат Т-клеток создают или получают после инкубации композиции Т-клеток с Dynabeads® против CD3/против CD28, шариками ExPact® против CD3/против CD28 или другим стимулирующим агентом против CD3/против CD28. В некоторых вариантах осуществления таким другим стимулирующим агентом против CD3/против CD28 является агент, в котором реагенты в виде антител связывают с носителем (например, твердым носителем), например, шариком, частицами, магнитными частицами или шариком, наночастицами или микросферой. В некоторых вариантах осуществления культивируемые Т-клетки получают путем инкубации с обратимо связанным агентом (например, мультимеризированным агентом, например, инкубации со стимулирующим агентом, обратимо связанным с олигомерным мутеином стрептавидина), который является растворимым, т.е. Не связанным с носителем (например, твердым носителем).

Например, в некоторых вариантах осуществления представлены культивируемые Т-клетки, например, полученные согласно любому из способов, представленных в данном документе, при этом культивируемые Т-клетки создают или получают после инкубации с обратимо связанным агентом, как описано в данном документе (например, мультимеризированным агентом, например, после инкубации со стимулирующим агентом, обратимо связанным с олигомерным мутеином стрептавидина), причем культивируемые Т-клетки отличаются улучшенной способностью к размножению и/или пролиферации по сравнению с эталонной композицией или препаратом Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления улучшенная способность к размножению и/или пролиферации включает в себя увеличение количества или процентного значения Т-клеток CD3+, Т-клеток CD4+ и/или Т-клеток CD8+ в культивируемых Т-клетках по меньшей мере приблизительно в 2 раза (например, любое из по меньшей мере приблизительно в 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более) по

сравнению с количеством или процентным значением Т-клеток CD3+, Т-клеток CD4+ и/или Т-клеток CD8+, соответственно, в эталонной композиции или препарате Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления представлены культивируемые Т-клетки, например, полученные согласно любому из способов, представленных в данном документе, при этом культивируемые Т-клетки создают или получают после инкубации с обратимо связанным агентом, как описано в данном документе (например, мультимеризованным агентом, например, после инкубации со стимулирующим агентом, обратимо связанным с олигомерным мутеином стрептавидина), причем культивируемые Т-клетки отличаются улучшенной способностью к размножению и/или пролиферации Т-клеток CD3+ по сравнению с эталонной Т-клеточной культурой. В некоторых вариантах осуществления улучшенная способность к размножению и/или пролиферации включает в себя увеличение количества или процентного значения Т-клеток CD3+ в культивируемых Т-клетках по меньшей мере приблизительно в 2 раза (например, любое из по меньшей мере приблизительно в 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более) по сравнению с количеством или процентным значением Т-клеток CD3+ в эталонной композиции или препарате Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления представлены культивируемые Т-клетки, например, полученные согласно любому из способов, представленных в данном документе, при этом культивируемые Т-клетки создают или получают после инкубации с обратимо связанным агентом, как описано в данном документе (например, мультимеризованным агентом, например, после инкубации со стимулирующим агентом, обратимо связанным с олигомерным мутеином стрептавидина), причем культивируемые Т-клетки отличаются улучшенной способностью к размножению и/или пролиферации Т-клеток CD4+ по сравнению с эталонной композицией или препаратом Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления улучшенная способность к размножению и/или пролиферации включает в себя увеличение количества или процентного значения Т-клеток CD4+ в культивируемых Т-клетках по меньшей мере приблизительно в 2 раза (например, любое из по меньшей мере приблизительно в 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более) по сравнению с количеством или процентным значением Т-клеток CD4+ в эталонной композиции или препарате Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления представлены культивируемые Т-клетки, например, полученные согласно любому из способов, представленных в данном документе, при этом культивируемые Т-клетки создают или получают после инкубации с обратимо связанным агентом, как описано в данном документе (например, мультимеризованным агентом, например, после инкубации со стимулирующим агентом, обратимо связанным с олигомерным мутеином стрептавидина), причем культивируемые Т-клетки отличаются улучшенной способностью к размножению и/или пролиферации Т-клеток CD8+ по сравнению с эталонной композицией или препаратом Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления улучшенная способность к размножению и/или пролиферации включает в себя увеличение количества или процентного значения Т-клеток CD8+ в культивируемых Т-клетках по меньшей мере приблизительно в 2 раза (например, любое из по меньшей мере приблизительно в 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более) по сравнению с количеством или процентным значением Т-клеток CD8+ в эталонной композиции или препарате Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления представлены культивируемые Т-клетки, например, полученные согласно любому из способов, представленных в данном

документе, при этом культивируемые Т-клетки создают или получают после инкубации с обратимо связанным агентом, как описано в данном документе (например, мультимеризованным агентом, например, после инкубации со стимулирующим агентом, обратимо связанным с олигомерным мутеином стрептавидина), причем

5 культивируемые Т-клетки отличаются измененным распределением Т-клеток CD8+/CD4+ или нормализованным распределением Т-клеток, например, измененным соотношением Т-клеток CD8+/CD4+ или нормализованным соотношением Т-клеток CD8+/CD4+, по сравнению с эталонной композицией или препаратом Т-клеток. Соотношение CD8+/CD4+ или нормализованное соотношение можно увеличить или

10 уменьшить. В некоторых вариантах осуществления измененное соотношение Т-клеток CD8+/CD4+ обусловлено увеличением количества или процентного значения или нормализованного количества или процентного значения Т-клеток CD8+ в культивируемых Т-клетках относительно или по сравнению с количеством или процентным значением или нормализованным количеством или процентным значением

15 в эталонной композиции или препарате. В некоторых вариантах осуществления количество Т-клеток CD8+ в культивируемых Т-клетках увеличено по меньшей мере приблизительно в 2 раза (например, любое из по меньшей мере приблизительно в 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более) по сравнению с количеством или процентным значением Т-клеток CD8+ или нормализованным количеством или

20 процентным значением Т-клеток CD8+ в эталонной композиции или препарате Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления соотношение Т-клеток CD8+/CD4+ или нормализованное соотношение CD8+/CD4+ увеличено по меньшей мере приблизительно в 2 раза (например, любое из по меньшей мере приблизительно в 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более) по сравнению с соотношением Т-клеток CD8+ /CD4+ или нормализованным соотношением CD8+/CD4+ в эталонной композиции или

25 препарате Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления количество, процентное значение или соотношение культивируемых Т-клеток или в композиции или препарате нормализовано по отношению к количеству, процентному значению или соотношению в исходной композиции, содержащей Т-клетки, перед инкубацией.

30 В некоторых вариантах осуществления представлены культивируемые Т-клетки, полученные согласно любому из способов, представленных в данном документе, при этом культивируемые Т-клетки создают или получают после инкубации с обратимо связанным агентом, как описано в данном документе (например, мультимеризованным агентом, например, после инкубации со стимулирующим

35 агентом, обратимо связанным с олигомерным мутеином стрептавидина), и, при этом культивируемые Т-клетки отличаются измененным профилем экспрессии маркера поверхности по сравнению с эталонной композицией или препаратом Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления измененный профиль экспрессии маркера поверхности обусловлен изменением количества или процентного значения одной или

40 более подгрупп Т-клеток, которые являются положительными, отрицательными или низкими в отношении одного или более маркеров поверхности, выбираемых из CD45RA, CD45RO, CD62L, CD69, CCR7, CD27, CD28, CD122, t-bet, IL-7R α , CD95, IL-2R β , CXCR3, LFA-1, KLRG1. В некоторых вариантах осуществления количество или процентное значение подмножества Т-клеток в культивируемых Т-клетках увеличено по меньшей

45 мере приблизительно в 2 раза (например, любое из по меньшей мере приблизительно в 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более) по сравнению с количеством или процентным значением подмножества Т-клеток в эталонной композиции или препарате.

В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток в культивируемых Т-клетках (например, подмножество Т-клеток, которое увеличено в культивируемых Т-клетках по сравнению с эталонной композицией или препаратом) демонстрирует состояние сниженной или уменьшенной дифференциации или активации по сравнению с эталонной композицией или препаратом Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток не является или не содержит фенотип эффекторных Т-клеток (T_E) или эффекторных Т-клеток памяти (T_{EM}). В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток содержит поверхностный фенотип, который представляет собой одно или более из $CD62L^+$, $CCR7^+$, $CD27^+$, $CD28^+$ или $KLRG1^{low/}$. В некоторых вариантах осуществления такое подмножество Т-клеток в культивируемых Т-клетках увеличено по меньшей мере приблизительно в 2 раза (например, любое из по меньшей мере приблизительно в 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более) по сравнению с количеством или процентным значением подмножества Т-клеток в эталонной композиции или культуре Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток в культивируемых Т-клетках (например, подмножество Т-клеток, которое увеличено в культивируемых Т-клетках по сравнению с эталонной композицией или препаратом) является положительным для $CD62L$ и/или $IL-7R\alpha$ ($CD127$) и/или отрицательным или низким для $t-bet$. В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток является положительным для $CD45RA$ и/или отрицательным или низким для $CD45RO$. В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток является положительным для одного или более из $CCR7$, $CD45RA$, $CD62L$, $CD27$, $CD28$, $IL-7R\alpha$ ($CD127$), $CD95$, $IL-2R\beta$, $CXCR3$ и $LFA-1$ и/или отрицательным для $CD45RO$. В некоторых вариантах осуществления такое подмножество Т-клеток в культивируемых Т-клетках увеличено по меньшей мере приблизительно в 2 раза (например, любое из по меньшей мере приблизительно в 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более) по сравнению с количеством или процентным значением подмножества Т-клеток в эталонной композиции или культуре Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток в культивируемых Т-клетках (например, подмножество Т-клеток, которое увеличено в культивируемых Т-клетках по сравнению с эталонной композицией или препаратом) составляет или содержит клетки, которые являются положительными для $CD62L$ ($CD62L^+$). В некоторых вариантах осуществления такое подмножество Т-клеток в культивируемых Т-клетках увеличено по меньшей мере приблизительно в 2 раза (например, любое из по меньшей мере приблизительно в 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более) по сравнению с количеством или процентным значением подмножества Т-клеток в эталонной композиции или культуре Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток в культивируемых Т-клетках (например, подмножество Т-клеток, которое увеличено в культивируемых Т-клетках по сравнению с эталонной композицией или препаратом) составляет или содержит клетки, которые представляют собой $CD62L^+$ и а) любое одно или более из $CD45RA^{low/+}$, $CD45RO^{low/+}$, $CCR7^+$ и $CD27^+$ и б) любое одно или более из $t-bet^{low}$, $IL-7R\alpha^+$ ($CD127^+$), $CD95^+$, $IL-2R\beta^+$, $CXCR3^+$ и $LFA-1^+$. В некоторых вариантах осуществления подмножеством Т-клеток также может быть $CD3^+$, $CD4^+$ или $CD8^+$. В некоторых вариантах осуществления такое подмножество Т-клеток в культивируемых Т-клетках увеличено по меньшей мере приблизительно в 2 раза (например, любое из по меньшей мере приблизительно в 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз

или более) по сравнению с количеством или процентным значением подмножества Т-клеток в эталонной композиции или культуре Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток, такое как подмножество Т-клеток CD62L⁺, в культивируемых Т-клетках представляют собой или содержат или имеют общие фенотипические характеристики с Т-клетками памяти или их конкретными подгруппами, такими как долгоживущие Т-клетки памяти. В некоторых вариантах осуществления такими Т-клетками памяти являются центральные Т-клетки памяти (T_{cm}) или стволовые Т-клетки памяти (T_{scm}). В некоторых вариантах осуществления Т-клетками памяти являются клетки T_{scm}. Клетки T_{scm} могут быть описаны, как имеющие одно или более фенотипических отличий или функциональных особенностей по сравнению с другими подгруппами Т-клеток памяти или по сравнению с наивными Т-клетками, например, менее дифференцированными или более наивными (см., например, Ahlers и Belyakov (2010) Blood. 115:1678); Cieri et al. (2015) Blood. 125: 2865; Flynn et al. (2014) Clinical & Translational Immunology, 3, e20; Gattinoni et al. (2012) Nat. Med. 17:1290-1297; Gattinoni et al. (2012) Nat. Reviews, 12:671; Li et al. (2013) PLOS ONE, 8:e67401; и опубликованную заявку РСТ № WO 2014/039044). В некоторых случаях полагают, что клетками T_{scm} являются только Т-клетки памяти, способные создавать эффекторные Т-клетки и все три подгруппы Т-клеток памяти (T_{scm}, T_{cm}, и T_{em}). В некоторых аспектах клетки T_{scm} имеют самый высокий ответ в виде выживания и пролиферации на антигенные или гомеостатические стимулы всех подгрупп Т-клеток памяти и наименьшее истощение в отсутствии когнатного антигена. В некоторых вариантах осуществления менее дифференцированные клетки T_{scm} могут демонстрировать большее размножение, долговременную жизнеспособность и уничтожение клеток-мишеней после адоптивного переноса, чем другие Т-клетки памяти, и таким образом могут быть способны опосредовать более эффективное лечение с меньшим количеством переносимых клеток, чем было бы возможно либо для T_{cm}, либо T_{em} клеток.

В некоторых аспектах примеры фенотипических или функциональных особенностей, о которых сообщалось или было известно для клеток T_{scm}, включают, например, что такими клетками а) являются CD45RO⁻, CCR7⁺, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD27⁺, CD28⁺, IL-7Rα⁺, CD95⁺, IL-2Rβ⁺, CXCR3⁺ и LFA-1⁺; б) являются CD45RA⁺, CCR7⁺, CD62L⁺ и CD95⁺; в) являются CD45RA⁺, CD45RO⁺, CCR7⁺, CD62L⁺, CD27⁺, CD28⁺, CD95⁺ и IL-2Rβ⁺; д) являются CD45RO⁻, CD45RA⁺, CCR7⁺, CD62L⁺, CD27⁺, CD28⁺, CD127⁺ и CD95⁺; е) являются CD45RA⁺, CD44^{+/-}, CD62L⁺, CD127⁺, IL-2Rβ⁺, CD28⁺, CD43⁻, KLRG1⁻, Перфорин⁻ и ГранзимВ⁻; ф) экспрессируют высокие уровни CCR7, CD62L, CD27 и CD28, промежуточные уровни CD95 и IL-2Rβ, низкие уровни CD45RA и не экспрессируют CD45RO или KLRG-1; или г) экспрессируют высокие уровни CD62L, низкие уровни CD44 и t-bet и являются Sca-1⁺; и/или имеют промежуточную способность выработки IL-2, низкую способность выработки IFNγ, низкую цитотоксичность и высокую способность к самообновлению.

В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток в культивируемых Т-клетках (например, подмножество Т-клеток, которое увеличено в культивируемых Т-клетках по сравнению с эталонной композицией или препаратом) составляет или содержит Т-клетки памяти, такие как долгоживущие Т-клетки памяти. В некоторых вариантах осуществления Т-клетками памяти являются центральные Т-клетки памяти (T_{cm}). В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток имеет

фенотипическую характеристику CD45RA⁻, CD45RO^{low/+}, CCR7⁺, CD62L⁺, CD27⁺, CD28⁺, CD95⁺ CD122⁺ и/или KLGR1^{low}. В некоторых вариантах осуществления такое подмножество Т-клеток в культивируемых Т-клетках увеличено по меньшей мере приблизительно в 2 раза (например, любое из по меньшей мере приблизительно в 3

5

раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более) по сравнению с количеством или процентным значением подмножества Т-клеток в эталонной композиции или культуре Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетками памяти являются стволовые центральные Т-клетки памяти (Tscm). В некоторых вариантах осуществления

10

подмножество Т-клеток имеет фенотипическую характеристику CD45RA^{low/+}, CD45RO^{low/+}, CCR7⁺, CD62L⁺, CD27⁺, CD28⁺, CD95⁺, CD122⁺ и/или KLGR1⁻. В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток имеет фенотипическую

15

характеристику CD45RA^{low/+}, CD45RO⁻, CCR7⁺, CD62L⁺, CD27⁺, CD28⁺, CD95⁺, CD122⁺ и/или KLGR1⁻. В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток имеет фенотипическую характеристику CD45RO⁻, CCR7⁺, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD27⁺, CD28⁺, IL-7Rα⁺, CD95⁺, IL-2Rβ⁺, CXCR3⁺ и/или LFA-1⁺. В некоторых вариантах осуществления

20

подмножество Т-клеток имеет фенотипическую характеристику CD45RA⁺, CCR7⁺, CD62L⁺ и/или CD95⁺. В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток имеет фенотипическую характеристику CD45RA⁺, CD45RO⁺, CCR7⁺, CD62L⁺, CD27⁺, CD28⁺, CD95⁺ и/или IL-2Rβ⁺. В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-

25

клеток имеет фенотипическую характеристику CD45RO⁻, CD45RA⁺, CCR7⁺, CD62L⁺, CD27⁺, CD28⁺, CD127⁺ и/или CD95⁺. В некоторых вариантах осуществления

30

подмножество Т-клеток имеет фенотипическую характеристику CD45RA⁺, CD44^{+/-}, CD62L⁺, CD127⁺, IL-2Rβ⁺, CD28⁺, CD43⁻, KLRG1⁻, Перфорин⁻ и/или ГранзимВ⁻. В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток экспрессирует высокие уровни CCR7, CD62L, CD27 и/или CD28, промежуточные уровни CD95 и/или IL-2Rβ, низкие уровни CD45RA и/или не экспрессирует CD45RO и/или KLRG-1. В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток экспрессирует высокие уровни CD62L,

35

низкие уровни CD44 и t-bet и/или представляет собой Sca-1⁺. В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток имеет фенотипическую характеристику с промежуточной способностью выработки IL-2, низкой способностью выработки IFNγ, низкой цитотоксичностью и/или высокой способностью к самообновлению. В некоторых вариантах осуществления такое подмножество Т-клеток в культивируемых Т-клетках

40

увеличено по меньшей мере приблизительно в 2 раза (например, любое из по меньшей мере приблизительно в 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более) по сравнению с количеством или процентным значением подмножества Т-клеток в эталонной композиции или культуре Т-клеток.

45

В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток, например, любое описанное выше подмножество Т-клеток, присутствует с большим процентным значением от общего числа Т-клеток в культивируемых Т-клетках или большим количеством от общего числа Т-клеток в культивируемых Т-клетках по сравнению с эталонной композицией или препаратом Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления процентное значение подмножества Т-клеток в культивируемых Т-

клетках в виде процентного значения от общего числа Т-клеток или общего числа клеток в культуре составляет по меньшей мере 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более. В некоторых вариантах осуществления процентное значение подмножества Т-клеток в культивируемых клетках, например, любого описанного выше подмножества Т-клеток, больше, например, больше по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз или более, чем соответствующее процентное значение подмножества клеток в композиции Т-клеток, выделенных или обогащенных прямо у субъекта-человека на основании поверхностной экспрессии одного из маркеров, содержащих фенотип, но без инкубации или культивирования. В некоторых вариантах осуществления общее количество, относительное количество или нормализованное количество подмножества Т-клеток в культивируемых клетках, например, любое описанное выше подмножество Т-клеток, больше, например, больше по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз или более, чем количество, относительное количество или нормализованное количество подмножества Т-клеток в эталонной композиции или препарате Т-клеток, например, любой описанной выше эталонной композиции или препарате Т-клеток, например, композиции Т-клеток перед инкубацией с обратимо связанным агентом (например, мультимеризированным агентом, например, перед инкубацией со стимулирующим агентом, обратимо связанным с олигомерным мутеином стрептавидина) согласно любому из способов, представленных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления количество Т-клеток, соответствующих подмножеству Т-клеток, присутствующих в Т клеточной культуре, составляет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 1×10^6 клеток, 2×10^6 клеток, 3×10^6 клеток, 4×10^6 клеток, 5×10^6 клеток или более.

В некоторых вариантах осуществления подмножеством Т-клеток является CD62L+ и/или IL-7R α + (CD127+), а процентное значение подмножества CD62L+ и/или IL-7R α + (CD127+) в культивируемых Т-клетках в виде процентного значения от общего числа Т-клеток или общего числа клеток в культуре составляет по меньшей мере 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более. В некоторых вариантах осуществления подмножеством Т-клеток является CD45RA-, CD45RO^{low/+} и/или KLRG1^{low}, а процентное значение подмножества CD45RA-, CD45RO^{low/+} и/или KLRG1^{low} в культивируемых Т-клетках в виде процентного значения от общего числа Т-клеток или общего числа клеток в культуре составляет по меньшей мере 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более. В некоторых вариантах осуществления подмножеством Т-клеток является CD45RA^{low/+}, CD45RO^{low/+} и/или KLRG1⁻, а процентное значение подмножества CD45RA^{low/+}, CD45RO^{low/+} и/или KLRG1⁻ в культивируемых Т-клетках в виде процентного значения от общего числа Т-клеток или общего числа клеток в культуре составляет по меньшей мере 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более.

В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток составляет или содержит клетки Т_{см}. В некоторых вариантах осуществления процентное значение подмножества Т_{см} в культивируемых Т-клетках в виде процентного значения от общего числа Т-клеток или общего числа клеток в культуре составляет по меньшей мере 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более.

В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток составляет или

содержит клетки Tscm. В некоторых вариантах осуществления процентное значение подмножества Tscm в культивируемых Т-клетках в виде процентного значения от общего числа Т-клеток или общего числа клеток в культуре составляет по меньшей мере 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более.

5 В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток, таких как Т-клетки CD62L+, имеют или демонстрируют а) низкий уровень эксцизионных колец при реаранжировке TCR (TREC); и/или б) экспрессируют маркер пролиферации (например, Ki-67); и/или в) демонстрируют способность к пролиферации в присутствии стимулирующего агента; и/или д) демонстрируют способность к выработке цитокина, 10 выбираемого из между IFN-гамма, TNF и IL-2 в присутствии стимулирующего агента; и/или е) являются устойчивыми к истощению в отсутствие стимулирующего агента; и/или ф) способны создавать клетки Tscm, Tcm, Tem и Teff; и/или г) имеют низкую цитотоксичность; и/или h) могут создавать такой же или больший ответ после адоптивного переноса меньшего количества клеток чем с клетками Tcm или Tem. В 15 некоторых вариантах осуществления стимулирующий агент представляет собой антиген, гомеостатический цитокин (например, IL-15 или IL-17), или представляет собой агент, который способен инициировать связанный с комплексом TCR/CD3 сигнал в Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления способность вырабатывать цитокин включает низкую способность вырабатывать IFN γ и/или промежуточную способность 20 вырабатывать IL-2.

В некоторых вариантах осуществления представлены культивируемые Т-клетки, например, полученные согласно любому из способов, представленных в данном документе, при этом культивируемые Т-клетки создают или получают после инкубации, как описано в данном документе, и, при этом культивируемые Т-клетки отличаются 25 модифицированным профилем функциональной активности по сравнению с эталонной композицией или препаратом Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления культивируемые Т-клетки или конкретное подмножество Т-клеток, присутствующих в культуре, демонстрирует измененный профиль функциональной активности по сравнению с эталонной композицией или препаратом или по сравнению с 30 подмножеством Т-клеток в эталонной композиции или препарате, например, функциональную активность, которая изменена (например, увеличена или уменьшена) по меньшей мере в 1,5 раза, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз, в 10 раз. В некоторых вариантах осуществления функциональную активность выбирают из одного или более из а) низкого уровня эксцизионных колец при 35 реаранжировке TCR (TREC); и/или б) экспрессии маркера пролиферации (например, Ki-67); и/или в) способности к пролиферации в присутствии стимулирующего агента; и/или д) способности к выработке цитокина, выбираемого из IFN-гамма, TNF и IL-2 в присутствии стимулирующего агента; и/или е) устойчивости к истощению в отсутствие стимулирующего агента; и/или ф) способности создавать клетки Tscm, Tcm, Tem и Teff; 40 и/или г) низкой цитотоксичности. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий агент представляет собой антиген, гомеостатический цитокин (например, IL-15 или IL-17) или представляет собой агент, который способен инициировать связанный с комплексом TCR/CD3 сигнал в Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления способность вырабатывать цитокин включает низкую 45 способность вырабатывать IFN γ и/или промежуточную способность вырабатывать IL-2. В некоторых вариантах осуществления подмножество Т-клеток содержит Т-клетки памяти, такие как долгоживущие Т-клетки памяти, в культивируемых Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления Т-клетками памяти являются клетки Tscm.

В некоторых вариантах осуществления культивируемые Т-клетки или конкретное подмножество Т-клеток, присутствующих в культуре, могут создавать такой же или больший ответ после адоптивного переноса меньшего количества клеток, чем можно обеспечивать с помощью эталонной композиции или препарата или с помощью подмножества Т-клеток в эталонной композиции или препарате. В некоторых вариантах осуществления такой ответ достигается с помощью меньшего количества клеток по меньшей мере приблизительно в 2 раза (например, любого из по меньшей мере приблизительно в 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более). В некоторых вариантах осуществления ответ увеличивается или становится больше по меньшей мере приблизительно в 2 раза (например, любое из по меньшей мере приблизительно в 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз или более).

В некоторых вариантах осуществления процентное значение подмножества Т-клеток в культивируемых клетках, например, любого описанного выше подмножества Т-клеток, больше, например, больше по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз или более, чем соответствующее подмножество клеток в препарате Т-клеток, которые инкубировали в присутствии ингибитора GSK-R. В некоторых вариантах осуществления композиция культивируемых Т-клеток не содержит ингибитор GSK-R.

В некоторых вариантах осуществления процентное значение подмножества Т-клеток в культивируемых клетках, например, любого описанного выше подмножества Т-клеток, больше, например, больше по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз или более, чем соответствующее подмножество клеток, которые инкубировали в присутствии рекомбинантного гомеостатического цитокина, необязательно IL-7 или IL-15. В некоторых вариантах осуществления композиция культивируемых Т-клеток не содержит рекомбинантного (например, экзогенного) цитокина IL-7 или рекомбинантного (например, экзогенного) цитокина IL-15.

В некоторых вариантах осуществления композицию культивируемых Т-клеток получали или создавали согласно любому из способов, представленных в данном документе, в которых к Т-клеткам добавляли вещество, такое как конкурентный агент, для нарушения, например, ослабления и/или прекращения передачи сигналов стимулирующих агентов или агента. В некоторых вариантах осуществления композиция культивируемых Т-клеток содержит вещество, такое как конкурентный агент, например, биотин или аналог биотина, например, D-биотин. В некоторых вариантах осуществления вещество, такое как конкурентный агент, например, биотин или аналог биотина, например, D-биотин, присутствует в количестве больше по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 1000 раз или более, чем количество вещества в эталонной композиции или препарате культивируемых Т-клеток, в которых вещество не добавляли экзогенно в процессе инкубации. В некоторых вариантах осуществления количество вещества, такого как конкурентный агент, например, биотин или аналог биотина, например, D-биотин, в композиции культивируемых Т-клеток составляет от или приблизительно от 10 мкМ до 100 мкМ, от 100 мкМ до 1 мМ, от 100 мкМ до 500 мкМ или от 10 мкМ до 100 мкМ.

IV. Методы Генной Инженерии Культивируемых Клеток, Антигенных Рецепторов и Генетически Сконструированных Клеток

В некоторых вариантах осуществления культивируемые клетки содержат или

сконструированы, чтобы содержать сконструированный рецептор, например, сконструированный антигенный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR). Также, предоставлены популяции таких клеток, композиции, содержащие такие клетки и/или обогащенные такими клетками, например, 5
которые обогащены клетками определенного типа, такими как Т-клетки или клетки CD8+ или CD4+, или отбраны с ними. Среди композиций представлены фармацевтические композиции и готовые формы для введения, например, для адоптивной клеточной терапии. Также, предоставлены терапевтические способы введения клеток и композиций субъектам, например, пациентам.

10 Таким образом, в некоторых вариантах осуществления культивируемые клетки содержат одну или более нуклеиновых кислот, введенных посредством генной инженерии, и, таким образом, экспрессируют рекомбинантные или генетически сконструированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления перенос генов выполняют путем первой стимуляции культивируемых 15
клеток, например, путем ее совмещения со стимулом, который вызывает ответ, такой как пролиферация, выживание и/или активация, например, при измерении с помощью экспрессии цитокина или активации маркера с последующей трансдукцией активированных клеток и размножением в культуре до количества, достаточного для клинического применения.

20 В некоторых контекстах сверхэкспрессия стимулирующего фактора (например, лимфокина или цитокина) может быть токсична для субъекта. Таким образом, в некоторых контекстах сконструированные клетки содержат сегменты гена, которые являются причиной чувствительности клеток к отрицательному отбору *in vivo*, например, при введении в адоптивной иммунотерапии. Например, в некоторых аспектах 25
культивируемые клетки сконструированы, так что их можно элиминировать в результате изменения состояния *in vivo* пациента, которому их вводят. Отрицательно отбираемый фенотип может быть результатом вставки гена, который придает чувствительность к вводимому агенту, например, соединению. Отрицательно отбираемые гены включают в себя ген тимидинкиназы вируса простого герпеса I типа (HSV-I TK) (Wigler et al., Cell 30
II: 223, 1977), который придает чувствительность к ганцикловирусу; ген клеточной гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы (HPRT), ген клеточной аденин-фосфорибозилтрансферазы (APRT), бактериальную цитозин-деаминазу (Mullen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992)). В некоторых аспектах культивируемые клетки, кроме того, сконструированы для стимулирования экспрессии цитокинов или других 35
факторов.

А. Нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенные рецепторы, например, химерные антигенные рецепторы

Представлены способы, нуклеиновые кислоты, композиции и наборы для получения генетически сконструированных клеток. Генная инженерия обычно включает введение 40
нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный или сконструированный компонент в композицию, содержащую культивируемые клетки, например, путем ретровирусной трансдукции, трансфекции или трансформации.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, т.е. Обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из 45
клетки, таком как образец, полученный из другого организма или клетки, который, например, обычно не обнаруживается в сконструированной клетке и/или организме, из которого произошла такая клетка. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты не встречаются в природе, например, нуклеиновая кислота, не

обнаруженная в природе, включая кислоты, содержащую химерные комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих разные домены из множества клеток разных типов.

1. Химерные антигенные рецепторы (CAR)

клетки обычно экспрессируют рекомбинантные рецепторы, такие как антигенные рецепторы, включая функциональные не TCR антигенные рецепторы, например, химерные антигенные рецепторы (CAR) и другие антигенсвязывающие рецепторы, такие как трансгенные Т-клеточные рецепторы (TCR). Также между рецепторами имеются другие химерные рецепторы.

Иллюстративные антигенные рецепторы, включая CAR, и способы конструирования и введения таких рецепторов в клетки включают рецепторы и способы, описанные, например, в публикациях международных заявок на выдачу патента номера WO 200014257, WO 2013126726, WO 2012/129514, WO 2014031687, WO 2013/166321, WO 2013/071154, WO 2013/123061, публикациях заявок на выдачу патента США номера US 2002131960, US 2013287748, US 20130149337, патентах США №№: 6451995, 7446190, 8252592, 8339645, 8398282, 7446179, 6410319, 7070995, 7265209, 7354762, 7446191, 8324353 и 8479118 и европейской заявке на выдачу патента номер EP 2537416, и/или заявках, описанных в Sadelain et al. *Cancer Discov.* 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle et al. *Curr. Opin. Immunol.* 2012 October; 24(5): 633-39; Wu et al., *Cancer*, 2012 March 18(2): 160-75. В некоторых аспектах антигенные рецепторы включают CAR, который описан в патенте США №: 7446190, и рецепторы, описанные в публикации международной заявки на выдачу патента №: WO/2014055668 A1. Примеры CAR включают CAR, которые раскрыты в любой из вышеупомянутых публикаций, таких как WO 2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, патент США №: 7446190, патент США №: 8389282, Kochenderfer et al. 2013, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; и Brentjens et al. *Sci Transl Med.* 2013 5(177). См. также WO 2014031687, US 8339645, US 7446179, US 2013/0149337, патент США №: 7446190, и патент США №: 8389282. Химерные рецепторы, такие как CAR, обычно содержат внеклеточный антигенсвязывающий домен, такой как часть молекулы антитела, обычно вариабельную область тяжелой (V_H) цепи и/или вариабельную область легкой (V_L) цепи антитела, например, scFv-фрагмент антитела.

В некоторых вариантах осуществления антиген, выделяемый рецептором, представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления он представляет собой углевод или другую молекулу. В некоторых вариантах осуществления антиген селективно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках, связанных с заболеванием или состоянием, например, опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или невыделенными клетками или тканями. В других вариантах осуществления антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на сконструированных клетках.

Антигены, выделяемые рецепторами, в некоторых вариантах осуществления включают орфаный рецептор тирозинкиназы ROR1, tEGFR, Her2, LI-CAM, CD19, CD20, CD22, мезотелин, SEA и поверхностный антиген вируса гепатита В, антифолатный рецептор, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, OEPHa2, ErbB2, 3 или 4, FBP, фетальный ацетилхолиновый рецептор, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-альфа, IL-13R-альфа2, kdr, легкая цепь каппа, Lewis Y, молекула клеточной адгезии L1, MAGE-A1, мезотелин, MUC1, MUC16, PSCA, лиганды NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, онкоэмбриональный антиген, ROR1, TAG72, VEGF-R2, раково-эмбриональный антиген (SEA), простат-специфический антиген, PSMA, Her2/neu, эстрогеновый рецептор, прогестероновый рецептор, эфрин-B2, CD123, c-Met, GD-2 и MAGE A3, CE7, ген опухоли

Вильмса (WT-1), циклин, например, циклин A1 (CCNA1), и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, клетки-мишени экспрессируют CAR, который связывается с антигеном, связанным с заболеванием и/или раком. В конкретных вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе, антигеном является интегрин $\alpha v \beta 6$ (интегрин $\alpha v \beta 6$), В-клеточный антиген созревания (BCMA), B7-H6, карбоангидраза 9 (CA9, также известная как CAIX или G250), раково-тестикулярный антиген, раково-тестикулярный антиген 1B (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), раково-эмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин A2, С-С мотив хемокиновый лиганд 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, хондроитинсульфат протеогликан 4 (CSPG4), белок эпидермального фактора роста (EGFR), укороченный белок эпидермального фактора роста (tEGFR), мутация рецептора эпидермального фактора роста III типа (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфрин-B2, эфринный рецептор A2 (EPHa2), эстрогеновый рецептор, Fc-рецептор-подобный белок 5 (FCRL5; также известный как Fc-рецептор гомолог 5 или FCRH5), эмбриональный ацетилхолиновый рецептор (эмбриональный AchR), фолат-связывающий белок (FBP), рецептор фолиевой кислоты альфа, эмбриональный ацетилхолиновый рецептор, ганглиозид GD2, O-ацетилованный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), сопряженный с G-белком рецептор 5D (GPCR5D), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), димеры erbB, человеческий меланома-ассоциированный антиген с высокой молекулярной массой (HMW-MAA), поверхностный антиген вируса гепатита В, человеческий лейкоцитарный антиген A1 (HLA-A1), человеческий лейкоцитарный антиген A2 (HLA-A2), альфа-рецептор IL-22 (IL-22Ra), альфа-рецептор 2 IL-13 (IL-13Ra2), рецептор, содержащий домен вставки киназы (kdr), легкая цепь каппа, молекула клеточной адгезии L1 (L1CAM), эпитоп CE7 L1-CAM, содержащий богатый лейцином повтор член A семейства 8 (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, мезотелин, c-Met, мышинный цитомегавирус (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды членов D 2 группы естественных киллеров (NKG2D), melan A (MART-1), молекула адгезии нервных клеток (NCAM), онкоэмбриональный антиген, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), прогестероновый рецептор, простат-специфический антиген, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), простат-специфический мембранный антиген (PSMA), подобный рецепторной тирозинкиназе орфановый рецептор 1 (ROR1), сурвивин, трофобластический гликопротеин (TPBG также известный как 5T4), опухоль-ассоциированный гликопротеин 72 (TAG72), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), ген опухоли Вильмса (WT-1), патоген-специфический антиген или антиген, ассоциированный с универсальной меткой, и/или биотинилированные молекулы, и/или молекулы, экспрессируемые HIV, HCV, HBV или другими патогенами.

В некоторых вариантах осуществления CAR связывает патоген-специфический антиген. В некоторых вариантах осуществления CAR является специфическим к вирусным антигенам (таким как HIV, HCV, HBV и т.д.), бактериальным антигенам и/или паразитарным антигенам.

В некоторых вариантах осуществления часть антитела рекомбинантного рецептора, например, CAR, дополнительно включает по меньшей мере часть константной области

иммуноглобулина, такую как шарнирная область, например, шарнирная область IgG4 и/или CH1/CL и/или Fc-область. В некоторых вариантах осуществления константная область или часть относится к человеческому IgG, такому как IgG4 или IgG1. В некоторых аспектах часть константной области служит в качестве спейсерной области между распознающим антиген компонентом, например, scFv, и трансмембранным доменом. Спейсер может иметь длину, которая обеспечивает увеличенную ответную реакцию клетки после связывания антигена по сравнению с отсутствием спейсера. Иллюстративные спейсеры, например, шарнирные области, включают спейсеры, описанные в публикации международной заявки на выдачу патента номер WO2014031687. В некоторых примерах спейсер имеет или приблизительно имеет длину 12 аминокислот или длину не более 12 аминокислот. Иллюстративные спейсеры включают спейсеры, имеющие по меньшей мере приблизительно 10-229 аминокислот, приблизительно 10-200 аминокислот, приблизительно 10-175 аминокислот, приблизительно 10-150 аминокислот, приблизительно 10-125 аминокислот, приблизительно 10-100 аминокислот, приблизительно 10-75 аминокислот, приблизительно 10-50 аминокислот, приблизительно 10-40 аминокислот, приблизительно 10-30 аминокислот, приблизительно 10-20 аминокислот или приблизительно 10-15 аминокислот и включая любое целое число между конечными точками любого из перечисленных диапазонов. В некоторых вариантах осуществления спейсерная область имеет приблизительно 12 аминокислот или менее, приблизительно 119 аминокислот или менее или приблизительно 229 аминокислоты или менее. Иллюстративные спейсеры включают только шарнир IgG4, шарнир IgG4, связанный с доменами CH2 и CH3, или шарнир IgG4, связанный с доменом CH3.

Этот антигенраспознающий домен обычно связан с одним или более внутриклеточными сигнальными компонентами, такими как сигнальные компоненты, которые имитируют активацию посредством комплекса антигена с рецептором, такого как комплекс TCR, в случае CAR, и/или сигнал посредством другого рецептора поверхности клетки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий компонент (например, антитело) связан с одним или более трансмембранным и внутриклеточным сигнальными доменами. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен сливают с внеклеточным доменом. В одном варианте осуществления используют трансмембранный домен, который в природе связан с одним из доменов в рецепторе, например, CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен выбирают или модифицируют путем аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами, белков одной и той же или разных мембран поверхности, чтобы минимизировать взаимодействия с другими элементами комплекса рецепторов.

Трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления доставляют либо из натурального, либо из синтетического источника. Когда источник натуральный, домен в некоторых аспектах доставляют из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают области, полученные из (т.е. содержат по меньшей мере трансмембранную область (области)) альфа, бета или дзета цепи T-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CDS, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD 154. Альтернативно трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления синтетический. В некоторых аспектах синтетический трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах триплет фенилаланина, триптофана и валина будет находиться на каждом конце синтетического

трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления связь осуществляют с помощью линкеров, спейсеров и/или трансмембранного домена (доменов).

Среди внутриклеточных сигнальных доменов имеются домены, которые имитируют или аппроксимируют сигнал через натуральный антигенный рецептор, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором и/или сигнал только через костимулирующий рецептор. В некоторых вариантах осуществления короткий олиго- или полипептидный линкер, например, линкер длиной между 2 и 10 аминокислот, такой как линкер, содержащий глицины и серины, например, дуплет глицин-серин, присутствует и образует связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR.

Рецептор, например, CAR, обычно содержит по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный компонент или компоненты. В некоторых вариантах осуществления рецептор содержит внутриклеточный компонент комплекса TCR, такой как цепь TCR CD3, который опосредует активацию и цитотоксичность Т-клеток, например, цепь CD3 дзета. Таким образом, в некоторых аспектах антигенсвязывающую часть связывают с одним или более сигнальными модулями клетки. В некоторых вариантах осуществления сигнальные модули клетки включают трансмембранный домен CD3, внутриклеточные сигнальные домены CD3 и/или другие трансмембранный домены CD. В некоторых вариантах осуществления рецептор, например, CAR, дополнительно содержит часть одной или более дополнительных молекул, таких как Fc-рецептор γ , CD8, CD4, CD25 или CD16. Например, в некоторых аспектах CAR или другой химерный рецептор содержит химерную молекулу между CD3-дзета (CD3- ζ) или Fc-рецептором γ и CD8, CD4, CD25 или CD16.

В некоторых вариантах осуществления при лигировании CAR или другого химерного рецептора цитоплазматический домен или внутриклеточный сигнальный домен рецептора активирует по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций или ответов иммунной клетки, например, Т-клетки, сконструированной для экспрессии CAR. Например, в некоторых контекстах CAR вызывает функцию Т-клетки, такую как цитотоксическая активность или Т-хелперная активность, такая как секреция цитокинов или других факторов. В некоторых вариантах осуществления вместо интактной иммуностимулирующей цепи используют укороченную часть внутриклеточного сигнального домена компонента антигенного рецептора или костимулирующую молекулу, например, если она трансдуцирует сигнал эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен или домены содержат цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR), а в некоторых аспектах также последовательности корецепторов, которые в натуральном контексте действуют совместно с такими рецепторами, чтобы инициировать трансдукцию сигнала после взаимодействия антигена с рецептором.

В контексте натурального TCR для полной активации обычно требуется не только передача сигналов через TCR, но также костимулирующий сигнал. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления для стимулирования полной активации в CAR также содержится компонент для создания вторичного или костимулирующего сигнала. В других вариантах осуществления CAR не содержит компонент для создания костимулирующего сигнала. В некоторых аспектах дополнительный CAR экспрессируется в той же клетке и обеспечивает компонент для создания вторичного или костимулирующего сигнала.

Активация Т-клеток в некоторых аспектах описана как опосредованная двумя классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые

инициируют антиген-зависимую первичную активацию через TCR (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и теми, которые действуют антиген-независимым образом для обеспечения вторичного или костимулирующего сигнала (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). В некоторых аспектах CAR содержит один или оба таких сигнальных компонента.

В некоторых аспектах CAR содержит первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность, которая регулирует первичную активацию комплекса TCR. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, которые известны как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM. Примеры ITAM, содержащие первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, включают последовательности, полученные из TCR дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CDS, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматическая сигнальная молекула (молекулы) в CAR содержит (содержат) цитоплазматический сигнальный домен, его часть или последовательность, полученную из CD3 дзета.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит сигнальный домен и/или трансмембранную часть костимулирующего рецептора, такую как CD28, 4-1BB, OX40, DaP10 и ICOS. В некоторых аспектах один и тот же CAR содержит и активирующие и костимулирующие компоненты.

В некоторых вариантах осуществления активирующий домен содержится в одном CAR, тогда как костимулирующий компонент предоставлен другим CAR, распознающим другой антиген. В некоторых вариантах осуществления CAR включают активирующие или стимулирующие CAR, костимулирующие CAR, причем оба экспрессируются на одной и той же клетке (см. WO2014/055668). В некоторых аспектах клетки содержат один или более стимулирующих или активирующих CAR и/или костимулирующий CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки дополнительно содержат ингибирующие CAR (iCAR, см. Fedorov et al. Sci. Transl. Medicine, 5(215) (December, 2013), такие как CAR, распознающий антиген, не являющиеся антигеном, связанным и/или специфическим к заболеванию или состоянию, посредством которого активирующий сигнал, доставляемый через нацеленный на заболевание CAR, ослабляют или ингибируют путем связывания ингибирующего CAR с его лигандом, например, для уменьшения не намеченных результатов.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит трансмембранный и сигнальный домен CD28, связанный с внутриклеточным доменом CD3 (например, CD3-дзета). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит химерные костимулирующие домены CD28 и CD137 (4-1BB, TNFRSF9), связанные с внутриклеточным доменом CD3 дзета.

В некоторых вариантах осуществления CAR охватывает один или более, например, два или более костимулирующих домена и активирующий домен, например, первичный активирующий домен, в цитоплазматической части. Иллюстративные CAR содержат внутриклеточные компоненты CD3-дзета, CD28 и 4-1BB.

В некоторых вариантах осуществления CAR или другой антигенный рецептор дополнительно содержит маркер, такой как маркер поверхности клетки, который можно использовать для подтверждения трансдукции или конструирования клетки для экспрессии рецептора, такого как рецептор поверхности клетки укороченной версии, такой как укороченный EGFR (tEGFR). В некоторых аспектах маркер содержит весь или часть (например, укороченную форму) CD34, NGFR или рецептора эпидермального

фактора роста (например, tEGFR). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая маркер, функционально связана с полинуклеотидом, кодирующим линкерную последовательность, такую как расщепляемая линкерная последовательность, например, T2A. См. WO 2014031687.

5 В некоторых вариантах осуществления маркер представляет собой молекулу, например, белок поверхности клетки, не обнаруженный в природе на Т-клетках или не обнаруженный в природе на поверхности Т-клеток, или его часть.

В некоторых вариантах осуществления молекула представляет собой не свою молекулу, например, не свой белок, т.е. белок, который не распознается как «свой»
10 иммунной системой хозяина, в который будут адоптивно переносить клетки.

В некоторых вариантах осуществления маркер не несет терапевтическую функцию и/или не создает никакого эффекта, кроме как для использования в качестве маркера для генной инженерии, например, для отбора успешно сконструированных клеток. В других вариантах осуществления маркером может быть терапевтическая молекула или
15 молекула, иным образом оказывающая определенный нужный эффект, например, лиганд для клетки, встречающейся *in vivo*, например, костимулирующая молекула или молекула иммунной контрольной точки для усиления и/или ослабления ответов клеток при адоптивном переносе и столкновении с лигандом.

В некоторых случаях CAR упоминаются как CAR первого, второго и/или третьего поколения. В некоторых аспектах CAR первого поколения является CAR, который
20 обеспечивает только индуцированный сигнал CD3-цепи при связывании антигена; в некоторых аспектах CAR второго поколения является CAR, который обеспечивает такой сигнал и костимулирующий сигнал, например, CAR, содержащий внутриклеточный сигнальный домен из костимулирующего рецептора, такого как CD28 или CD137; в
25 некоторых аспектах CAR третьего поколения является CAR, который содержит множество костимулирующих доменов разных костимулирующих рецепторов.

В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит внеклеточную часть, содержащую антитело или фрагмент антитела. В некоторых аспектах химерный антигенный рецептор содержит внеклеточную часть, содержащую
30 антитело или фрагмент и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент содержит scFv, а внутриклеточный домен содержит ITAM. В некоторых аспектах внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен дзета цепи CD3-дзета (CD3 ζ) цепи. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит трансмембранный домен,
35 связывающий внеклеточный домен и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых аспектах трансмембранный домен содержит трансмембранную часть CD28. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы Т-клетки. В некоторых аспектах костимулирующей молекулой Т-клетки является CD28 или 41BB.

40 Термины «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо для ссылки на полимер аминокислотных остатков и без ограничения минимальной длины. Полипептиды, включая, предоставленные рецепторы и другие полипептиды, например, линкеры или пептиды, могут содержать аминокислотные остатки, включая натуральные и/или ненатуральные аминокислотные остатки. термины также включают
45 постэкспрессионные модификации полипептида, например, гликозилирование, сиалирование, ацетилирование и фосфорилирование. В некоторых аспектах полипептиды могут содержать модификации относительно нативной или натуральной последовательности при условии, что белок сохраняет нужную активность. Эти

модификации могут быть преднамеренными, например, путем сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, например, в результате мутации хозяев, которые продуцируют белки, или ошибок вследствие амплификации ПЦР.

В некоторых вариантах осуществления рецептор, например, CAR, экспрессируемый клетками в последовательной дозе, в качестве рецептора содержит по меньшей мере один иммунореактивный эпитоп, например, CAR, экспрессируемый клетками первой дозы. В некоторых аспектах рецептор, например, CAR, экспрессируемый клетками, вводимыми в последовательной дозе, идентичен рецептору, например, CAR, экспрессируемому первой дозой или по существу идентичен рецептору, например, CAR, экспрессируемому клетками, вводимыми в первой дозе.

Рекомбинантные рецепторы, такие как CAR, экспрессируемые клетками, вводимыми субъекту в разных дозах, обычно распознают или специфически связываются с молекулой, которая экспрессируется в клетках, связана с клетками и/или является специфической к клеткам, связанными с заболеванием или состоянием, подлежащим лечению. При специфическом связывании с молекулой, например, антигеном рецептор обычно доставляет в клетку иммуностимулирующий сигнал, такой как ITAM-трансдуцированный сигнал, стимулируя таким образом иммунный ответ, нацеленный на заболевание или состояние. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки в первой дозе экспрессируют CAR, который специфически связывается с антигеном, экспрессируемым клеткой или тканью заболевания или состояния или связанной с заболеванием или состоянием.

2. TCR

В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные антигенные рецепторы включают в себя рекомбинантные Т-клеточные рецепторы (TCR) и/или TCR, клонируемые из существующих в природе Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления клон высокоаффинных Т-клеток для антигена-мишени (например, ракового антигена) идентифицируют, выделяют у пациента и вводят в клетки. В некоторых вариантах осуществления клон TCR для антигена-мишени получали у трансгенных мышей, сконструированных с помощью генов иммунной системы человека (например, системы человеческих лейкоцитарных антигенов или HLA). См., например, опухолевые антигены (см., например, Parkhurst et al. (2009) Clin Cancer Res. 15:169-180 и Cohen et al. (2005) J Immunol. 175:5799-5808. В некоторых вариантах осуществления для выделения TCR против антигена-мишени используют фаговый дисплей (см., например, Varela-Rohena et al. (2008) Nat Med. 14:1390-1395 и Li (2005) Nat Biotechnol. 23:349-354.

В некоторых вариантах осуществления после получения клона Т-клеток альфа и бета цепи TCR выделяют и клонируют в вектор экспрессии гена. В некоторых вариантах осуществления альфа и бета гены TCR связывают посредством 2А-пептида проскока рибосомы пикорнавируса, так что обе цепи коэкспрессируются. В некоторых вариантах осуществления генетический перенос TCR выполняют посредством ретровирусных или лентивирусных векторов или посредством транспозонов (см., например, Baum et al. (2006) Molecular Therapy: Journal of American Society of Gene Therapy. 13:1050-1063; Frecha et al. (2010) Molecular Therapy: Journal of American Society of Gene Therapy. 18:1748-1757; Hackett et al. (2010) Molecular Therapy: Journal of American Society of Gene Therapy. 18:674-683.

3. Многоцелевое воздействие

В некоторых вариантах осуществления клетки и способы включают многоцелевые стратегии, такие как экспрессия двух или более генетически сконструированных рецепторов на клетке, каждый из которых распознает тот же или другой антиген и

обычно каждый содержит иной внутриклеточный сигнальный компонент. Такие многоцелевые стратегии описаны, например, в публикации международной заявки на выдачу патента №: WO 2014055668 A1 (описывающей комбинации активирующих и костимулирующих CAR, например, выделение двух разных антигенов, присутствующих по отдельности не на мишени, например, на нормальных клетках, но присутствующих вместе только на клетках, связанных с заболеванием или состоянием, подлежащим лечению) и Fedorov et al. Sci. Transl. Medicine, 5(215) (December, 2013) (описывающем клетки, экспрессирующие активирующий и ингибирующий CAR, такой как клетки, в которых активирующий CAR связывается с одним антигеном, экспрессируемым как на нормальных или не больных клетках, так и на клетках, связанных с заболеванием или состоянием, подлежащим лечению, а ингибирующим CAR связывается с другим антигеном, экспрессируемым только на нормальных клетках или клетках, которые не нужно лечить).

Например, в некоторых вариантах осуществления клетки содержат рецептор, экспрессирующий первый генетически сконструированный антигенный рецептор (например, CAR или TCR), который способен индуцировать активирующий сигнал клетке, обычно при специфическом связывании с антигеном, распознаваемым первым рецептором, например, первым антигеном. В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит второй генетически сконструированный антигенный рецептор (например, CAR или TCR), например, химерный костимулирующий рецептор, который способен индуцировать костимулирующий сигнал иммунной клетке, обычно при специфическом связывании со вторым антигеном, распознаваемым вторым рецептором. В некоторых вариантах осуществления первый антиген и второй антиген одинаковые. В некоторых вариантах осуществления первый антиген и второй антиген разные.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй генетически сконструированный антигенный рецептор (например, CAR или TCR) способен индуцировать активирующий сигнал клетке. В некоторых вариантах осуществления рецептор содержит внутриклеточный сигнальный компонент, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы. В некоторых вариантах осуществления активация, индуцированная первым рецептором, включает в себя трансдукцию сигнала или изменение экспрессии белка в клетке, что приводит к началу иммунного ответа, такого как фосфорилирование ITAM, и/или началу опосредованного ITAM каскада сигнальной трансдукции, образование иммунного синапса и/или кластеризацию молекул около связанного рецептора (например, CD4 или CD8 и т.д.), активацию одного или более факторов транскрипции, таких как NF-κB и/или AP-1 и/или индукцию экспрессии генов факторов, таких как цитокины, пролиферация и/или выживание.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй рецептор содержит внутриклеточные сигнальные домены костимулирующих рецепторов, такие как CD28, CD137 (4-1 BB), OX40 и/или ICOS. В некоторых вариантах осуществления первый и второй рецепторы содержат разные внутриклеточные сигнальные домены костимулирующих рецепторов. В одном варианте осуществления первый рецептор содержит костимулирующую сигнальную область CD28, а второй рецептор содержит костимулирующую сигнальную область 4-1BB или наоборот.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй рецептор содержит как внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы, так и внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора.

В некоторых вариантах осуществления первый рецептор содержит внутриклеточный

сигнальный домен, содержащий ITAM или ITAM-подобные мотивы, а второй рецептор содержит внутриклеточный сигнальный домен костимулирующего рецептора.

Костимулирующим сигналом в комбинации с активирующим сигналом, индуцированным в той же клетке, является сигнал, который приводит к иммунному ответу, такому как
5 сильный и замедленный иммунный ответ, такой как повышенная экспрессия гена, секреция цитокинов и других факторов, и опосредованным Т-клетками эффекторным функциям, таким как уничтожение клеток.

В некоторых вариантах осуществления ни лигирование только первого рецептора, ни лигирование только второго рецептора не вызывает сильного иммунного ответа.
10 В некоторых аспектах если лигирован только один рецептор, клетка становится толеризованной или нереагирующей на антиген или ингибированной, и/или нельзя вызвать пролиферацию или секрецию факторов или выполнение эффекторных функций. В некоторых таких вариантах осуществления однако, когда множество рецепторов лигированы, например, при встрече клетки, экспрессирующей первый и второй антигены,
15 достигается нужный ответ, такой как полная иммунная активация или стимуляция, например, на что указывает секреция одного или более цитокина, пролиферация, персистенция и/или осуществление иммунной эффекторной функции, такой как цитотоксическое уничтожение клеток-мишеней.

В некоторых вариантах осуществления два рецептора индуцируют, соответственно,
20 активирующий и ингибирующий сигнал клетке таким образом, что связывание одним из рецепторов его антигена активирует клетку или вызывает ответ, но связывание вторым ингибирующим рецептором его антигена вызывает сигнал, который подавляет или ослабляет этот ответ. Примерами являются комбинации активирующих CAR и ингибирующих CAR или iCAR. Можно использовать, например, такую стратегию, в
25 которой активирующий CAR связывает антиген, экспрессируемый при заболевании или состоянии, но который также экспрессируется на нормальных клетках, а ингибирующий рецептор связывается с отдельным антигеном, который экспрессируется на нормальных клетках, но не на клетках, связанных с заболеванием или состоянием.

В некоторых вариантах осуществления многоцелевую стратегию используют в
30 случае, когда антиген, ассоциированный с конкретным заболеванием или состоянием, экспрессируется на не больной клетке и/или экспрессируется на самой сконструированной клетке, либо временно (например, при стимуляции в связи с генной инженерией) либо постоянно. В таких случаях за счет необходимого лигирования двух отдельных и индивидуально специфических антигенных рецепторов можно улучшить
35 специфичность, избирательность и/или эффективность.

В некоторых вариантах осуществления множество антигенов, например, первый и второй антигены, экспрессируют на клетке, ткани или при выделяемом заболевании или состоянии, например, на раковой клетке. В некоторых аспектах клеткой, тканью,
40 заболеванием или состоянием является множественная миелома или клетка множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления один или более из множества антигенов обычно также экспрессируется на клетке, которую не нужно выделять с помощью клеточной терапии, такой как нормальная или не больная клетка или ткань, и/или на самих сконструированных клетках. В таких вариантах осуществления за счет необходимости лигирования множества рецепторов для достижения ответа
45 клетки достигается специфичность и/или эффективность.

В. Векторы и методы генной инженерии

Разные способы введения генетически сконструированных компонентов, например, антигенных рецепторов, например, CAR или TCR, хорошо известны, и их можно

использовать с представленными способами и композициями. Иллюстративные способы включают способы переноса нуклеиновых кислот, кодирующих рецепторы, в том числе посредством вирусных, например, ретровирусных или лентивирусных, трансдукции, транспозонов и электропорации.

5 В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в культивируемые клетки с использованием частиц рекомбинантных инфекционных вирусов, таких как, например, векторы, полученные из вируса обезьян 40 (SV40), аденовирусов, аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки с
10 использованием рекомбинантных лентивирусных векторов или ретровирусных векторов, таких как гамма-ретровирусные векторы (см., например, Koste et al. (2014) *Gene Therapy* 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) *Exp Hematol* 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2, e93; Park et al. *Trends Biotechnol.* 2011 November 29(11): 550-557.

15 В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор имеет последовательность длинного концевой повтора (LTR), например, ретровирусный вектор, полученный из вируса мышинного лейкоза Молони (MoMLV), миелопролиферативный вирус саркомы (MPSV), вирус эмбриональных стволовых клеток мышей (MESV), вирус стволовых клеток мышей (MSCV), вирус некроза селезенки
20 (SFFV) или аденоассоциированный вирус (AAV). Большинство ретровирусных векторов получают из ретровирусов мышей. В некоторых вариантах осуществления ретровирусы включают ретровирусы, полученные из любого источника клеток птиц или млекопитающих. Ретровирусы обычно являются амфотропными, в том смысле, что они способны инфицировать клетки-хозяева нескольких видов, включая людей. В одном
25 варианте осуществления ген, подлежащий экспрессии, заменяет ретровирусные последовательности gag, pol и/или env. был описан ряд иллюстративных ретровирусных систем (например, патенты США №№ 5219740; 6207453; 5219740; Miller и Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; и Boris-
30 Lawrie и Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109.

известны способы лентивирусной трансдукции. Иллюстративные способы описаны, например, в Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) *Blood.* 101: 1637-1644; Verhoeven et al. (2009) *Methods Mol Biol.* 506: 97-114; и Cavalieri et al. (2003) *Blood.* 102(2): 497-505.

35 В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки посредством электропорации (см., например, Chicaybam et al (2013) *PLoS ONE* 8(3): e60298 и Van Tedeloo et al. (2000) *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты переносят в Т-клетки посредством транспозиции (см., например, Manuri et al. (2010) *Hum Gene Ther*
40 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74; и Huang et al. (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126). Другие способы введения и экспрессии генетического материала в иммунных клетках включают трансфекцию фосфата кальция (например, как описано в *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.), слияние протопластов, катионную липосомо-опосредованную трансфекцию; бомбардировку
45 микрочастицами, облегченную частицами вольфрама (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); and strontium phosphate DNA co-precipitation (Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)).

Другими подходами и векторами для переноса нуклеиновых кислот, кодирующих

рекомбинантные продукты, являются подходы и векторы, описанные, например, в публикации международной заявки на выдачу патента №: WO2014055668 и патенте США № 7446190.

5 В некоторых вариантах осуществления клетки, например, Т-клетки, можно трансфицировать либо в процессе, либо после размножения, например, с помощью Т-клеточного рецептора (TCR) или химерного антигенного рецептора (CAR). Эту трансфекцию для введения гена нужного рецептора можно осуществлять с помощью любого подходящего ретровирусного вектора, например, затем генетически модифицированную популяцию клеток можно освободить от первоначального стимула (например, стимула CD3/CD28), а после стимулировать стимулом второго типа, (например, посредством введенного рецептора *de novo*). Этот стимул второго типа может включать антигенный стимул в виде молекулы пептид/МНС, когнатный (перекрестно связывающийся) лиганд генетически введенного рецептора (например, природный лиганд CAR) или любой лиганд (такой как антитело), которые прямо связывается
10 внутри каркаса нового рецептора (например, посредством распознающих константных областей внутри рецептора). См., например, Cheadle et al, «Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy» *Methods Mol Biol.* 2012; 907:645-66 или Barrett et al. *Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014).*

Среди дополнительных нуклеиновых кислот, например, генами для введения являются
20 гены, которые улучшают эффективность терапии, например, путем стимулирования жизнеспособности и/или функции переносимых клеток; гены для обеспечения генетического маркера для отбора и/или оценки клеток, например, для оценки выживания или локализации *in vivo*; гены для повышения безопасности, например, делая клетку восприимчивой к отрицательному отбору *in vivo*, как описано у Lupton S. D. et al., *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991); и Riddell et al. *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992); см. также публикации PCT/US91/08442 и PCT/US94/05601 Lupton et al., описывающие использование бифункциональных селективных генов слияния, полученных в результате слияния доминантного положительного селектируемого маркера с отрицательным селектируемым маркером. См., например, Riddell et al. Патент США № 6040177, столбцы
25 30 14-17.

В некоторых случаях можно использовать вектор, который не требует активации клеток, например, Т-клеток. В некоторых таких случаях перед активацией клетки можно отбирать и/или трансдуцировать. Таким образом, клетки можно сконструировать перед или после культивирования клеток, как описано в данном документе, а в некоторых
35 случаях в одно и то же время или в процессе по меньшей мере части культивирования. В некоторых вариантах осуществления клетки, которые нужно сконструировать, представляют собой культивируемые клетки, или в некоторых случаях клетки можно трансдуцировать перед проведением культивирования, как описано в данном документе.

С. Способы трансдукции Клеток

40 В некоторых вариантах осуществления способы переноса вирусного вектора в клетку осуществляют с использованием любого предоставленного олигомерного белкового реагента (например, стрептавидина или мутеина стрептавидина). В некоторых вариантах осуществления олигомерный белковый реагент, используемый согласно предоставленным способам трансдукции, представляет собой реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами. В
45 некоторых вариантах осуществления клетки предназначены для использования в клеточной терапии, например, первичные клетки, полученные для аутологичного или аллогенного переноса, например, в адоптивной клеточной терапии. В некоторых

вариантах осуществления реагент также можно использовать в способах для облегчения одной или более других стадий обработки, связанных с получением сконструированной композиции клеток, например, одного или более из отбора или модулирования, активации и/или стимуляции клеток. Способы могут включать дополнительные стадии 5 обработки клеток, например, промывание, выделение, разделение, получение готовых форм клеток или другие стадии, связанные с получением композиции клеток.

В некоторых вариантах осуществления представленные способы используют для введения вирусных векторных частиц, таких как ретровирусные векторные частицы, в клетки, такие как иммунные клетки, включая Т-клетки. В некоторых вариантах 10 осуществления вирусные векторные частицы имеют геном, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антигенный рецептор, такой как химерный антигенный рецептор (CAR) или трансгенный Т-клеточный рецептор (TCR).

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления представленные способы можно использовать для экспрессии в иммунных клетках, таких как Т-клетки, генетически сконструированный антигенный рецептор, такой как трансгенный TCR или CAR. Также, 15 предоставлены клетки, трансдуцированные с помощью таких частиц, и способы и композиции, содержащие такие клетки, и способы их применения.

В некоторых вариантах осуществления ретровирусные векторные частицы и способы включают особенности, которые приводят к повышенной трансдукции иммунных 20 клеток и/или некоторых их популяций и/или субпопуляций, желательных для использования в адоптивной иммунотерапии. В некоторых вариантах осуществления предоставленных способов трансдукции и вирусных векторных частиц, клетки, например, Т-клетки, в трансдуцируемой популяции не стимулируют, или они не нуждаются в стимуляции и/или активации перед и/или в сочетании с введением в контакт или 25 инкубацией клеток с предоставленными ретровирусными векторными частицами.

А. Инкубация Клеток с помощью Вирусных Векторных Частиц

В некоторых вариантах осуществления представленные способы включают способы трансдукции клеток путем введения в контакт, например, инкубации, композиции 30 клеток, содержащей множество клеток (далее также называемой «входная композиция»), с (1) олигомерным белковым (например, мутеином стрептавидина) реагентом, таким как реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанным с одним или более агентами, и (2) вирусными частицами. В некоторых вариантах осуществления способ включает смешивание клеток с реагентом и с вирусными 35 частицами одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления способ включает предварительное смешивание вместе вирусных частиц и реагента, а затем введение в контакт композиции клеток со смесью вирусных частиц, связанных с реагентом. В некоторых вариантах осуществления введение в контакт происходит в течение от 30 минут до 72 часов, например, от 30 минут до 48 часов, от 30 минут до 24 40 часов или от 1 часа до 24 часов, например, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере в течение 30 минут, 1 часа, 2 часов, 6 часов, 12 часов, 24 часов, 36 часов или более.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в данном документе (i) инкубация включает смешивание клеток-мишеней с реагентом и/или смешивание клеток-мишеней с вирусными частицами, последовательно, в любом 45 порядке, необязательно, при этом смешивание в (a) и смешивание в (b) осуществляют в течение периода не более 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов или 72 часов и/или смешивание в (a) осуществляют не более 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов,

5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 36 часов или 48 часов отдельно от смешивания в (b); (ii) инкубация включает смешивание клеток-мишеней, реагента и вирусных частиц, причем указанное смешивание выполняют одновременно или по существу одновременно; (iii) инкубация включает смешивание композиции, которая содержит клетки-мишени и вирусные частицы и не содержит реагент, необязательно, при этом: не более 5%, 10%, 20%, 30% или 40% клеток-мишеней в композиции, содержащей клетки-мишени и реагент, являются активированными клетками, экспрессируют маркер поверхности, выбираемый из группы, состоящей из HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L и 4-1BB; включая внутриклеточную экспрессию цитокина, выбираемого из группы, состоящей из IL-2, IFN-гамма, TNF-альфа, и/или способны к пролиферации; и/или смешивание осуществляют не более 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 36 часов или 48 часов после смешивания клеток-мишеней и вирусных частиц в композиции; (iv) инкубация включает смешивание композиции, которая содержит клетки-мишени и реагент и не содержит вирусные частицы, с вирусными частицами, необязательно, при этом не более 5%, 10%, 20%, 30% или 40% клеток-мишеней в композиции, содержащей клетки-мишени и реагент, представляют собой активированные клетки, экспрессируют маркер поверхности, выбираемый из группы, состоящей из HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L и 4-1BB; включая внутриклеточную экспрессию цитокина, выбираемого из группы, состоящей из IL-2, IFN-гамма, TNF-альфа, и/или способны к пролиферации; и/или смешивание осуществляют не более 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 36 часов или 48 часов после смешивания клеток-мишеней и вирусных частиц в композиции; и/или (v) инкубация включает смешивание композиции, содержащей вирусные частицы и реагент, с композицией, которая содержит клетки-мишени, а не вирусные частицы и/или не реагент, необязательно, при этом: не более 5%, 10%, 20%, 30% или 40% клеток-мишеней в композиции, содержащей клетки-мишени и реагент, представляют собой активированные клетки, экспрессируют маркер поверхности, выбираемый из группы, состоящей из HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L и 4-1BB; включая внутриклеточную экспрессию цитокина, выбираемого из группы, состоящей из IL-2, IFN-гамма, TNF-альфа, и/или способны к пролиферации.

В некоторых вариантах осуществления инкубация включает смешивание клетки с реагентом и с вирусными частицами, одновременно или последовательно, в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления в процессе по меньшей мере части инкубации реагент и вирусные частицы одновременно находятся в присутствии или в контакте с клеткой.

В некоторых вариантах осуществления представленные способы включают (a) введение в контакт вирусных частиц с олигомерным белковым реагентом, с получением таким образом композиции, содержащей вирусные частицы и реагент, при этом вирусные частицы необязательно связаны с реагентом; и (b) инкубацию композиции в (a) с множеством клеток, включая клетки-мишени, при этом в способе получают выходную композицию, содержащую одну или более клеток трансдуцированных вирусными частицами.

В некоторых вариантах осуществления представленные способы включают смешивание композиции, содержащей вирусные частицы и олигомерный белковый реагент, с множеством клеток, включая клетки-мишени, при этом в способе получают выходную композицию, содержащую одну или более клеток, трансдуцированных

вирусными частицами.

В некоторых вариантах осуществления представленные способы включают (а) введение в контакт вирусных частиц с олигомерным белковым реагентом, содержащим стрептавидин или мутеин или биологически активный фрагмент любого из
5 вышеупомянутого и/или множество субъединиц любого из вышеупомянутого, с получением таким образом композиции, содержащей вирусные частицы и реагент, при этом вирусные частицы необязательно связаны с реагентом; и (b) инкубацию композиции в (а) с множеством клеток, при этом в способе получают выходную композицию, содержащую одну или более клеток, трансдуцированных вирусными частицами.

10 В некоторых вариантах осуществления представленные способы включают смешивание композиции, содержащей вирусные частицы и белковый реагент, с множеством клеток, включая клетки-мишени, при этом: белковый реагент содержит стрептавидин, авидин, стрептаналог или мутеин авидина, аналог авидина, мутеин или биологически активный фрагмент любого из вышеупомянутого и/или множество
15 субъединиц любого из вышеупомянутого; и в способе получают выходную композицию, содержащую одну или более клеток, трансдуцированных вирусными частицами. В некоторых вариантах осуществления реагент и/или каждое из мономерных звеньев и/или каждое из мультимерных звеньев, имеет суммарный положительный заряд или общий положительный заряд.

20 В некоторых вариантах осуществления представленные способы включают инкубацию множества клеток, включая клетки-мишени, с: 1) олигомерным белковым реагентом, содержащим множество участков связывания, способных обратимо связываться со связывающим агентом, при этом один или более участков связывания обратимо связаны со связывающим агентом; и 2) вирусными частицами, при этом по
25 меньшей мере часть инкубации в (1) происходит одновременно с (2), и, при этом в способе получают выходную композицию, содержащую одну или более клеток, трансдуцированных вирусными частицами.

В некоторых вариантах осуществления представленные способы включают (1) введение в контакт (а) композиции, содержащей одну или более вирусных частиц, и (b)
30 связывающего агента, который представляет собой связывающий вирус агент, который (i) способен специфически связываться с молекулой на поверхности вирусных частиц и ii) обратимо связан с реагентом, содержащим множество участков связывания, способных обратимо связываться со связывающим вирус агентом; и (2) инкубацию по меньшей мере множества клеток, включая клетки-мишени, в присутствии одной или
35 более вирусных частиц, при этом введение в контакт в (1) и инкубацию в (2) осуществляют одновременно или последовательно, в любом порядке, при этом в способе создают выходную композицию, содержащую множество клеток, трансдуцированных вирусными частицами.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в
40 данном документе, введение в контакт в (1) и инкубацию в (2) осуществляют в течение периода не более 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов или 72 часов, и/или смешивание в (а) осуществляют не более 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов,
45 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часов, 36 часов или 48 часов отдельно от инкубации в (b). В некоторых вариантах осуществления вирусные векторные частицы содержат геном, кодирующий рекомбинантный антигенный рецептор, необязательно химерный антигенный рецептор.

Композиция, которая содержит вирусные векторные частицы, и клетки в процессе

стадии трансдукции могут дополнительно содержать один или более дополнительных агентов, таких как агенты для стимулирования эффективности трансдукции, такие как поликатионы, включая протамин (например, протамин сульфат), гексадиметрин бромид (POLYBRENE®, Abbott Laboratories Corp), и CH-296 (RETRONECTIN®, Clontech). В некоторых вариантах осуществления поликатион может иметься во входной композиции с итоговой концентрацией от 1 мкг/мл до 100 мкг/мл, например, от 5 мкг/мл до 50 мкг/мл. Композиция также может содержать среды, включая клеточную культуральную среду, включая среду, разработанную для культуры клеточного типа, подлежащего обработке, такую как среда для гемопоэтических стволовых клеток, например, не содержащая сыворотку среда.

В некоторых вариантах осуществления концентрация клеток входной композиции составляет от или приблизительно от $1,0 \times 10^5$ клеток/мл до $1,0 \times 10^8$ клеток/мл, например, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере или приблизительно $1,0 \times 10^5$ клеток/мл, 5×10^5 клеток/мл, 1×10^6 клеток/мл, 5×10^6 клеток/мл, 1×10^7 клеток/мл, 5×10^7 клеток/мл или 1×10^8 клеток/мл.

В некоторых вариантах осуществления вирусные частицы представлены с некоторым отношением копий вирусных векторных частиц или их инфекционных единиц (IU) на общее количество клеток (IU/клетка) во входной композиции или общее количество клеток, подлежащих трансдуцированию. Например, в некоторых вариантах осуществления вирусные частицы присутствуют в процессе введения в контакт при или приблизительно при или по меньшей мере при или приблизительно при 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 или 60 IU вирусных векторных частиц на одну из клеток.

В некоторых вариантах осуществления титр вирусных векторных частиц находится между или приблизительно между 1×10^6 IU/мл и 1×10^8 IU/мл, например, между или приблизительно между 5×10^6 IU/мл и 5×10^7 IU/мл, например, по меньшей мере 6×10^6 IU/мл, 7×10^6 IU/мл, 8×10^6 IU/мл, 9×10^6 IU/мл, 1×10^7 IU/мл, 2×10^7 IU/мл, 3×10^7 IU/мл, 4×10^7 IU/мл или 5×10^7 IU/мл.

В некоторых вариантах осуществления трансдукцию можно обеспечивать при множественности инфекции (MOI) менее чем 100, например, обычно менее чем 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 или менее.

В некоторых вариантах осуществления введение в контакт проводят в растворе, например, с использованием растворимого олигомерного белкового реагента (например, мутеина стрептавидина) или реагента мультимеризации и/или олигомерного реагента в виде частиц, связанного с одним или более агентами. В некоторых вариантах осуществления клетки, олигомерный реагент и вирусные частицы вводят в контакт в объеме от или от приблизительно 0,5 мл до 500 мл, например, от или от приблизительно 0,5 мл до 200 мл, от 0,5 мл до 100 мл, от 0,5 мл до 50 мл, от 0,5 мл до 10 мл, от 0,5 мл до 5 мл, от 5 мл до 500 мл, от 5 мл до 200 мл, от 5 мл до 100 мл, от 5 мл до 50 мл, от 5 мл до 10 мл, от 10 мл до 500 мл, от 10 мл до 200 мл, от 10 мл до 100 мл, от 10 мл до 50 мл, от 50 мл до 500 мл, от 50 мл до 200 мл, от 50 мл до 100 мл, от 100 мл до 500 мл, от 100 мл до 200 мл или 200 мл до 500 мл.

В некоторых вариантах осуществления при проведении контакта в растворе, например, при использовании растворимого олигомерного белкового реагента (например, мутеина стрептавидина) можно осуществить контакт, в котором по меньшей мере часть контакта проводят с помощью центрифугирования, например, спинокуляции (например, центрифужной инокуляции). В некоторых вариантах осуществления

композицию, содержащую клетки, вирусные частицы и реагент, можно вращать, обычно с относительно низким усилием или скоростью, например, со скоростью ниже чем скорость, используемая для осаждения клеток, например, от или от приблизительно 600 об/мин до 1700 об/мин (например, при или приблизительно при или по меньшей мере 600 об/мин, 1000 об/мин, или 1500 об/мин или 1700 об/мин). В некоторых вариантах осуществления вращение осуществляют с ускорением, например, относительным центробежным ускорением от или от приблизительно 100 g до 3200 g (например, при или приблизительно при или по меньшей мере при или приблизительно при 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g или 3200 g), при измерении, например, на внутренней или внешней стенке камеры или полости. термин «относительное центробежное ускорение» или RCF обычно понимают, как эффективное ускорение, прикладываемое к объекту или веществу (такому как клетка, образец или гранула и/или точка в камере или другом вращаемом контейнере), относительно силы тяжести земли, в конкретной точке в пространстве по сравнению с осью вращения. значение можно определить с использованием хорошо известных формул, принимая в расчет силу тяжести, скорость вращения и радиус вращения (расстояние от оси вращения и объекта, вещества или частицы, для которой измеряют RCF).

В некоторых вариантах осуществления олигомерный реагент, такой как реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, не связан с носителем, например, не связан с твердой поверхностью или неподвижной фазой.

В некоторых вариантах осуществления олигомерный реагент, такой как реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, иммобилизируют на носителе, таком как твердая поверхность или неподвижная фаза. В некоторых вариантах осуществления введение в контакт проводят в неподвижной фазе, например, с использованием матрицы для хроматографии, на которой иммобилизируют белок (мутеин стрептавидина), такой как олигомерный белковый реагент (например, мутеин стрептавидина). В данном документе описаны примеры таких форматов для использования в сочетании с представленными способами. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления трансдукцию в колонке можно выполнять согласно представленным способам.

В некоторых вариантах осуществления входная композиция, которую вводят в контакт с клетками, содержит активированные клетки. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более клеток, например, Т-клеток, во входной композиции активированы, например, в некоторых случаях являются поверхностно положительными для одного или более из HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L и/или 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления клетки активируют активирующим агентом, например, в присутствии антитела против CD3/против CD28, перед началом введения в контакт, например, перед началом трансдукции. В данной области известны способы размножения популяций Т-клеток *in vitro* в отсутствие экзогенных факторов роста или при низких количествах экзогенных факторов роста (см., например, патент США 6352694 В1 и Европейский патент EP 0 700 430 В1). В общем, в таких способах задействуют твердофазные поверхности больше чем 1 мкм, на которые иммобилизируют разные связывающие агенты (например, антитело против CD3 и/или против CD28). Например, Dynabeads® CD3/CD28 (Invitrogen) представляют собой имеющиеся на рынке реагенты для размножения Т-клеток, которые представляют собой однородные, 4,5 мкм суперпарамагнитные, стерильные, непирогенные полистирольные шарики, покрытые смесью аффинно очищенных

моноклональных антител против молекул клеточной поверхности CD3 и CD28 на человеческих Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления активирующий агент, например, против CD3 и/или против CD28, можно иммобилизовать на шариках, таких как магнитные шарики.

5 В некоторых вариантах осуществления активацию клеток также выполняют в присутствии IL-2 (например, от или от приблизительно 50 IU/мл до 200 IU/мл, например, или приблизительно 100 IU/мл). В некоторых вариантах осуществления активацию осуществляют от или приблизительно от 1 часа до 96 часов, от 1 часа до 72 часов, от 1 часа до 48 часов, от 4 часов до 36 часов, от 8 часов до 30 часов или от 12 часов до 24
10 часов, например, по меньшей мере или приблизительно по меньшей мере 6 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа, 36 часов или 72 часа. В некоторых вариантах осуществления активацию осуществляют при температуре более или приблизительно более 25°C, например, обычно более или приблизительно более 32°C, 35°C или 37°C, например, при или приблизительно при 37°C ± 2°C, например, при температуре при или приблизительно
15 при 37°C.

В некоторых вариантах осуществления клетки не активируют активирующим агентом, например, в присутствии антитела против CD3/против CD28, перед началом введения в контакт, например, перед началом трансдукции. В некоторых вариантах осуществления входная композиция, которую вводят в контакт с клетками, содержит множество
20 покоящихся клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более Т-клеток в популяции являются покоящимися Т-клетками, такими как Т-клетки, у которых отсутствует маркер активации Т-клеток, например, маркер поверхности или внутриклеточный цитокин или другой маркер, и/или Т-клетки, которые находятся на стадии G₀ или G₀G_{1a} клеточного цикла.

25 В отдельных аспектах представленные способы обеспечивают возможность трансдукции в Т-клетках без необходимости активации перед введением в контакт и/или инкубацией с олигомерным белковым реагентом, таким как реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами. В некоторых вариантах осуществления способы включают трансдукцию
30 популяции Т-клеток, которые включают в себя покоящиеся или наивные Т-клетки, с помощью вирусного вектора в присутствии олигомерного белкового реагента (например, стрептавидина) согласно представленным способам, без активацией и/или стимуляцией сперва Т-клеток, т.е. Перед трансдукцией. В некоторых таких вариантах осуществления для получения иммунных клеток, таких как Т-клетки, для адоптивной
35 терапии можно использовать представленные способы, которые не включают стадию активации и/или стимуляции Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления олигомерный белок (например, мутеин стрептавидина) является незащищенным.

40 В некоторых вариантах осуществления олигомерный белок (например, мутеин стрептавидина) представляет собой реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, который имеет связанный с ним один или более связывающий агент, который способен связываться с молекулой на поверхности клеток-мишеней (например, Т-клеток) или в некоторых случаях на
45 поверхности вирусных частиц в композиции. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент обратимо связан с реагентом, содержащим множество участков связывания, способных обратимо связываться с агентом. В некоторых вариантах осуществления инкубацию проводят в условиях, в которых агент связывается, например, специфически связывается, с молекулой на клетке или вирусной частице. В некоторых

описанных вариантах осуществления олигомерный реагент имеет обратимо иммобилизованный на нем (связанный с ним) агент или агенты (например, первый или второй или третий и т.д.), которые могут содержать рецептор-связывающий, например, стимулирующий агент или дополнительные агенты, селективный агент или связывающие вирусы агенты, которые можно использовать для отбора, стимуляции, размножения и/или дифференциации клеток или модулирования трансдукции клеток.

В некоторых случаях для определенных рецептор-связывающих агентов (например, стимулирующих агентов или дополнительных агентов), такое связывание может индуцировать или модулировать сигнал в клетках-мишенях (например, Т-клетках) в композициях, например, описанный первичный сигнал или дополнительный сигнал. В некоторых вариантах осуществления связывание агента с молекулой приводит к одному или более из стимуляции, активации, размножения (пролиферации) и/или дифференциации клеток-мишеней в композиции. В некоторых вариантах осуществления реагент содержит стимулирующий агент, который предоставляет в клетки первичный активационный сигнал, при этом стимулирующий агент содержит по меньшей мере один партнер С по связыванию (например, С1, С2 или С3 и т.д.), при этом партнер С по связыванию способен обратимо связываться с участком Z1 связывания олигомерного реагента для обратимого связывания агента. В некоторых вариантах осуществления реагент содержит дополнительный агент, который обеспечивает дополнительный сигнал в клетки, при этом дополнительный агент содержит по меньшей мере один партнер С по связыванию (например, С1, С2 или С3 и т.д.), при этом партнер С по связыванию способен обратимо связываться с участком Z1 связывания олигомерного реагента для обратимого связывания агента. В некоторых вариантах осуществления реагент содержит селективный агент, который специфически выделяет связывание с конкретной молекулой или маркером клеточной поверхности, при этом селективный агент содержит по меньшей мере один партнер С по связыванию (например, С1, С2 или С3 и т.д.), при этом партнер С по связыванию способен обратимо связываться с участком Z1 связывания олигомерного реагента для обратимого связывания агента.

В некоторых вариантах осуществления активацию клеток во входной композиции начинают в процессе введения в контакт клеток входной композиции с олигомерным белковым реагентом и/или вирусными частицами. В таких случаях олигомерный белковый реагент может иметь иммобилизованный на нем рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент и/или дополнительный агент, способный индуцировать или модулировать сигнал в клетках, таких как Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления стимулирующий агент содержит комплекс МНС I:пептид или его функциональную часть, комплекс МНС II:пептид или его функциональную часть и/или способен доставлять стимулирующий сигнал через комплекс TCR/CD3 в Т-клетке, комплекс, содержащий CD3, в Т-клетке и/или содержащую ITAM молекулу в Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления олигомерный реагент может иметь иммобилизованный на нем дополнительный агент, способный предоставлять дополнительный сигнал в клетки, такие как Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления рецептор-связывающий агент, например, стимулирующий агент и/или дополнительный агент, представляет собой любой агент, который описан в данном документе, такой как антитело против CD3 и/или против CD28 (например, Fab). Альтернативно, в качестве стимулирующего агента также можно использовать лиганд, например, природный лиганд, рецептора, который запускает размножение клеток. Например, внеклеточный домен CD19 можно использовать для вызова активации внутриклеточных сигнальных каскадов клеток, трансдуцированных для экспрессии

химерного связывающего CD19 антигенного рецептора (CAR). В некоторых вариантах осуществления олигомерный белковый реагент (например, стрептавидин) способен как модулировать, так и активировать трансдукцию клеток, например, стимулировать клетки в процессе введения в контакт и необязательно дальнейшей инкубации. В некоторых вариантах осуществления связывание олигомерного реагента, содержащего стимулирующий агент, является обратимым, например, в присутствии конкурирующего агента, например, биотина.

В некоторых вариантах осуществления представленный способ можно использовать для селективного индуцирования трансдукции и/или размножения *ex vivo* конкретных популяций клеток, таких как В-клетки, Т-клетки или естественные клетки-киллеры. В некоторых вариантах осуществления олигомерный белковый реагент (например, мутеин стрептавидаина) представляет собой реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, которые могут содержать по меньшей мере один селективный агент, обратимо связанный с тем же реагентом, используемым для модулирования трансдукции. В некоторых вариантах осуществления олигомерный реагент (например, мутеин стрептавидаина) представляет собой реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, которые могут содержать селективный агент и один или оба первый или второй рецептор-связывающие агенты (например, стимулирующий агент или дополнительный агент) на одном и том же реагенте. В некоторых вариантах осуществления олигомерный белковый реагент (например, стрептавидин), такой как реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, способен как модулировать трансдукцию клеток, так и предпочтительно нацеливать трансдукцию на конкретную субпопуляцию выбранных или выделенных клеток. В некоторых вариантах осуществления олигомерный белковый реагент (например, стрептавидин), такой как реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более агентами, способен модулировать трансдукцию клеток, например, предпочтительно нацеливать трансдукцию на конкретную субпопуляцию выбранных или выделенных клеток, и активировать, например, стимулировать клетки, в процессе введения в контакт и необязательно дальнейшей инкубации.

В некоторых вариантах осуществления связывание олигомерного реагента, содержащего связывающие агенты, например, селективный агент и/или стимулирующий агент, является обратимым, например, в присутствии конкурирующего агента, например, биотина. Как описано ниже, в некоторых аспектах способ включает добавление или инкубацию композиции, содержащей клетки, вирусные частицы и олигомерный реагент (например, реагент мультимеризации и/или олигомерный реагент в виде частиц, связанный с одним или более связывающим агентом), с конкурирующим веществом для обратного изменения, диссоциации или разрыва связи одного или более связывающего агента с клеткой или вирусными частицами. В некоторых вариантах осуществления после изменения направления, диссоциации или нарушения один или более компонентов композиции можно удалить, например, диссоциировать олигомерный реагент, один или более связывающий агент и/или конкурирующее вещество.

В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные в результате представленного способа (далее также называемые «выходная композиция» или «инкубированная композиция»), включают клетки, трансдуцированные с помощью вирусного вектора, такого как вирусный вектор, содержащий нуклеотиды, кодирующие гетерологичный белок, такой как рекомбинантный рецептор, например, CAR.

Гетерологичный в данном контексте относится к белку, который не обычно экспрессируется из вируса и/или не кодируется вирусным геномом. В некоторых вариантах осуществления встраивание в вирусного вектора в геном хозяина можно оценить путем измерения уровня экспрессии рекомбинантного белка, такого как гетерологичными белок, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержащейся в геноме вирусных векторных частиц после инкубации. Можно использовать ряд хорошо известных способов оценки уровня экспрессии рекомбинантных молекул, таких как обнаружение с помощью способов на основе аффинности, например, способов на основе иммуноаффинности, например, в контексте белков клеточной поверхности, например, с помощью проточной цитометрии. В некоторых примерах экспрессию измеряют с помощью обнаружения маркера трансдукции и/или репортерной конструкции. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая укороченный белок поверхности, содержится внутри вектора, и ее используют в виде маркера экспрессии и/или ее усиления.

15 V. Композиции, Готовые Формы и Способы Введения

Также, предоставлены композиции, содержащие сконструированный рецептор (например, сконструированный антигенный рецептор), такой как CAR или TCR, и композиции, содержащие сконструированные клетки, включая фармацевтические композиции и готовые формы. Также, предоставлены способы использования и варианты применения композиций, например, для лечения заболеваний, состояний и расстройств, при которых экспрессируется антиген, или в способах обнаружения, диагностики и прогнозирования.

A. Композиции/Готовые формы

Термин «фармацевтическая готовая форма» относится к препарату, который находится в таком виде, чтобы обеспечить эффективную биологическую активность содержащегося в нем активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будут вводить полученную готовую форму.

«Фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту в фармацевтической готовой форме, не являющемуся активным ингредиентом, который является нетоксичным для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но без ограничения, буфер, вспомогательное средство, стабилизатор или консервант.

В некоторых аспектах выбор носителя определяется частично конкретной клеткой и/или способом введения. Соответственно, существует множество подходящих готовых форм. Например, фармацевтическая композиция может содержать консерванты.

Подходящие консерванты могут включать, например, метилпарабен, пропилпарабен, бензоат натрия и хлорид бензалкония. В некоторых аспектах используют смесь двух или более консервантов. Консервант или их смеси обычно присутствуют в количестве от приблизительно 0,0001% до приблизительно 2% по массе от общей композиции.

Носители описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980). Фармацевтически приемлемые носители обычно нетоксичны к реципиентам в используемых дозировках и концентрациях, и включают, но без ограничения: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенолоспирт, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метилпарабен или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и m-крезол); низкомолекулярные полипептиды (менее чем приблизительно 10 остатков);

белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннитол, трегалоза или сорбитол; 5 солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, таких как полиэтиленгликоль (PEG).

в некоторых аспектах в композициях содержатся буферные агенты. Подходящие 10 буферные агенты включают, например, лимонную кислоту, цитрат натрия, фосфорную кислоту, фосфат калия и разные другие кислоты и соли. В некоторых аспектах используют смесь двух или более буферных агентов. буферный агент или их смеси обычно присутствуют в количестве от приблизительно 0,001% до приблизительно 4% по массе от общей композиции. Известны способы получения вводимых 15 фармацевтических композиций. более подробно иллюстративные способы описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005).

Готовая форма или композиция также может содержать больше чем один активный ингредиент, полезный для конкретного показания, заболевания или состояния, 20 подлежащего лечению клетками, предпочтительно ингредиенты с активностью, комплементарной клетке, причем соответствующие активности не оказывают неблагоприятного влияния друг на друга. Такие активные ингредиенты надлежащим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для предполагаемой цели. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления 25 фармацевтическая композиция дополнительно включает другие фармацевтически активные агенты или лекарственные средства, такие как химиотерапевтические агенты, например, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, цисплатин, даунорубин, доксорубин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевину, метотрексат, паклитаксел, ритуксимаб, винбластин, винкристин и т.д. В некоторых вариантах осуществления 30 клетки или антитела вводят в виде соли, например, фармацевтически приемлемой соли. Подходящие фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот включают соли, полученные из минеральных кислот, таких как соляная, бромистоводородная, фосфорная, метафосфорная, азотная и серная кислоты, и органических кислот, таких как винная, уксусная, лимонная, яблочная, молочная, фумаровая, бензойная, гликолевая. 35 глюконовая, янтарная и арилсульфоновая кислоты, например, p-толуолсульфоновая кислота.

Активные ингредиенты могут быть заключены в микрокапсулы, в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые 40 микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составляют в виде комплекса включения, такого как комплекс включения циклодекстрина, или в виде липосомы. Липосомы могут служить для нацеливания клеток-хозяев (например, Т-клеток или НК-клеток) на конкретную ткань. Для получения липосом доступно множество способов, таких как способы, описанные, например, в Szoka et al., Ann. Rev. 45 Biophys. Bioeng., 9: 467 (1980), и патентах США 4235871, 4501728, 4837028 и 5019369.

В фармацевтической композиции в некоторых аспектах можно использовать системы доставки с замедленным высвобождением, с отсроченным высвобождением и с продолжительным высвобождением, так что доставка композиции происходит до и с

достаточным временем, чтобы вызвать сенсibilизацию участка, подлежащего лечению. Доступны и известны многие типы систем доставки с определенным высвобождением. Такие системы могут избежать повторного введения композиции, тем самым увеличивая удобство для субъекта и врача.

5 Фармацевтическая композиция в некоторых вариантах осуществления содержит клетки в количествах, эффективных для лечения или профилактики заболевания или состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество. Терапевтическую или профилактическую эффективность в некоторых вариантах осуществления контролируют путем периодической оценки подвергнутых
10 лечению субъектов. Для повторных введений в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение повторяют до тех пор, пока не произойдет необходимое подавление симптомов заболевания. Тем не менее, могут быть полезны и могут быть определены другие схемы дозировки. Необходимую дозу можно доставлять с помощью однократного болюсного введения композиции, многократного болюсного
15 введения композиции или непрерывного инфузионного введения композиции.

Клетки можно вводить с использованием стандартных методик введения, готовых форм и/или устройств. Для хранения и введения композиций предоставлены готовые формы и устройства, такие как шприцы и флаконы. Введение клеток может быть аутологичным или гетерологичным. Например, иммунореактивные клетки или
20 предшественники можно получать от одного субъекта и вводить тому же субъекту или другому совместимому субъекту. Полученные из периферической крови иммунореактивные клетки или их потомство (полученное, например, *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*,) можно вводить посредством локализованной инъекции, включая введение с помощью катетера, системную инъекцию, локализованную инъекцию, внутривенную
25 инъекцию или парентеральное введение. При введении терапевтической композиции (например, фармацевтической композиции, содержащей генетически модифицированную иммунореактивную клетку), она как правило будет составлена в виде инъекцируемой формы с разовой дозировкой (раствор, суспензия, эмульсия).

Готовые формы включают готовые формы для перорального, внутривенного,
30 внутрибрюшинного, подкожного, легочного, трансдермального, внутримышечного, интраназального, буккального, подъязычного или суппозиторного введения. В некоторых вариантах осуществления популяции клеток вводят парентерально. термин «парентеральное» в рамках изобретения включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное и внутрибрюшинное введение. В некоторых
35 вариантах осуществления популяции клеток вводят субъекту с использованием периферической системной доставки путем внутривенной, внутрибрюшинной или подкожной инъекции.

Композиции в некоторых вариантах осуществления представлены в виде стерильных жидких препаратов, например, изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий,
40 дисперсий или вязких композиций, которые в некоторых аспектах могут быть забуферены до выбранного pH. Жидкие препараты обычно легче приготовить, чем гели, другие вязкие композиции и твердые композиции. Кроме того, жидкие композиции несколько удобнее вводить, особенно путем инъекции. С другой стороны, вязкие композиции, могут быть составлены в пределах соответствующего диапазона вязкости, чтобы обеспечить более длительные периоды контакта с конкретными тканями. Жидкие или вязкие композиции могут содержать носители, которыми могут быть растворители или диспергирующая среда, содержащая, например, воду, физиологический раствор, солевой раствор с фосфатным буфером, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль,

жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси.

Стерильные растворы для инъекций можно получать путем включения клеток в растворитель, такой как смесь с подходящим носителем, разбавителем или вспомогательным средством, таким как стерильная вода, физиологический раствор, глюкоза, декстроза и тому подобное. Композиции также могут быть лиофилизированы. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие, диспергирующие или эмульгирующие агенты (например, метилцеллюлоза), рН-буферные агенты, гелеобразующие или повышающие вязкость добавки, консерванты, ароматизаторы, красители и тому подобное, в зависимости от способа введения и требуемого препарата. В некоторых аспектах для получения подходящих препаратов можно получить консультацию по стандартным руководствам.

можно добавлять разные добавки, которые повышают стабильность и стерильность композиций, включая противомикробные консерванты, антиоксиданты, хелатирующие агенты и буферы. Предотвращение действия микроорганизмов можно обеспечить с помощью разных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и тому подобное. Пролонгированная абсорбция инъектируемой фармацевтической формы может быть достигнута путем использования замедляющих абсорбцию средств, например, моностеарата алюминия и желатина.

можно получить препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие антитело, причем эти матрицы имеют вид формованных изделий, например, пленок или микрокапсул.

Готовые формы, используемые для введения *in vivo*, обычно являются стерильными. Стерильности можно легко добиться, например, с помощью фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

В. Способы введения

Представлены способы введения клеток, популяций и композиций и варианты применения таких клеток, популяций и композиций для лечения или профилактики заболеваний, состояний и расстройств, включая рак. В некоторых вариантах осуществления клетки, популяции и композиции вводят субъекту или пациенту, имеющему конкретное заболевание или состояние, подлежащее лечению, например, посредством адоптивной клеточной терапии, такой как адоптивная Т-клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления клетки и композиции, полученные с помощью представленных способов, такие как сконструированные композиции и композиции конечного этапа производства после инкубации и/или других стадий обработки, вводят субъекту, такому как субъект, имеющий или с риском заболевания или состояния. В некоторых аспектах с помощью способов таким образом лечат, например, ослабляют один или более симптом заболевания или состояния, например, за счет уменьшения массы опухоли при раке, экспрессирующем антиген, распознаваемый сконструированной Т-клеткой.

Способы введение клеток для адоптивной клеточной терапии известны, их и можно использовать в сочетании с представленными способами и композициями. Например, способы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в публикации заявки на выдачу патента США № 2003/0170238 Gruenberg et al; патенте США № 4690915 Rosenberg; Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol.* 8(10):577-85). См., например, Themeli et al. (2013) *Nat Biotechnol.* 31(10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338.

В рамках изобретения «субъектом» является млекопитающее, такое как человек или другое животное, и обычно человек. В некоторых вариантах осуществления субъектом, например, пациентом, которому вводят клетки, популяции клеток или композиции, является млекопитающее, обычно примат, такой как человек. В некоторых вариантах осуществления приматом является обезьяна или человекообразная обезьяна. Субъектом может быть самец или самка, и он может быть любого подходящего возраста, включая младенцев, подростков, молодых людей, взрослых и пожилых людей. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой не являющееся приматом млекопитающее, например, грызун.

В рамках изобретения «лечение» (и его грамматические варианты, такие как «лечить») относится к полному или частичному ослаблению или уменьшению заболевания или состояния или расстройства, или симптома, неблагоприятного эффекта или результата, или связанного с ним фенотипа. Необходимые результаты лечения включают, но без ограничения, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, ослабление симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, уменьшение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или смягчение болезненного состояния и ремиссия или улучшение прогноза. Термины не подразумевают полного излечения заболевания или полного устранения каких-либо симптомов или воздействия (воздействий) на все симптомы или результаты.

В рамках изобретения «задержка развития заболевания» означает отсрочку, задержку, замедление, затормаживание, стабилизацию, подавление и/или откладывание развития заболевания (такого как рак). Эта задержка может быть различной продолжительности времени в зависимости от истории заболевания и/или индивидуума, которого лечат. Как очевидно для специалиста в данной области, достаточная или значительная задержка может, по сути, включать профилактику, поскольку у индивидуума не развивается заболевание. Например, можно отсрочить позднюю стадию рака, например, развитие метастазирования.

«Предотвращение» в рамках изобретения включает обеспечение профилактики в отношении возникновения или рецидива заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого заболевание еще не было диагностировано. В некоторых вариантах осуществления предоставленные клетки и композиции используют для задержки развития заболевания или для замедления прогрессирования заболевания.

В рамках изобретения «подавлять» функцию или активность означает уменьшать функцию или активность по сравнению с другими такими же состояниями, за исключением представляющего интерес состояния или параметра, или, альтернативно, по сравнению с другим состоянием. Например, клетки, которые подавляют рост опухоли, снижают скорость роста опухоли по сравнению со скоростью роста опухоли в отсутствие клеток.

«Эффективное количество» агента, например фармацевтической готовой формы, клеток или композиции, в контексте введения относится к количеству, эффективному в дозировках/количествах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата, такого как терапевтический или профилактический результат.

«Терапевтически эффективное количество» агента, например, фармацевтической готовой формы или клеток, относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения необходимого терапевтического результата, например, для лечения заболевания, состояния или

расстройства и/или фармакокинетического или фармакодинамического результата лечения. Терапевтически эффективное количество может варьировать в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и вес субъекта и популяции вводимых клеток. В некоторых вариантах осуществления предоставленные способы включают введение клеток и/или композиций в эффективных количествах, например терапевтически эффективных количествах.

«Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата. Обычно, но не обязательно, поскольку профилактическую дозу используют у субъектов до или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество.

Заболевание или состояние, которое лечат, может быть любым, при котором экспрессия антигена связана и/или участвует в этиологии болезненного состояния или расстройства, например, вызывает, усугубляет или иным образом участвует в таком заболевании, состоянии или расстройстве. Иллюстративные заболевания и состояния могут включать заболевания или состояния, связанные со злокачественным новообразованием или трансформацией клеток (например, раком), аутоиммунным или воспалительным заболеванием или инфекционным заболеванием, например, вызванным бактериальным, вирусным или другим патогеном. Иллюстративные антигены, которые включают антигены, связанные с различными заболеваниями и состояниями, которые можно лечить, описаны выше. В конкретных вариантах осуществления химерный антигенный рецептор или трансгенный TCR специфически связывается с антигеном, связанным с заболеванием или состоянием.

Таким образом, предоставленные способы и варианты применения включают способы и варианты применения для адоптивной клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение клеток или композиции, содержащей клетки, субъекту, в ткань или клетку, например, с риском или подозрением на наличие заболевания, состояния или расстройства. В некоторых вариантах осуществления клетки, популяции и композиции вводят субъекту, имеющему конкретное заболевание или состояние, подлежащее лечению, например, посредством адоптивной клеточной терапии, такой как адоптивная Т-клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления клетки или композиции вводят субъекту, такому как субъект, имеющий или с риском заболевания или состояния, ослабляют один или несколько симптомов заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию, осуществляют путем аутологичного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают у субъекта, который должен получить клеточную терапию, или из образца, полученного у такого субъекта. Таким образом, в некоторых аспектах клетки получают у субъекта, например, пациента, нуждающегося в лечении, и клетки после выделения и обработки вводят тому же субъекту.

В некоторых вариантах осуществления клеточную терапию, например, адоптивную Т-клеточную терапию, осуществляют путем аллогенного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают у субъекта, отличного от субъекта, который должен получить или который в конечном итоге получает клеточную терапию, например, первого субъекта. В таких вариантах осуществления клетки затем вводят другому субъекту, например второму субъекту того же вида. В некоторых вариантах осуществления первый и второй субъекты являются генетически идентичными. В

некоторых вариантах осуществления первый и второй субъекты генетически сходны. В некоторых вариантах осуществления второй субъект экспрессирует HLA того же класса или супертипа, что и первый субъект. Клетки можно вводить любым подходящим способом. Способ введения и дозы могут частично зависеть от того, является ли введение кратковременным или постоянным. Различные схемы лечения включают, но без ограничения, однократное или многократное введение в различные моменты времени, болюсное введение и импульсную инфузию.

В некоторых вариантах осуществления клетки или отдельные популяции подтипов клеток вводят субъекту в диапазоне от приблизительно одного миллиона до приблизительно 100 миллиардов клеток и/или такого количества клеток на килограмм массы тела, как, например, от 1 миллиона до приблизительно 50 миллиардов клеток (например, приблизительно 5 миллионов клеток, приблизительно 25 миллионов клеток, приблизительно 500 миллионов клеток, приблизительно 1 миллиард клеток, приблизительно 5 миллиардов клеток, приблизительно 20 миллиардов клеток, приблизительно 30 миллиардов клеток, приблизительно 40 миллиардов клеток или диапазон, ограниченный любыми двумя из вышеупомянутых значений), например, от приблизительно 10 миллионов до приблизительно 100 миллиардов клеток (например, приблизительно 20 миллионов клеток, приблизительно 30 миллионов клеток, приблизительно 40 миллионов клеток, приблизительно 60 миллионов клеток, приблизительно 70 миллионов клеток, приблизительно 80 миллионов клеток, приблизительно 90 миллионов клеток, приблизительно 10 миллиардов клеток, приблизительно 25 миллиардов клеток, приблизительно 50 миллиардов клеток, приблизительно 75 миллиардов клеток, приблизительно 90 миллиардов клеток или диапазон, ограниченный любыми двумя из вышеупомянутых значений), а в некоторых случаях от приблизительно 100 миллионов клеток до приблизительно 50 миллиардов клеток (например, приблизительно 120 миллионов клеток, приблизительно 250 миллионов клеток, приблизительно 350 миллионов клеток, приблизительно 450 миллионов клеток, приблизительно 650 миллионов клеток, приблизительно 800 миллионов клеток, приблизительно 900 миллионов клеток, приблизительно 3 миллиарда клеток, приблизительно 30 миллиардов клеток, приблизительно 45 миллиардов клеток) или любое значение между этими диапазонами и/или на килограмм массы тела. Опять же дозировки могут варьировать в зависимости от особенностей, специфических для заболевания или расстройства и/или пациента и/или других способов лечения. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят как часть комбинированного лечения, например, одновременно или последовательно, в любом порядке, с другим терапевтическим вмешательством, таким как антитело или сконструированная клетка или рецептор или агент, такой как цитотоксический или терапевтический агент. Клетки в некоторых вариантах осуществления вводят совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами или в сочетании с другим терапевтическим вмешательством, либо одновременно, либо последовательно в любом порядке. В некоторых случаях клетки вводят совместно с другой терапией, достаточно близко по времени, чтобы клеточные популяции усиливали действие одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов или наоборот. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят до введения одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах клетки вводят после введения одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько дополнительных агентов включают цитокин, такой как IL-2, например, для усиления персистенции. В некоторых вариантах осуществления

способы включают введение химиотерапевтического агента.

После введения клеток биологическую активность сконструированных клеточных популяций в некоторых вариантах осуществления измеряют, например, с помощью любого из ряда известных способов. Параметры оценки включают специфическое связывание сконструированной или природной Т-клетки или другой иммунной клетки с антигеном *in vivo*, например, с помощью визуализации или *ex vivo*, например, с помощью ELISA или проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления способность сконструированных клеток разрушать клетки-мишени можно измерить с использованием любого подходящего способа, известного в данной области, такого как анализы цитотоксичности, описанные, например, в Kochenderfer et al., *J. Immunotherapy*, 32 (7): 689-702 (2009) и Herman et al. *J. Immunological Methods*, 285 (1): 25-40 (2004). В некоторых вариантах осуществления биологическую активность клеток измеряют путем анализа экспрессии и/или секреции одного или нескольких цитокинов, таких как CD 107a, IFN γ , IL-2 и TNF. В некоторых аспектах биологическую активность измеряют путем оценки клинического результата, такого как уменьшение массы опухоли или нагрузки.

В определенных вариантах осуществления сконструированные клетки дополнительно модифицируют с помощью любого количества способов, так что их терапевтическая или профилактическая эффективность увеличивается. Например, сконструированный CAR или TCR, экспрессируемый популяцией, может быть конъюгирован либо прямо, либо косвенно через линкер с нацеливающим фрагментом. Практика конъюгирования соединений, например CAR или TCR, с нацеливающими фрагментами известна в данной области. См., например, Wadwa et al., *J. Drug Targeting* 3: 11 (1995) и патент США 5087616.

VI. Определения

В рамках изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не предписывает иное. Например, формы единственного числа означают «по меньшей мере один» или «один или несколько». Понятно, что аспекты и варианты, описанные в данном документе, включают в себя «состоящий» и/или «состоящий по существу из» аспектов и вариантов.

На всем протяжении этого раскрытия различные аспекты заявленного объекта изобретения представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона дано просто для удобства и краткости и не должно рассматриваться как негибкое ограничение объема заявленного объекта изобретения. Соответственно, следует считать, что описание диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в этом диапазоне. Например, когда представлен диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим установленным или промежуточным значением в указанном диапазоне входит в заявленный предмет изобретения. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также охвачены заявленным объектом изобретения с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба из этих пределов, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включены в заявленный объект изобретения. Это применимо независимо от широты диапазона.

Термин «приблизительно» в рамках настоящего изобретения относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, известному специалисту в данной области техники. Ссылка на «приблизительное» значение или параметр в данном документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на

это значение или параметр как таковые. Например, описание, относящееся к «приблизительно X», включает описание «X». В конкретных вариантах осуществления «приблизительно» составляет $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, $\pm 0,1\%$, $\pm 0,01\%$ или $\pm 0,001\%$.

5 В рамках изобретения композиция относится к любой смеси двух или более продуктов, веществ или соединений, включая клетки. Это может быть раствор, суспензия, жидкость, порошок, паста, водная, неводная или любая их комбинация.

В рамках изобретения «обогащение» при ссылке на один или более конкретных типов клеток или популяций клеток относится к увеличению количества или процентного значения типа или популяции клеток, например, по сравнению с общим количеством клеток в композиции или объеме композиции или относительно других типов клеток, например, за счет положительного отбора на основе маркеров, экспрессируемых популяцией или клеткой, или за счет отрицательного отбора на основе маркера, отсутствующего в популяции клеток или на клетке, подлежащей истощению. термин не требует полного удаления из композиции других клеток, типа клеток или популяций и не требует, чтобы обогащенные клетки присутствовали в обогащенной композиции или даже близко к ней на уровне 100%.

В рамках изобретения утверждение, что клетка или популяция клеток является «положительной» для конкретного маркера, относится к обнаруживаемому присутствию на или в клетке определенного маркера, обычно маркера поверхности. При ссылке на маркер поверхности термин относится к наличию поверхностной экспрессии, обнаруживаемой с помощью проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и обнаружения указанного антитела, где окрашивание выявляют с помощью проточной цитометрии на уровне, существенно превышающем обнаруженное окрашивание, осуществляя ту же процедуру с изотипически сходным контролем в других идентичных условиях и/или на уровне, по существу аналогичном уровню для клетки, о которой известно, что она является положительной для маркера, и/или на уровне, существенно более высоком чем для клетки, известной как отрицательная для маркера.

30 В рамках изобретения утверждение, что клетка или популяция клеток является «отрицательной» для конкретного маркера, относится к отсутствию существенного обнаруживаемого присутствия на или в клетке конкретного маркера, обычно маркера поверхности. При ссылке на маркер поверхности термин относится к отсутствию поверхностной экспрессии, обнаруживаемой с помощью проточной цитометрии, например, путем окрашивания антителом, которое специфически связывается с маркером, и обнаружения указанного антитела, где окрашивание не обнаруживают с помощью проточной цитометрии на уровне, существенно превышающем выявленное окрашивание, выполняя ту же самую процедуру с изотипически сходным контролем в других идентичных условиях и/или на уровне, существенно более низком, чем уровень для клетки, о которой известно, что она является положительной для маркера, и/или на уровне по существу схожим с клеткой, которая, как известно, является отрицательной для маркера.

Термин «экспрессия», в рамках изобретения относится к процессу, с помощью которого полипептид получают на основе кодирующей последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, такой как ген. Процесс может включать транскрипцию, посттранскрипционный контроль, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционный контроль, посттрансляционную модификацию или любую их комбинацию.

В рамках изобретения субъект включает в себя любой живой организм, например, людей и других млекопитающих. Млекопитающие включают в себя, но без ограничения, людей, и нечеловеческих животных, включая сельскохозяйственных животных, спортивных животных, грызунов и домашних животных.

5 В рамках изобретения контроль относится к образцу, который по существу идентичен тестируемому образцу, за исключением того, что его не обрабатывают тестируемым параметром, или если он представляет собой образец плазмы, он может быть от нормального добровольца, не имеющим интересующего состояния. контролем также может быть внутренний контроль.

10 VII. Иллюстративные Варианты осуществления

Среди предоставленных вариантов осуществления:

1. Олигомерный реагент в виде частиц, содержащий множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина, при этом размер олигомерного реагента в виде частиц представляет собой i) радиус больше чем 25 нм, ii) молекулярную массу
15 по меньшей мере 5×10^6 г/моль; и/или (iii) по меньшей мере 100 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина на олигомерный реагент в виде частиц.

2. Олигомерный реагент в виде частиц согласно варианту осуществления 1, при этом молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина связываются или способны связываться с биотином, авидином, аналогом или мутеином биотина, аналогом или
20 мутеином авидина и/или их биологически активным фрагментом или стрептавидин-связывающим пептидом.

3. Олигомерный реагент в виде частиц согласно варианту осуществления 2, при этом молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина обратимо связываются или способны обратимо связываться с биотином, авидином, аналогом или мутеином биотина,
25 аналогом или мутеином авидина и/или их биологически активным фрагментом или стрептавидин-связывающим пептидом.

4. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 1-3, при этом олигомерный реагент в виде частиц содержит множество молекул мутеина стрептавидина, при этом молекулы мутеина стрептавидина содержат аминокислотную
30 последовательность Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ или Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ в позициях последовательности, соответствующих позициям 44-47 со ссылкой на позиции в стрептавидине в последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO: 1.

5. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 1-4, при этом олигомерный реагент в виде частиц содержит множество молекул мутеина стрептавидина, которые содержат:
35

а) последовательность аминокислот, приведенную в любой из SEQ ID NO: 3-6, 27, 28, 60 или 61;

б) последовательность аминокислот, которые демонстрируют по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более
40 идентичность последовательности с любой SEQ ID NO: 3-6, 27, 28, 60 или 61 и содержат аминокислотную последовательность, соответствующую Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ или Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷, и/или обратимо связываются с биотином или его биологически активной формой, аналогом или мутеином биотина или их биологически активным
45 фрагментом или стрептавидин-связывающим пептидом; или

с) функциональный фрагмент а) или б), который обратимо связывается с биотином или его биологически активной формой, аналогом или мутеином биотина или их биологически активным фрагментом или стрептавидин-связывающим пептидом.

6. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 1-5, при этом олигомерный реагент в виде частиц содержит множество молекул мутеина стрептавидина, которые содержат последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 6 или 61.

5 7. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 4-6, при этом молекула мутеина стрептавидина дополнительно содержит аминокислотную замену или замены в позиции, соответствующей 117, 120 и/или 121 со ссылкой на позиции в стрептавидине в последовательности аминокислот, приведенной в SEQ ID NO:1.

10 8. Олигомерный реагент в виде частиц согласно варианту осуществления 7, при этом: аминокислотную замену или замены выбирают из Glu117, Asp117, Arg117, Ser120, Ala120, Gly120, Trp121, Tyr121 или Phe121; или аминокислотную замену или замены выбирают из одного или более из Glu117, Gly120 или Tyr121; или

15 аминокислотные замены выбирают из Glu117, Gly120 или Tyr121.

9. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 1-8, при этом олигомерный реагент в виде частиц содержит множество молекул мутеина стрептавидина, которые содержат:

а) последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 27 или 28;

20 б) последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с SEQ ID NO: 28 и содержит аминокислотную последовательность, соответствующую Val⁴⁴, Thr⁴⁵, Ala⁴⁶, Arg⁴⁷, Glu¹¹⁷, Gly¹²⁰ и Tyr¹²¹, и/или обратимо связывается с биотином или биологически активным фрагментом, аналогом или мутеином биотина или их биологически активным фрагментом или стрептавидин-связывающим пептидом; или

25

с) функциональный фрагмент а) или б), который обратимо связывается с биотином или биологически активным фрагментом, аналогом или мутеином биотина или их биологически активным фрагментом или стрептавидин-связывающим пептидом.

30 10. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 1-9, при этом олигомерный реагент в виде частиц связан или способен связываться с одним или более агентами.

11. Олигомерный реагент в виде частиц согласно варианту осуществления 10, при этом один или более агентов содержат партнера по связыванию, при этом партнер по связыванию способен связываться, необязательно обратимо связываться, с одним или более участком связывания на олигомерном реагенте в виде частиц.

35

12. Олигомерный реагент в виде частиц согласно варианту осуществления 11, при этом партнер по связыванию содержит стрептавидин-связывающий пептид.

40 13. Олигомерный реагент в виде частиц согласно варианту осуществления 11 или 12, при этом партнер по связыванию содержит стрептавидин-связывающий пептид, выбираемый из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19).

45

14. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 10-13, при этом один или более агентов связывается или способен связываться с

молекулой, экспрессированной на поверхности клетки-мишени.

15. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 10-14, при этом один или более агентов представляет собой или содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

5 16. Олигомерный реагент в виде частиц согласно варианту осуществления 15, при этом один или более реагентов представляет собой или содержит фрагмент моновалентного антитела.

17. Олигомерный реагент в виде частиц согласно варианту осуществления 15 или варианту осуществления 16, при этом один или более агентов представляет собой или
10 содержит Fab.

18. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 10-17, при этом один или более агентов представляет собой рецептор-связывающий агент, который связывается или способен связываться с рецептором, экспрессированным на поверхности клетки-мишени.

15 19. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 10-18, при этом рецептор-связывающий агент представляет собой или содержит стимулирующий агент, способный связываться с молекулой на поверхности клетки-мишени, при этом связывание вызывает или модулирует сигнал в клетке-мишени.

20. Олигомерный реагент в виде частиц согласно варианту осуществления 18 или
20 пункту 19, при этом клеткой-мишенью является иммунная клетка.

21. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 18-20, при этом клетка-мишень представляет собой Т-клетку.

22. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 18-21, при этом рецептор-связывающий агент способен инициировать связанный с
25 комплексом TCR/CD3 сигнал в Т-клетках, связывается с элементом комплекса TCR/CD3; и/или специфически связывается с CD3.

23. Олигомерный реагент в виде частиц согласно варианту осуществления 22, при этом стимулирующий агент представляет собой первый рецептор-связывающий агент, а олигомерный реагент в виде частиц содержит второй рецептор-связывающий агент,
30 при этом второй рецептор-связывающий агент способен специфически связываться со второй молекулой на поверхности клетки-мишени, причем это связывание со второй молекулой необязательно способно индуцировать или модулировать сигнал в клетках-мишенях.

24. Олигомерный реагент в виде частиц согласно варианту осуществления 23, при
35 этом второй рецептор-связывающий агент специфически связывается с костимулирующей молекулой, вспомогательной молекулой, молекулой иммунной контрольной точки, представляет собой член семейства TNF или рецептор семейства TNF, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор или представляет собой или содержит молекулу адгезии или фактор, который вызывает выработку цитокина, выработку хемокина и/
40 или экспрессию молекулы адгезии.

25. Олигомерный реагент в виде частиц согласно варианту осуществления 22 или варианту осуществления 23, при этом второй рецептор-связывающий агент специфически связывается с костимулирующей молекулой, а костимулирующей молекулой является CD28.

45 26. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 10-25, при этом один или более агентов представляет собой антитело против CD3 и антитело против CD28, необязательно Fab против CD3 и Fab против CD28.

27. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления

18-21, при этом рецептор-связывающий агент специфически связывается с костимулирующей молекулой, вспомогательной молекулой, молекулой иммунной контрольной точки, представляет собой член семейства TNF или рецептор семейства TNF, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор или представляет собой или
5 содержит молекулу адгезии или фактор, который вызывает выработку цитокина, выработку хемокина и/или экспрессию молекулы адгезии.

28. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 18-21, 23 или 24, при этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) связывается с костимулирующей или вспомогательной молекулой, а
10 костимулирующую или вспомогательную молекулу выбирают из CD28, CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 или HVEM.

29. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 18-21, 23 или 24, при этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) специфически связывается с цитокиновым рецептором, а цитокиновый рецептор
15 выбирают из IL-2R, IL-1R, IL-15R, IFN-гаммаR, TNF-альфаR, IL-4R, IL-10R, IFNR I типа, IL-12R, IL-15R, IL-17R, TNFR1 и TNFR2.

30. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 18-21, 23 или 24, при этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) специфически связывается с хемокиновым рецептором, а хемокиновый рецептор
20 выбирают из CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR9, CXCR1, CXCR3 и CXCR4.

31. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 18-21, 23 или 24, при этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой фактор, который вызывает выработку цитокина или хемокина, а фактор представляет собой лиганд, который специфически связывается с рецептором
25 цитокина или хемокина.

32. Олигомерный реагент в виде частиц согласно варианту осуществления 31, при этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой лиганд, который специфически связывается с цитокиновым рецептором, при этом лиганд специфически связывает IL-2R, IL-1R, IL-15R, IFN-гаммаR, TNF-альфаR, IL-
30 4R, IL-10R, IFNR I типа, IL-12R, IL-15R, IL-17R, TNFR1 и TNFR2; и/или лиганд выбирают из IL-2, IL-1, IL-15, IFN-гамма, TNF-альфа, IL-4, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17 и TNF, или он представляет собой их биологически активный фрагмент.

33. Олигомерный реагент в виде частиц согласно варианту осуществления 30, при этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой лиганд, который специфически связывается с хемокиновым рецептором, при этом
35 этом

лиганд специфически связывается с хемокиновым рецептором, выбираемым из CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR9, CXCR1, CXCR3 и CXCR4; или

лиганд выбирают из CXCL9, CXCL10, CCL19, CCL21 и CCL25, или он представляет собой их биологически активный фрагмент.
40

34. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 18-21, 23 или 24, при этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой молекулу адгезии, и молекулу адгезии выбирают из CD44, CD31, CD18/CD11a (LFA-1), CD29, CD54 (ICAM-1), CD62L (L-селектина) и CD29/CD49d
45 (VLA-4), CD106 (VCAM-1), или она представляет собой их биологически активный фрагмент.

35. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 10-34, при этом один или более агентов представляет собой селективный агент, при

этом селективный агент связывается или способен связываться с селективным маркером, который экспрессируется на поверхности клетки-мишени.

36. Олигомерный реагент в виде частиц согласно варианту осуществления 35, при этом клеткой-мишенью является иммунная клетка.

5 37. Олигомерный реагент в виде частиц согласно варианту осуществления 35 или варианту осуществления 36, при этом клетка-мишень представляет собой лимфоцит или антигенпредставляющую клетку.

38. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 35-37, при этом клетка-мишень представляет собой Т-клетку, В-клетку, НК-клетку,
10 макрофаг или дендритную клетку.

39. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 35-38, при этом клетка-мишень представляет собой Т-клетку.

40. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 35-39, при этом селективным маркером является CD25, CD28, CD62L, CCR7, CD27,
15 CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO.

41. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 1-40, при этом олигомерный реагент в виде частиц имеет радиус больше чем 25 нм, больше чем 50 нм, больше чем 60 нм, больше чем 70 нм, больше чем 80 нм или больше чем 90 нм.

20 42. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 1-41, при этом олигомерный реагент в виде частиц имеет радиус между 25 нм и 150 нм, между 50 нм и 150 нм, между 75 нм и 125 нм, между 80 нм и 115 нм или между 90 нм и 110 нм, включительно, или $90 \text{ нм} \pm 15 \text{ нм}$ или $95 \text{ нм} \pm 20\text{-}25 \text{ нм}$.

43. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 1-42, при этом олигомерный реагент в виде частиц имеет радиус менее чем 150 нм.

44. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 41-43, при этом радиус представляет собой гидродинамический радиус.

45. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 1-44, при этом олигомерный реагент в виде частиц имеет молекулярную массу по
30 меньшей мере 1×10^7 г/моль, по меньшей мере 5×10^7 г/моль или по меньшей мере 1×10^8 г/моль.

46. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 1-45, при этом олигомерный реагент в виде частиц имеет молекулярную массу между
35 1×10^6 г/моль и 1×10^{10} г/моль, между 1×10^7 г/моль и 1×10^9 г/моль, между 5×10^7 г/моль и 5×10^8 г/моль, между 1×10^8 г/моль и 5×10^8 г/моль или между 1×10^8 г/моль и 2×10^8 г/моль.

47. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 1-46, при этом олигомерный реагент в виде частиц содержит по меньшей мере 100 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, по меньшей мере 500 тетрамеров
40 стрептавидина или мутеина стрептавидина, по меньшей мере 1000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, по меньшей мере 1500 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина или по меньшей мере 2000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина.

48. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 1-47, при этом олигомерный реагент в виде частиц содержит между 100 и 50000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, между 1000 и 20000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина, между 1000 и 10000 тетрамеров стрептавидина или мутеина стрептавидина или между 2000 и 5000 тетрамеров

стрептавидина или мутеина стрептавидина.

49. Олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 1-48, при этом множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина содержат лизиновые остатки, при этом менее чем 20%, 10%, 5%, 1% лизиновых остатков содержат N-замещенный имиотиолан.

50. Композиция, содержащая один или более олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 1-49.

51. Композиция согласно варианту осуществления 50, при этом один или более олигомерных реагентов в виде частиц представляет собой множество олигомерных реагентов в виде частиц.

52. Композиция согласно варианту осуществления 51, при этом множество олигомерных реагентов в виде частиц имеют i) средний радиус больше чем 70 нм; ii) среднюю молекулярную массу по меньшей мере 1×10^8 г/моль; и/или iii) среднее количество стрептавидина или тетрамеров стрептавидина на олигомерный реагент в виде частиц по меньшей мере 2000 и/или iv) распределение размеров радиуса, в котором по меньшей мере 95% множества олигомерных реагентов в виде частиц имеют радиус между 10 нм и 150 нм.

53. Композиция согласно варианту осуществления 51 или 52, при этом множество олигомерных реагентов в виде частиц имеют средний радиус больше чем 25 нм, больше чем 50 нм, больше чем 60 нм, больше чем 70 нм, больше чем 80 нм, больше чем 90 нм или больше чем 100 нм.

54. Композиция согласно любому из вариантов осуществления 51-53, при этом: множество олигомерных реагентов в виде частиц имеют средний радиус между 25 нм и 150 нм, между 50 нм и 150 нм, между 75 нм и 125 нм, между 80 нм и 110 нм или между 90 нм и 110 нм, включительно; или

множество олигомерных реагентов в виде частиц имеют средний радиус $90 \text{ нм} \pm 15 \text{ нм}$, $95 \text{ нм} \pm 20\text{-}25 \text{ нм}$ или $97 \pm 10 \text{ нм}$.

55. Композиция согласно любому из вариантов осуществления 51-54, при этом по меньшей мере 95% множества олигомерных реагентов в виде частиц имеют радиус между 50 и 150 нм, между 70 нм и 140 нм, между 80 нм и 120 нм, между 80 нм и 115 нм, между 80 нм и 100 нм, между 90 нм и 110 нм и/или между 100 нм и 120 нм.

56. Композиция согласно любому из вариантов осуществления 51-55, при этом по меньшей мере 95% олигомерных реагентов в виде частиц имеют радиус в пределах $\pm 50\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$ и/или $\pm 5\%$ среднего и/или медианного радиуса множества олигомерных реагентов в виде частиц.

57. Композиция согласно любому из вариантов осуществления 51-56, при этом множество олигомерных реагентов в виде частиц имеют средний радиус между 80 нм и 115 нм, и, при этом по меньшей мере 95% олигомерных реагентов в виде частиц имеют радиус в пределах $\pm 25\%$ среднего радиуса.

58. Композиция согласно любому из вариантов осуществления 51-57, при этом множество частиц имеют среднюю молекулярную массу между 1×10^8 г/моль и 5×10^8 г/моль или между 1×10^8 г/моль и 2×10^8 г/моль, включительно.

59. Композиция согласно любому из вариантов осуществления 51-58, при этом множество олигомерных реагентов в виде частиц содержит среднее количество стрептавидина или тетрамеров стрептавидина на олигомерный реагент в виде частиц по меньшей мере 100, по меньшей мере 500, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 1500 или по меньшей мере 2000.

60. Композиция согласно любому из вариантов осуществления 51-59, при этом множество олигомерных реагентов в виде частиц содержит среднее количество стрептавидина или тетрамеров стрептавидина на олигомерный реагент в виде частиц между 100 и 50000, между 1000 и 20000, между 1000 и 10000 или между 2000 и 5000, всегда включительно.

61. Композиция согласно любому из вариантов осуществления 51-60, при этом средний радиус множества олигомерных частиц не увеличивается больше чем на 25% или 10% при хранении приблизительно при или ниже -80°C , приблизительно при или ниже -20°C и/или приблизительно при или ниже 4°C в течение по меньшей мере 1, 3, 9, 27 или 46 недель.

62. Композиция согласно любому из вариантов осуществления 51-61, при этом средний радиус множества олигомерных частиц не увеличивается больше чем на 10% при хранении приблизительно при или ниже 4°C в течение по меньшей мере одной недели.

63. Композиция согласно любому из вариантов осуществления 61-62, при этом средний радиус множества олигомерных частиц не увеличивается больше чем на 10% при хранении приблизительно при или ниже 4°C в течение по меньшей мере 3 недель.

64. Композиция согласно любому из пунктов 51-63, при этом средний радиус множества олигомерных частиц не увеличивается больше чем на 10% при хранении приблизительно при или ниже 4°C в течение по меньшей мере 9 недель.

65. Способ получения олигомерного реагента в виде частиц, содержащего стрептавидин или мутеин стрептавидина, причем способ включает:
инкубацию множества активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина, содержащих тиол-реактивную функциональную группу, способную реагировать с тиоловой функциональной группой, и множество тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина, содержащих одну или более тиоловую функциональную группу, с получением таким образом композиции частиц, содержащей олигомерные частицы стрептавидина или мутеина стрептавидина;

отделение олигомерных частиц от мономерных и/или меньших олигомерных молекул;
и

введение олигомерных частиц в контакт со стабилизирующим агентом, получая таким образом олигомерный реагент в виде частиц.

66. Способ согласно варианту осуществления 65, при этом множество активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина создают путем инкубации первого множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с активирующим агентом, который способен преобразовывать один или более аминов в тиол-реактивную функциональную группу.

67. Способ согласно варианту осуществления 65 или варианту осуществления 66, при этом множество тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина создают путем инкубации второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с тиолирующим агентом, который добавляет или способен добавлять тиоловую функциональную группу к одному или более лизиновому остатку.

68. Способ получения олигомерных реагентов в виде частиц, причем способ включает:
(а) инкубацию первого множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с активирующим агентом в условиях для преобразования одного или более аминов в тиол-реактивную группу, способную реагировать с тиоловой функциональной группой, с созданием таким образом множества активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина;

(b) инкубацию второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с тиолирующим агентом, который добавляет или способен добавлять тиоловую функциональную группу к одному или более лизиновому остатку, с созданием таким образом множества тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина;

5 и

(c) инкубацию множества активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с множеством тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина, с получением таким образом композиции частиц, содержащей олигомерные реагенты в виде частиц;

10

при этом способ осуществляют в условиях, в которых во время начала инкубации в (c) множество тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина таковы, что в среднем по меньшей мере 60% лизинов содержат тиоловую функциональную группу, и/или в среднем по меньшей мере 10 лизинов на тиолированный тетрамер стрептавидина или мутеина стрептавидина содержат тиоловую

15

функциональную группу.

69. Способ согласно варианту осуществления 68, дополнительно включающий отделение олигомерных реагентов в виде частиц от мономерных и/или меньших олигомерных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина.

20

70. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-69, при этом инкубацию первого множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с активирующим агентом проводят при молярном отношении стрептавидина или мутеина стрептавидина к активирующему реагенту между 1:1 и 1:10.

25

71. Способ согласно любому из вариантов осуществления 66-70, при этом инкубацию первого множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с активирующим агентом проводят при молярном отношении стрептавидина или мутеина стрептавидина к активирующему реагенту $1:2 \pm 2\%$.

72. Способ согласно любому из вариантов осуществления 66-71, при этом активирующий агент содержит гетеробифункциональное сшивающее средство.

30

73. Способ согласно любому из вариантов осуществления 66-72, при этом активирующий агент содержит сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо SMCC) и/или сукцинимидил-6-[(β -малеимидопропионамидо) гексаноат (SMPH)].

35

74. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-73, при этом тиол-реактивная функциональная группа представляет собой галоацетильную группу, малеимидную группу, азиридиновую группу, акрилоиловую группу, арилирующий агент, винилсульфоновую группу, пиридилдисульфид, TNB-тиол или дисульфидный восстанавливающий агент.

75. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-74, при этом тиол-реактивная функциональная группа представляет собой малеимидную группу.

40

76. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-75, при этом первое множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и активирующий агент инкубируют при нейтральном pH.

77. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-76, при этом первое множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и активирующий агент инкубируют при pH между 6,8 и 7,5.

45

78. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-77, при этом первое множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и активирующий агент инкубируют при pH между 7,0 и 7,4, необязательно при или приблизительно при 7,2.

79. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-78, при этом первое множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и активирующий агент инкубируют при температуре между 4°C и 39°C.

5 80. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-79, при этом первое множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и активирующий агент инкубируют при комнатной температуре, необязательно между 20°C и 25°C, необязательно при приблизительно 23°C или приблизительно 24°C.

10 81. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-80, при этом первое множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и активирующий агент инкубируют в течение от 15 минут до 6 часов или от 30 минут до 2 часов, всегда включительно.

15 82. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-81, при этом первое множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и активирующий агент инкубируют в течение от 45 минут до 1,5 часов, включительно, необязательно в течение или приблизительно в течение 1 часа.

20 83. Способ согласно любому из вариантов осуществления 66-82, при этом инкубацию второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с тиолирующим агентом проводят при молярном отношении тиолирующего реагента к каждому первичному амину между 10:1 и 1:1, включительно, на молекулу стрептавидина или мутеина стрептавидина.

25 84. Способ согласно любому из вариантов осуществления 66-83, при этом инкубацию второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с тиолирующим агентом проводят при молярном отношении между 1:50 и 1:500, включительно, тетрамера стрептавидина или мутеина стрептавидина к тиолирующему агенту.

30 85. Способ согласно любому из вариантов осуществления 66-84, при этом инкубацию второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с тиолирующим агентом проводят при молярном отношении составляющем или приблизительно 1:100 тетрамера стрептавидина или мутеина стрептавидина к активирующему реагенту.

35 86. Способ согласно любому из вариантов осуществления 66-85, при этом тиолирующий агент представляет собой или содержит 2-иминотиолан.

87. Способ согласно любому из вариантов осуществления 66-86, при этом второе множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолирующего агента инкубируют при pH 7,0 или более, необязательно между 7,0 и 8,0, включительно.

40 88. Способ согласно любому из вариантов осуществления 66-87, при этом второе множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолирующего агента инкубируют при pH приблизительно 7,7.

45 89. Способ согласно любому из вариантов осуществления 66-88, при этом инкубацию второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолирующего агента начинают в присутствии буфера с pH 8,0 или более, необязательно между 8,0 и 9,0, включительно.

90. Способ согласно любому из вариантов осуществления 66-89, при этом инкубацию второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолирующего агента начинают в присутствии буфера с pH равным или приблизительно равным 8,5.

91. Способ согласно варианту осуществления 89 или 90, при этом буфер содержит борат.

92. Способ согласно любому из вариантов осуществления 89-91, при этом буфер содержит 10 мМ-200 мМ бората или 50 мМ-100 мМ бората, всегда включительно, необязательно приблизительно 100 мМ бората.

93. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-92, при этом второе множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолирующего агента инкубируют при температуре между 4°C и 39°C.

94. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-93, при этом второе множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолирующего агента инкубируют при комнатной температуре, необязательно между 20°C и 25°C, необязательно при или приблизительно при 23°C или при или приблизительно при 24°C.

95. Способ согласно любому из вариантов осуществления 66-94, при этом второе множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолирующего агента инкубируют в течение от 15 минут до 2 часов или от 15 минут до 1,5 часов.

96. Способ согласно любому из вариантов осуществления 66-95, при этом второе множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолирующего агента инкубируют в течение от 15 минут до 2 часов или от 25 минут до 1 часа, всегда включительно.

97. Способ согласно любому из вариантов осуществления 66-96, при этом второе множество молекул стрептавидина и тиолирующего агента инкубируют в течение или приблизительно в течение 1 часа.

98. Способ согласно любому из вариантов осуществления 66-97, при этом второе множество молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолирующего агента инкубируют в течение или приблизительно в течение 25 минут.

99. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-98, при этом множество активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и множество тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина в процессе инкубации находятся в молярном соотношении 1:X, при этом X представляет собой количество лизиновых остатков, доступных для тиолирования, на молекулу стрептавидина или мутеина стрептавидина.

100. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-99, при этом молярное отношение составляет от 1:1 до 1:8 или от 1:2 до 1:6, необязательно равно или приблизительно равно 1:4.

101. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-100, при этом множество активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и множество тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина инкубируют при рН между 6,8 и 7,5, включительно.

102. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-101, при этом множество активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и множество тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина инкубируют при рН между 7,0 и 7,4, включительно.

103. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-102, при этом множество активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и множество тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина инкубируют при рН или приблизительно 7,2.

104. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-103, при этом множество активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и множество тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина инкубируют при температуре между 4°C и 39°C, включительно.

105. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-104, при этом множество активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и множество тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина

инкубируют при комнатной температуре, необязательно между 20°C и 25°C, включительно, необязательно при или приблизительно при 23°C или при или приблизительно при 24°C.

106. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-105, при этом множество активированных молекул стрептавидина и множество тиолированных молекул стрептавидина инкубируют в течение от 15 минут до 6 часов или от 30 минут до 2 часов, всегда включительно.

107. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-106, при этом множество активированных молекул стрептавидина и множество тиолированных молекул стрептавидина инкубируют в течение от 45 минут до 1,5 часов, включительно, необязательно в течение или приблизительно в течение 1 часа.

108. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-107, при этом инкубацию активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина заканчивают путем введения молекул в контакт с N-этилмалеимидом (NEM).

109. Способ согласно любому из вариантов осуществления 68-108, при этом по меньшей мере часть инкубации первого множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с активирующим агентом и по меньшей мере часть инкубации второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с тиолирующим агентом осуществляют отдельно в одно и то же время.

110. Способ согласно варианту осуществления 109, при этом инкубацию первого множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с активирующим агентом и инкубацию второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с тиолирующим агентом осуществляют в течение по существу одного и того же периода времени и/или выполняют по существу в одно и то же время.

111. Способ согласно любому из вариантов осуществления 68-110, при этом перед инкубацией тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина способ включает:

(i) удаление активирующего агента из композиции, содержащей активированные молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина; и/или

(ii) удаление тиолирующего агента из композиции, содержащей тиолированные молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина.

112. Способ согласно любому из вариантов осуществления 68-111, при этом инкубацию множества активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина и множества тиолированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина начинают в пределах 15 минут после окончания инкубации второго множества молекул стрептавидина с тиолирующим агентом и/или после удаления тиолирующего агента из композиции, содержащей тиолированные молекулы стрептавидина или мутеина стрептавидина.

113. Способ получения олигомерных реагентов в виде частиц, включающий:

инкубацию первого множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с сукцинимидил-6-[(β-малеимидопропионамидо)гексаноатом (SMPH) в течение или приблизительно в течение 1 часа при pH равном или приблизительно равном 7,2 с созданием таким образом множества активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина, содержащих малеимидную реагирующую с тиолом функциональную группу;

инкубацию второго множества молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с 2-иминотиолоном в течение или приблизительно в течение 1 часа при pH между 7,5 и

8,5, включительно, с созданием таким образом множества тиолированных молекул стрептавидина, содержащих одну или более тиоловых функциональных групп; и инкубацию множества активированных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с множеством тиолированных молекул стрептавидина в течение или

5 приблизительно в течение 1 часа при pH равном или приблизительно равном 7,2 с получением таким образом композиции частиц, содержащей олигомерные реагенты в виде частиц;

при этом инкубацию множества активированных молекул стрептавидина с множеством тиолированных молекул стрептавидина начинают в пределах 10 минут

10 после инкубации второго множества молекул стрептавидина с 2-иминотиолановыми концами.

114. Способ согласно любому из вариантов осуществления 68-113, при этом способ дополнительно включает введение в контакт олигомерных реагентов в виде частиц со стабилизирующим агентом.

15 115. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-67 или 114, при этом стабилизирующий агент снижает количество N-замещенного иминотиолана, присутствующего на лизиновых остатках олигомерных реагентов в виде частиц.

116. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-67 или 114-115, при этом стабилизирующий агент снижает количество N-замещенного иминотиолана,

20 присутствующего на лизиновых остатках олигомерных реагентов в виде частиц по меньшей мере на 25%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%.

117. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-67 и 114-116, при этом стабилизирующий агент содержит гидроксилламин.

25 118. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-67 и 114-117, при этом стабилизирующий агент удаляют из олигомерных реагентов в виде частиц с помощью хроматографии, необязательно с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC).

119. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-118, при этом олигомерные реагенты в виде частиц имеют радиус менее чем 150 нм.

30 120. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-119, дополнительно включающий фильтрующую стерилизацию олигомерных реагентов в виде частиц.

121. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-67 и 69-120, при этом олигомерные реагенты в виде частиц отделяют от мономерных или меньших олигомерных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина с помощью

35 эксклюзионной хроматографии.

122. Способ согласно варианту осуществления 113, при этом эксклюзионный предел составляет более или приблизительно более 100 кДа, 500 кДа, 750 кДа, 1000 кДа или 2000 кДа.

40 123. Способ согласно варианту осуществления 121 или варианту осуществления 122, при этом эксклюзионный предел составляет от или приблизительно от 500 кДа до 1000 кДа.

124. Способ согласно любому из вариантов осуществления 121-123, при этом эксклюзионный предел составляет или приблизительно составляет 75 кДа.

45 125. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-67 и 69-124, включающий сбор одной или более фракций, содержащих свободный объем, с отделением таким образом олигомерных реагентов в виде частиц от мономерных или меньших олигомерных молекул стрептавидина или мутеина стрептавидина.

126. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-125, дополнительно

включающий хранение олигомерных реагентов в виде частиц при температуре приблизительно при или ниже 4°C, приблизительно при или ниже -20°C или приблизительно или ниже -80°C.

5 127. Способ согласно любому из вариантов осуществления 65-126, дополнительно включающий смешивание олигомерных реагентов в виде частиц с одним или более агентами в условиях для обратимого связывания одного или более агентов с олигомерными реагентами в виде частиц.

128. Олигомерный реагент в виде частиц, полученный с помощью способа согласно любому из вариантов осуществления 65-127.

10 129. Способ мультимеризации одного или более агента с олигомерным реагентом в виде частиц, причем способ включает смешивание олигомерного реагента в виде частиц по любому из пп. 1-49, композиции, содержащей олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 50-64, или олигомерного реагента в виде частиц, полученного с помощью способа согласно любому из вариантов осуществления 65-128, с одним или
15 более агентами в условиях для обратимого связывания одного или более агентов с олигомерными реагентами в виде частиц.

130. Способ согласно варианту осуществления 127 или варианту осуществления 129, при этом один или более агентов содержат партнера по связыванию, при этом партнер по связыванию способен связываться с одним или более участком связывания на
20 олигомерном реагенте в виде частиц.

131. Способ согласно варианту осуществления 130, при этом партнер по связыванию содержит стрептавидин-связывающий пептид.

132. Способ согласно варианту осуществления 130 или варианту осуществления 131, при этом партнер по связыванию содержит стрептавидин-связывающий пептид,
25 выбираемый из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-
30 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19).

133. Способ согласно любому из вариантов осуществления 130-132, при этом один или более агентов связывается или способен связываться с молекулой, экспрессированной на поверхности клетки-мишени.

134. Способ согласно любому из вариантов осуществления 130-133, при этом один или более агентов содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
35

135. Способ согласно варианту осуществления 134, при этом один или более агентов представляет собой или содержит фрагмент моновалентного антитела.

136. Способ согласно варианту осуществления 134 или варианту осуществления 135, при этом один или более агентов представляет собой или содержит Fab.

40 137. Способ согласно любому из вариантов осуществления 130-136, при этом один или более агентов представляет собой рецептор-связывающий агент, который связывается или способен связываться с рецептором, экспрессированным на поверхности клетки-мишени.

138. Способ согласно варианту осуществления 137, при этом рецептор-связывающий агент представляет собой или содержит стимулирующий агент, способный связываться с молекулой на поверхности клетки-мишени, при этом связывание вызывает или модулирует сигнал в клетке-мишени.
45

139. Способ согласно варианту осуществления 137 или варианту осуществления 138,

при этом клеткой-мишенью является иммунная клетка.

140. Способ согласно любому из вариантов осуществления 137-139, при этом клетка-мишень представляет собой Т-клетку.

141. Способ согласно любому из вариантов осуществления 137-140, при этом
5 рецептор-связывающий агент способен инициировать связанный с комплексом TCR/CD3 сигнал в Т-клетках, связывается с элементом комплекса TCR/CD3; и/или специфически связывается с CD3.

142. Способ согласно варианту осуществления 141, при этом стимулирующий агент
10 представляет собой первый рецептор-связывающий агент, а способ дополнительно включает обратимое связывание с олигомерным реагентом в виде частиц второго рецептор-связывающего агента, при этом второй рецептор-связывающий агент способен специфически связываться со второй молекулой на поверхности клетки-мишени, причем это связывание со второй молекулой необязательно способно индуцировать или модулировать сигнал в клетках-мишенях.

143. Способ согласно варианту осуществления 142, при этом второй рецептор-
15 связывающий агент специфически связывается с костимулирующей молекулой, вспомогательной молекулой, молекулой иммунной контрольной точки, представляет собой член семейства TNF или рецептор семейства TNF, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор или представляет собой или содержит молекулу адгезии или
20 фактор, который вызывает выработку цитокина, выработку хемокина и/или экспрессию молекулы адгезии.

144. Способ согласно варианту осуществления 142 или варианту осуществления 143, при этом второй рецептор-связывающий агент специфически связывается с костимулирующей молекулой, а костимулирующей молекулой является CD28.

145. Способ согласно любому из вариантов осуществления 127 и 129-144, при этом
25 один или более агентов представляет собой антитело против CD3 и антитело против CD28, необязательно Fab против CD3 и Fab против CD28.

146. Олигомерный реагент в виде частиц согласно варианту осуществления 137 или
30 варианту осуществления 138, при этом рецептор-связывающий агент специфически связывается с костимулирующей молекулой, вспомогательной молекулой, молекулой иммунной контрольной точки, представляет собой член семейства TNF или рецептор семейства TNF, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор или представляет собой или содержит молекулу адгезии или фактор, который вызывает выработку цитокина, выработку хемокина и/или экспрессию молекулы адгезии.

147. Способ согласно любому из вариантов осуществления 137, 138, 143 или 144, при
35 этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) связывается с костимулирующей или вспомогательной молекулой, а костимулирующую или вспомогательную молекулу выбирают из CD28, CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 или HVEM.

148. Способ согласно любому из вариантов осуществления 137, 138, 143 или 144, при
40 этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) специфически связывается с цитокиновым рецептором, а цитокиновый рецептор выбирают из IL-2R, IL-1R, IL-15R, IFN-гаммаR, TNF-альфаR, IL-4R, IL-10R, IFNR I типа, IL-12R, IL-15R, IL-17R, TNFR1 и TNFR2.

149. Способ согласно любому из вариантов осуществления 137, 138, 143 или 144, при
45 этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) специфически связывается с хемокиновым рецептором, а хемокиновый рецептор выбирают из CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR9, CXCR1, CXCR3 и CXCR4.

150. Способ согласно любому из вариантов осуществления 137, 138, 143 или 144, при этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой фактор, который вызывает выработку цитокина или хемокина, а фактор представляет собой лиганд, который специфически связывается с рецептором цитокина или хемокина.

151. Способ согласно варианту осуществления 150, при этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой лиганд, который специфически связывается с цитокиновым рецептором, при этом

лиганд специфически связывает IL-2R, IL-1R, IL-15R, IFN-гаммаR, TNF-альфаR, IL-4R, IL-10R, IFNR I типа, IL-12R, IL-15R, IL-17R, TNFR1 и TNFR2; и/или

лиганд выбирают из IL-2, IL-1, IL-15, IFN-гамма, TNF-альфа, IL-4, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17 и TNF, или он представляет собой их биологически активный фрагмент.

152. Олигомерный реагент в виде частиц согласно варианту осуществления 151, при этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой лиганд, который специфически связывается с хемокиновым рецептором, при этом лиганд специфически связывается с хемокиновым рецептором, выбираемым из CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR9, CXCR1, CXCR3 и CXCR4; или

лиганд выбирают из CXCL9, CXCL10, CCL19, CCL21 и CCL25, или он представляет собой их биологически активный фрагмент.

153. Способ согласно любому из вариантов осуществления 137, 138, 143 или 144, при этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой молекулу адгезии, и молекулу адгезии выбирают из CD44, CD31, CD18/CD11a (LFA-1), CD29, CD54 (ICAM-1), CD62L (L-селектина) и CD29/CD49d (VLA-4), CD106 (VCAM-1), или она представляет собой их биологически активный фрагмент.

154. Способ согласно любому из вариантов осуществления 127-153, при этом один или более агентов представляет собой селективный агент, при этом селективный агент связывается или способен связываться с селективным маркером, который экспрессируется на поверхности клетки-мишени.

155. Способ согласно варианту осуществления 154, при этом клеткой-мишенью является иммунная клетка.

157. Способ согласно варианту осуществления 154 или варианту осуществления 155, при этом клетка-мишень представляет собой лимфоцит или антигенпредставляющую клетку.

158. Способ согласно любому из вариантов осуществления 154-156, при этом клетка-мишень представляет собой Т-клетку, В-клетку, НК-клетку, макрофаг или дендритную клетку.

159. Способ согласно любому из вариантов осуществления 154-158, при этом клетка-мишень представляет собой Т-клетку.

160. Способ согласно любому из вариантов осуществления 154-159, при этом селективным маркером является CD25, CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO.

161. Композиция, содержащая олигомерные реагенты в виде частиц, полученные с помощью способа согласно любому варианту осуществления 65-160.

162. Композиция, содержащая множество олигомерных реагентов в виде частиц, полученных с помощью способа согласно любому варианту осуществления 65-161.

163. Готовое изделие, содержащее олигомерный реагент в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 1-49 или композицию согласно любому из вариантов осуществления 50-64 или 161-162.

164. Способ модулирования клеток, причем способ включает инкубацию композиции клеток, содержащей клетки-мишени, в присутствии олигомерного реагента в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 1-49 или в присутствии композиции согласно любому из вариантов осуществления 50-64 или 161-163, модулируя таким образом клетки-мишени.

165. Способ согласно варианту осуществления 164, при этом модулирование клеток-мишеней включает активацию, обогащение и/или размножение клеток-мишеней.

166. Способ культивирования клеток, причем способ включает инкубацию композиции клеток, содержащей клетки-мишени, в присутствии олигомерного реагента в виде частиц согласно любому из вариантов осуществления 1-49 или в присутствии композиции согласно любому из вариантов осуществления 50-64 или 161-163.

167. Способ согласно любому из вариантов осуществления 164-166, при этом олигомерный реагент в виде частиц содержит обратимую связь с одним или более агентами.

168. Способ согласно варианту осуществления 167, при этом один или более агентов содержат партнера по связыванию, при этом партнер по связыванию способен связываться с одним или более участком связывания на олигомерном реагенте в виде частиц, таким образом обратимо связывая один или более агентов с олигомерным реагентом в виде частиц.

169. Способ согласно варианту осуществления 168, при этом партнер по связыванию содержит стрептавидин-связывающий пептид.

170. Способ согласно варианту осуществления 168 или 169, при этом партнер по связыванию содержит стрептавидин-связывающий пептид, выбираемый из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19).

171. Способ согласно любому из вариантов осуществления 167-170, при этом один или более агентов связывается или способен связываться с молекулой, экспрессированной на поверхности клетки-мишени.

172. Способ согласно любому из вариантов осуществления 167-171, при этом один или более агентов содержит антитело, необязательно Fab.

173. Способ согласно любому из вариантов осуществления 167-172, при этом один или более агентов представляет собой рецептор-связывающий агент, который связывается или способен связываться с рецептором, экспрессированным на поверхности клетки-мишени.

174. Способ согласно варианту осуществления 173, при этом рецептор-связывающий агент представляет собой или содержит стимулирующий агент, способный связываться с молекулой на поверхности клетки-мишени, индуцируя или модулируя таким образом сигнал в клетке-мишени.

175. Способ согласно варианту осуществления 173 или варианту осуществления 174, при этом рецептор-связывающий агент способен инициировать связанный с комплексом TCR/CD3 сигнал в Т-клетках, связывается с элементом комплекса TCR/CD3; и/или специфически связывается с CD3.

176. Способ согласно варианту осуществления 175, при этом стимулирующий агент представляет собой первый рецептор-связывающий агент, а способ дополнительно

включает обратимое связывание с олигомерным реагентом в виде частиц второго рецептор-связывающего агента, при этом второй рецептор-связывающий агент способен специфически связываться со второй молекулой на поверхности клетки-мишени, причем это связывание со второй молекулой необязательно способно индуцировать или

5 модулировать сигнал в клетках-мишенях.

177. Способ согласно варианту осуществления 176, при этом второй рецептор-связывающий агент специфически связывается с костимулирующей молекулой, вспомогательной молекулой, молекулой иммунной контрольной точки, представляет собой член семейства TNF или рецептор семейства TNF, цитокиновый рецептор,

10 хемокиновый рецептор или представляет собой или содержит молекулу адгезии или фактор, который вызывает выработку цитокина, выработку хемокина и/или экспрессию молекулы адгезии.

178. Способ согласно варианту осуществления 176 или 177, при этом рецептор-связывающий агент специфически связывается с костимулирующей молекулой, вспомогательной молекулой, молекулой иммунной контрольной точки, представляет собой член семейства TNF или рецептор семейства TNF, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор или представляет собой или содержит молекулу адгезии или фактор, который вызывает выработку цитокина, выработку хемокина и/или экспрессию молекулы адгезии.

179. Способ согласно любому из вариантов осуществления 174, 175, 177 или 178, при этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) связывается с костимулирующей или вспомогательной молекулой, а костимулирующую или вспомогательную молекулу выбирают из CD28, CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 или HVEM.

180. Способ согласно любому из вариантов осуществления 174, 175, 177 или 178, при этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) специфически связывается с цитокиновым рецептором, а цитокиновый рецептор выбирают из IL-2R, IL-1R, IL-15R, IFN-гаммаR, TNF-альфаR, IL-4R, IL-10R, IFNR I типа, IL-12R, IL-15R, IL-17R, TNFR1 и TNFR2.

181. Способ согласно любому из вариантов осуществления 174, 175, 177 или 178, при этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) специфически связывается с хемокиновым рецептором, а хемокиновый рецептор выбирают из CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR9, CXCR1, CXCR3 и CXCR4.

182. Способ согласно любому из вариантов осуществления 174, 175, 177 или 178, при этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой фактор, который вызывает выработку цитокина или хемокина, а фактор представляет собой лиганд, который специфически связывается с рецептором цитокина или хемокина.

183. Способ согласно варианту осуществления 182, при этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой лиганд, который специфически связывается с цитокиновым рецептором, при этом

лиганд специфически связывает IL-2R, IL-1R, IL-15R, IFN-гаммаR, TNF-альфаR, IL-4R, IL-10R, IFNR I типа, IL-12R, IL-15R, IL-17R, TNFR1 и TNFR2; и/или

лиганд выбирают из IL-2, IL-1, IL-15, IFN-гамма, TNF-альфа, IL-4, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17 и TNF, или он представляет собой их биологически активный фрагмент.

184. Способ согласно варианту осуществления 183, при этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой лиганд, который специфически связывается с хемокиновым рецептором, при этом

лиганд специфически связывается с хемокиновым рецептором, выбираемым из CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR9, CXCR1, CXCR3 и CXCR4; или

лиганд выбирают из CXCL9, CXCL10, CCL19, CCL21 и CCL25, или он представляет собой их биологически активный фрагмент.

5 185. Способ согласно любому из вариантов осуществления 174, 175, 177 или 178, при этом рецептор-связывающий агент (второй рецептор-связывающий агент) представляет собой молекулу адгезии, и молекулу адгезии выбирают из CD44, CD31, CD18/CD11a (LFA-1), CD29, CD54 (ICAM-1), CD62L (L-селектина) и CD29/CD49d (VLA-4), CD106 (VCAM-1), или она представляет собой их биологически активный фрагмент.

10 186. Способ согласно любому из вариантов осуществления 164-185, при этом один или более агентов представляет собой селективный агент, при этом селективный агент связывается или способен связываться с селективным маркером, который экспрессируется на поверхности клетки-мишени.

15 187. Способ согласно варианту осуществления 186, при этом клеткой-мишенью является иммунная клетка.

188. Способ согласно варианту осуществления 186 или варианту осуществления 187, при этом клетка-мишень представляет собой лимфоцит или антигенпредставляющую клетку.

189. Способ согласно любому из вариантов осуществления 186-188, при этом клетка-мишень представляет собой Т-клетку, В-клетку, НК-клетку, макрофаг или дендритную клетку.

190. Способ согласно любому из вариантов осуществления 186-189, при этом клетка-мишень представляет собой Т-клетку.

25 191. Способ согласно любому из вариантов осуществления 186-190, при этом селективным маркером является CD25, CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA и/или CD45RO.

30 192. Способ согласно любому из вариантов осуществления 186-191, при этом клетки-мишени включают в себя кровяные клетки, лейкоциты, лимфоциты, В-клетки, популяцию В-клеток, Т-клеток, популяцию Т-клеток, НК-клеток, дендритных клеток и/или макрофагов.

193. Способ согласно любому из вариантов осуществления 186-192, при этом клетки-мишени экспрессируют рекомбинантный рецептор.

35 194. Способ согласно любому из вариантов осуществления 186-193, при этом клетки-мишени экспрессируют рекомбинантный Т-клеточный рецептор и/или химерный антигенный рецептор (CAR).

195. Способ согласно любому из вариантов осуществления 186-194, при этом клетки-мишени экспрессируют CAR, который связывается с антигеном, связанным с заболеванием и/или раком.

40 196. Способ согласно варианту осуществления 195, при этом антигеном является $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ интегрин ($\alpha\text{v}\beta\text{6}$ интегрин), В-клеточный антиген созревания (BCMA), B7-H6, карбоангидраза 9 (CA9, также известная как CAIX или G250), раково-тестикулярный антиген, раково-тестикулярный антиген 1B (CTAG, также известный как NY-ESO-1 и LAGE-2), раково-эмбриональный антиген (CEA), циклин, циклин A2, С-С мотив хемокиновый лиганд 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, 45 CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, белок эпидермального фактора роста (EGFR), укороченный белок эпидермального фактора роста (tEGFR), мутация рецептора эпидермального фактора роста III типа (EGFR vIII), эпителиальный гликопротеин 2 (EPG-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EPG-40), эфрин-B2, эфриновый рецептор A2

(EPHa2), эстрогеновый рецептор, Fc-рецептор-подобный белок 5 (FCRL5; также известный как Fc-рецептор гомолог 5 или FCRH5), эмбриональный ацетилхолиновый рецептор (эмбриональный AchR), фолат-связывающий белок (FBP), рецептор фолиевой кислоты альфа, эмбриональный ацетилхолиновый рецептор, ганглиозид GD2, O-ацетилованный GD2 (OGD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), Her2/neu (рецепторная тирозинкиназа erbB2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), erbB димеры, человеческий меланома-ассоциированный антиген с высокой молекулярной массой (HMW-MAA), поверхностный антиген вируса гепатита В, человеческий лейкоцитарный антиген А1 (HLA-A1), человеческий лейкоцитарный антиген А2 (HLA-A2), альфа-рецептор IL-22 (IL-22Ra), альфа-рецептор 2 IL-13 (IL-13Ra2), рецептор, содержащий домен вставки киназы (kdr), легкая цепь каппа, молекула клеточной адгезии L1 (L1CAM), эпитоп CE7 L1-CAM, содержащий богатый лейцином повтор член А семейства 8 (LRRC8A), Lewis Y, меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, мезотелин, с-Met, мышинный цитомегавирус (CMV), муцин 1 (MUC1), MUC16, лиганды членов D 2 группы естественных киллеров (NKG2D), melan A (MART-1), молекула адгезии нервных клеток (NCAM), онкоэмбриональный антиген, предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы (PRAME), прогестероновый рецептор, простат-специфический антиген, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), простат-специфический мембранный антиген (PSMA), подобный рецепторной тирозинкиназе орфановый рецептор 1 (ROR1), сурвивин, трофобластический гликопротеин (TPBG также известный как 5T4), опухоль-ассоциированный гликопротеин 72 (TAG72), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2), ген опухоли Вильмса (WT-1) или патоген-специфический антиген.

197. Способ согласно любому из вариантов осуществления 186-196, дополнительно включающий разрыв обратимой связи между одним или более агентами и олигомерным реагентом в виде частиц.

198. Способ согласно варианту осуществления 197, при этом указанный разрыв включает введение в клетки-мишени композиции, содержащей вещество, способное перевернуть связь между одним или более агентами и олигомерным реагентом в виде частиц.

199. Способ согласно варианту осуществления 198, при этом веществом является свободный партнер по связыванию и/или конкурентный агент.

200. Способ согласно любому из вариантов осуществления 197-199, при этом указанный разрыв завершает или ослабляет сигнал, индуцированный или модулированный одним или более агентами в клетках-мишенях, необязательно Т-клетках.

201. Способ согласно любому из вариантов осуществления 197-200, при этом вещество содержит стрептавидин-связывающий пептид, биотин или биологически активный фрагмент, необязательно D-биотин, или аналог биотина или биологически активный фрагмент.

202. Способ согласно варианту осуществления 201, при этом веществом является стрептавидин-связывающий пептид, его выбирают из группы, состоящей из Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 8), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO: 17), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 18) и Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO: 19).

203. Способ согласно любому из вариантов осуществления 197-202, при этом разрыв осуществляют в пределах 5 дней после начала указанной инкубации.

204. Способ согласно любому из вариантов осуществления 164-203, при этом один или более рецептор-связывающих агентов содержат антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

205. Способ согласно варианту осуществления 204, при этом один или более рецептор-связывающих агентов представляет собой или содержит фрагмент моновалентного антитела.

206. Способ согласно варианту осуществления 204 или варианту осуществления 205, при этом один или более агентов представляет собой или содержит Fab.

207. Способ согласно любому из вариантов осуществления 164-206, при этом клеткой-мишенью является иммунная клетка.

208. Способ согласно любому из вариантов осуществления 164-207, при этом клетка-мишень представляет собой Т-клетку.

209. Способ согласно любому из вариантов осуществления 176-208, при этом рецептор-связывающий агент представляет собой или содержит стимулирующий агент, способный связываться с молекулой на поверхности клетки-мишени, при этом связывание вызывает или модулирует сигнал в клетке-мишени.

210. Способ по любому из пп. 176-209, при этом рецептор-связывающий агент способен инициировать связанный с комплексом TCR/CD3 сигнал в Т-клетках, связывается с элементом комплекса TCR/CD3; и/или специфически связывается с CD3.

211. Способ по п. 209 или п. 210, при этом стимулирующий агент представляет собой первый рецептор-связывающий агент, а олигомерный реагент в виде частиц содержит второй рецептор-связывающий агент, при этом второй рецептор-связывающий агент способен специфически связываться со второй молекулой на поверхности клетки-мишени, при этом связывание со второй молекулой необязательно способно индуцировать или модулировать сигнал в клетках-мишенях.

212. Способ по п. 211, при этом второй рецептор-связывающий агент специфически связывается с костимулирующей молекулой, вспомогательной молекулой, молекулой иммунной контрольной точки, представляет собой член семейства TNF или рецептор семейства TNF, цитокиновый рецептор, хемокиновый рецептор или представляет собой или содержит молекулу адгезии или фактор, который вызывает выработку цитокина, выработку хемокина и/или экспрессию молекулы адгезии.

213. Способ по п. 211 или п. 212, при этом второй рецептор-связывающий агент специфически связывается с костимулирующей молекулой, а костимулирующей молекулой является CD28.

214. Способ по любому из пп. 176-213, при этом один или более агентов представляет собой антитело против CD3 и антитело против CD28, необязательно Fab против CD3 и Fab против CD28.

VIII. Примеры

Следующие примеры включены только для иллюстративных целей и предназначены для ограничения объема изобретения.

Пример 1: Способы получения олигомерного реагента, содержащего мутеин стрептавидина.

Олигомерный реагент получали путем полимеризации иллюстративного мутеина стрептавидина, обозначенного STREP-TACTIN® M2 (гомотетрамера стрептавидина, содержащего последовательность аминокислот мутеина, приведенную в SEQ ID NO: 61, см., например, патент США № 6103493 и Voss и Skerra (1997) Protein Eng. 1:975-982).

Для получения мутеинов стрептавидина для олигомеризации мутеины стрептавидина, содержащие одну или более реактивных тиоловых групп, инкубировали с активированными малеимидом мутеинами стрептавидина. Для получения мутеина стрептавидина приблизительно 100 мг тетрамера мутеина стрептавидина тиолировали путем инкубации с 2-иминотиоланом гидрохлорид при молярном отношении 1:100 при рН приблизительно 8,5 при 24°C в течение 1 часа в 100 мМ боратного буфера в общем объеме 2,6 мл. Для реакции активации с введением малеимидов приблизительно 400 мг тетрамера мутеина стрептавидина инкубировали с сукцинимидил-6-[(β-малеимидопропионамидо) гексаноатом (SMPH) при молярном отношении 1:2 при рН приблизительно 7,2 при 24°C в течение 1 часа в общем объеме приблизительно 10,4 мл в натрий-фосфатном буфере. Реакции тиолирования и активации малеимидом координировали так, чтобы они начинались приблизительно в одно и то же время, и регулировали продолжительность реакций.

После реакций гидрохлорид 2-иминотиолана и SMPH, которые не прореагировали со STREP-ТАСТИН® M2, наряду с низкомолекулярными побочными продуктами реакции (преимущественно NHS), удаляли из образцов путем индивидуального проведения гель-фильтрации образцов с помощью колонок PD-10 для обессоливания (GE Healthcare). Для каждого образца объемом 2,5 мл колонку PD-10 (объем слоя 8,3 мл) уравнивали и загружали либо тиолированным мутеином стрептавидина, либо малеимид-мутеином стрептавидина, и элюцию осуществляли путем добавления 3,5 мл буфера для связывания (100 мМ NaH_2P_4 , 150 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, рН 7,2). Гель-фильтрацию малеимид-мутеина стрептавидина проводили на 4 колонках с учетом объема > 10 мл, и элюаты объединяли. Время реакций активации и тиолирования и время между окончанием реакций активации и тиолирования и началом реакций олигомеризации тщательно контролировали. Обычно, через или приблизительно через десять минут с начала гель-фильтрации, то есть в конце реакций активации и тиолирования начинали реакцию олигомеризации.

Для олигомеризации образцы малеимид-мутеина стрептавидина и тиолированного мутеина стрептавидина затем объединяли в общий объем приблизительно 17,5 мл и инкубировали в течение 1 часа при рН 7,2 при 24°C в условиях перемешивания со скоростью около 600 об/мин. Поскольку с SMPH инкубировали в четыре раза больше мутеина стрептавидина, чем с гидрохлоридом 2-иминотиолана, молярное соотношение тиолированного мутеина стрептавидина и малеимид-мутеина стрептавидина во время реакции олигомеризации составляло 1:4. После реакции оставшиеся SH-группы олигомеризованного реагента мутеина стрептавидина насыщали путем инкубации с N-этилмалеимидом (NEM) в течение 15 минут при 24°C при перемешивании (около 600 об/мин) с последующей инкубацией в течение еще 16-20 часов при 4°C.

После инкубации с NEM образец, содержащий олигомеризованный мутеин Strep-Tactin, центрифугировали, и супернатант фильтровали через мембрану 0,45 мкм (Millex-HP 0,45 мкм от Merck Millipore). Отфильтрованный раствор затем загружали в колонку (Sephacryl S-300 HR HiPrep 26/60, GE Healthcare) для эксклюзионной хроматографии (SEC) с помощью хроматографической системы АКТА Explorer (GE Healthcare). Фракции, имеющие в конце сбора милли-единиц оптической плотности (mAU) больше или равно 1500 mAU, объединяли.

Объединенный образец, содержащий олигомерный мутеин стрептавидина, обрабатывали 100 мМ гидроксиламином путем добавления 890 мМ рН 6,35 в течение 15 минут при комнатной температуре. Чтобы удалить гидроксилламин после обработки, образец загружали в колонку PD10 (2,5 мл на колонку), уравнированную 100 мМ NaH_2PO_4 , 140 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, рН 7,2, и элюировали 3,5 мл того же буфера (100

мМ NaH₂PO₄, 140 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, рН 7,2.) Элюаты PD10 объединяли и стерильно фильтровали через фильтр 0,45 мкм с последующим фильтром 0,22 мкм, а затем образцы замораживали и хранили при -80°C. Перед замораживанием измеряли конечную концентрацию олигомерного реагента мутеина стрептавидина, и размер реагента олигомерного мутеина стрептавидина определяли с помощью динамического рассеяния света (DLS).

Для оценки последовательности процесса олигомеризации получали 10 олигомерных реагентов мутеина стрептавидина с использованием описанных выше методов из пяти различных серий мутеина стрептавидина (SAM). оценивали средний размер, процентный выход (определенный путем измерения поглощения при 280 нм без базовой коррекции) и активность (связывание биотина) олигомеров, и результаты показаны в таблице E1. Результаты показали, что полученные олигомерные реагенты мутеина стрептавидина согласовывались по этим параметрам со средним радиусом 97 нм ± 10 нм и связыванием биотина 40 нмоль/мг ± 3 нмоль/мг.

Таблица E1: Сравнение олигомеризированного STREP-TACTIN из разных партий.

	Серия SAM	Радиус (нм)	Выход (%)	Связывание Биотина (нмоль/мг)
Партия 1	1	92	74	41
Партия 2	2	100	68	40
Партия 3	2	106	82	37
Партия 4	2	94	73	39
Партия 5	3	87	79	41
Партия 6	3	90	81	39
Партия 7	4	97	84	43
Партия 8	4	97	76	43
Партия 9	5	102	85	42
Партия 10	5	87	63	42

Среднюю молекулярную массу (MW) трех олигомерных реагентов мутеина стрептавидина, полученных, как описано выше, измеряли с помощью ассиметричного фракционирования в потоке в поле течения (AF4), выполняемого с помощью системы HPLC (AGILENT 1100 и Wyatt ECLIPSE DUALTEC) с УФ-детектированием (УФ-детектор Agilent в сочетании с MALLS DAWN HELEOS (Wyatt)). Измерения с помощью AF4 позволили рассчитать среднее количество тетрамеров мутеина стрептавидина в каждом олигомерном реагенте, предполагая, что средняя молекулярная масса тетрамера мутеина стрептавидина составляет 52500 г/моль (52,5 кДа) (таблица E2).

Таблица E2: Размер и Молекулярная масса олигомерных реагентов мутеина стрептавидина

Радиус (нм)	MW (г/моль)	Количество тетрамеров
102	1,65×10 ⁸	3150
82	1,08 ×10 ⁸	2050
92	1,26 ×10 ⁸	2280

Пример 2: Оценка параметров, влияющих на олигомеризацию реагента мутеина стрептавидина.

Оценивали разные параметры в способе, описанном в примере 1, для оценки влияния на разные аспекты методики создания олигомерного реагента мутеина стрептавидина.

А. Уровень рН

Оценивали влияние проведения реакции тиолирования при различных значениях рН на размер олигомера и выход продукта. Иминотиолан приобретали в виде гидрохлорида,

и его растворение в 100 мМ боратном буфере при рН 8,5 до концентрации 100 мг/мл вызывало падение рН $\pm 0,7$ единиц до рН 7,8. Когда боратный буфер использовали с более низкой силой, то есть 25 мМ, добавление гидрохлорида иминотиолана до

5 Реакции тиолирования проводили при различных значениях рН путем инкубации 100 мг мутеина стрептавидина с гидрохлоридом 2-иминотиолана в молярном соотношении 1:100 в 25 мМ боратном буфере при рН 7,5, рН 8,5 и рН 9,5. Тиолизованный мутеин стрептавидина комбинировали с активированным малеимидом мутеином стрептавидина, и процесс олигомеризации осуществляли, по существу, как описано в примере 1. Как
10 показано в таблице Е3, снижение рН боратного буфера, используемого в реакции тиолирования, приводило к уменьшению размера олигомера и выхода, тогда как увеличение рН приводило к увеличению размера и выхода. Непреднамеренная потеря материала произошла во время эксперимента в условиях рН 9,5, что привело к снижению выхода. Значение в скобках в Таблице Е3 отражает расчетный выход при отсутствии
15 потерь.

Таблица Е3: размер и выход олигомера STREP-ТАКТВ после тиолирования при разных рН

рН Реакции Тиолирования	Радиус (нм)	Выход (%)
рН 7,5	14	6
рН 8,5	40	48
рН 9,5	52	14 (62)

Чтобы оценить, изменяет ли кинетику реакции более сильный буфер (т.е. 100 мМ боратный буфер по сравнению с 25 мМ с сопутствующим увеличением рН в конечной
25 реакционной смеси), реакцию активации иминотиолана проводили, как описано в Примере 1. чистое содержание тиоловых функциональных групп определяли с помощью реактива Элмана в нескольких временных точках во время реакции. Скорость реакции в 100 мМ боратном буфере изображена на фиг. 1, и было обнаружено, что она является более быстрой и вводит больше групп SH, чем когда реакцию проводили в 25 мМ боратном буфере. Реакция активации иминотиолана достигла пиковой концентрации
30 тиоловых функциональных групп, начинающейся уже через 25 минут после начала реакции в 100 мМ боратном буфере, по сравнению с 50-150 минутами, когда реакцию проводили в 25 мМ боратном буфере, что является результатом более высокого конечного рН, при котором происходит реакция, при использовании буфера 100 мМ вместо буфера 25 мМ.
35

Также оценивали влияние рН на другие стадии процесса олигомеризации. Реакции олигомеризации проводили с реакционными буферами (25 мМ борат) при разных значениях рН, 8,3 и 8,5, и со связующими буферами (100 мМ фосфат) при различных значениях рН, 7,0 и 7,2. Выполнение реакции тиолирования при более низком рН (8,3
40 вместо 8,5) оказало большее влияние на размер олигомера, чем проведение реакций активации или связывания при более низком рН (7,0 вместо 7,3). Однако проведение реакции активации или реакции связывания при рН 7,0 действительно уменьшало размер олигомера по сравнению с проведением реакций при рН 7,2.

В. Влияние синхронизации и рН на реакцию тиолирования

45 Анализ мутеина стрептавидина, активированного иминотиоланом (тиолированного), проводили для определения, происходит ли распад тиоловых функциональных групп из-за образования дисульфида (который не может реагировать с малеимидом) или изомеризации в направлении N-замещенного иминотиолана.

В одном эксперименте чистое содержание тиоловых функциональных групп

определяли в разные моменты времени с помощью реактива Элмана путем измерения поглощения при 412 нм после реакции тиолирования с иминотиоланом. Реакцию проводили с 25 мМ боратным буфером, который имел начальные значения рН 8,3 или 8,5, хотя фактическое значение рН во время реакции было немного ниже 7. Как показано на фиг. 2, содержание тиоловых функциональных групп достигало максимума между 50 и 150 минутами (раньше при использовании рН 8,5 и позже при использовании рН 8,3), а высота зависела от рН (выше при использовании рН 8,5 по сравнению с использованием рН 8,3). Содержание тиоловых функциональных групп в мутеине стрептавидина во время реакции при обоих значениях рН сходилось через 3 часа, демонстрируя, что через 3 часа мутеин стрептавидина, полученный с использованием более высокого значения рН 8,5, содержал больше N-замещенного иминотиолана. Дополнительные эксперименты показали, что на снижение функции SH не влияло добавление восстанавливающего агента трис (2-карбок시에тил) фосфина (TCEP), который бы изменял направление, если бы причиной снижения функции SH было образование дисульфида.

Кроме того, мутеины стрептавидина тиолировали путем инкубации с иминотиоланом в течение 10 минут, 50 минут или 390 минут с использованием 25 мМ боратного буфера при рН 8,3 и 8,5, и продукты реакции анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) с использованием скорости потока 0,4 мл/мин со 100 мМ NaH_2PO_4 , 140 мМ NaCl , 1 мМ EDTA, рН 7,0 и с использованием колонки Agilent Bio SEC-3 3 мкм 300Å. Для определения размера использовали стандарты молекулярной массы (обозначенные пиками при 158000 Да, 44000 Да, 17000 Да или 1350 Да на Фиг.3). Анализ SEC показан на фиг. 3, на которой неактивированный тетрамер мутеина стрептавидина показан пунктирной линией. Было обнаружено, что неактивированный тетрамер мутеина имеет самое низкое время удерживания, в то время как тиолированные образцы мигрируют тем медленнее (в соответствии с меньшей молекулярной массой), чем дольше они реагируют с иминотиоланом. Наблюдаемые пики образцов, которые прореагировали с иминотиоланом, были по существу идентичными по размеру, и пиков с более низкими временами удерживания не наблюдалось. Таким образом, из анализа можно сделать вывод, что димеры или олигомеры более высокого порядка не образуются при длительной реакции с иминотиоланом, что должно было иметь место в случае образования дисульфида.

Чтобы оценить влияние времени на снижение содержания SH, оценивали чистое содержание тиоловых функциональных групп в конце 1-часовой или 3-часовой активации иминотиолана мутеина стрептавидина при различных значениях рН (рН 8,3, 8,5 или 8,7) в 25 мМ боратном буфере. После реакции и гель-фильтрации PD10 содержание SH определяли путем измерения поглощения при 412 нм после добавления реактива Элмана 5,5'-дителиобис-(2-нитробензоата) (DTNB). В результате реакции выделяется 5-тио-2-нитробензоат-ион TNB2-, который имеет максимум поглощения при 412 нм. Путем измерения увеличения поглощения при 412 нм и деления на молярный коэффициент экстинкции иона TNB2- при 412 нм, можно рассчитать содержание свободного сульфгидрила в молекуле. Как показано на фиг. 4, в то время как содержание тиоловых функциональных групп после 1-часовой реакции зависело от рН, после 3-часовой реакции было очевидно очень слабое влияние рН на содержание тиоловых функциональных групп. Предполагается, что более длительная реакция активации может уменьшить влияние рН на содержание тиоловых функциональных групп и, тем самым, сделать реакцию более устойчивой в отношении изменений размера, зависящих от рН, но также может увеличить N-замещенный иминотиолан, который может быть

источником долгосрочной нестабильности размера из-за повторной изомеризации.

Чтобы измерить снижение тиоловых функциональных групп в отсутствие образования тиола, содержание тиоловых функциональных групп измеряли в несколько моментов времени после окончания реакции тиолирования, то есть после удаления реагента иминотиолана. Содержание SH в тиолированном стрептавидине измеряли с помощью реагента Элмана в разное время после удаления 2-иминотиолана с помощью гель-фильтрации PD10. Как показано на фиг. 5, через 5 минут после окончания реакции было обнаружено разрушение 5% тиоловых функциональных групп, через 60 минут после реакции было обнаружено разрушение 26%, а через 120 минут после реакции было обнаружено разрушение 45% тиоловых функциональных групп. Рассчитали, что период потери половины SH составляет 139 мин. Это показывает результат использования разных временных рамок между окончанием активации иминотиолана и SMPH и началом реакции мультимеризации.

C. Молярные соотношения мутеина стрептавидина и SMPH

Для оценки влияния концентрации SMPH и мутеина стрептавидина в реакции активации SMPH на олигомеризацию мутеина стрептавидина провели процедуры олигомеризации с различными концентрациями (в пределах $\pm 10\%$) SMPH и мутеина стрептавидина. Увеличение или уменьшение концентрации SMPH или стрептавидина на 10% привело к заметным различиям размера олигомера мутеина стрептавидина. В некоторых аспектах рекомендуется, чтобы точность этих параметров (концентрация Strep-Tactin и SMPH) была лучше, чем $\pm 2\%$.

D. Стабилизация олигомеров

Непрореагировавший N-замещенный иминотиолан в результате тиолирования может оставаться на остатках лизина и на свободном N-конце мутеина стрептавидина и способствовать постсинтетическому увеличению размера олигомера. Чтобы оценить влияние обработки гидроксилламинном на рост постсинтетического олигомера, процедуры олигомеризации выполняли, как описано в Примере 1, за исключением того, что процедуры включали либо 1-часовую реакцию активации с иминотиоланом (образцы 1 и 2), либо 3,5-часовую реакцию активации с иминотиоланом (образцы 3 и 4). Кроме того, в этих исследованиях после проведения SEC образцы, содержащие олигомерные реагенты мутеина стрептавидина, либо обрабатывали 100 мМ гидроксилламинном (НА) при pH 6,35 в течение 15 минут при комнатной температуре (образцы 1 и 3), либо не обрабатывали гидроксилламинном (образцы 2 и 4). Образцы разделяли на фракции, которые хранили при -80°C , 4°C или 37°C . Размер олигомера измеряли с помощью DLS сразу после синтеза (0 день) и через 1 неделю, 3 недели и 9 недель после синтеза. Результаты показаны в Таблице E4.

Таблица E4: Влияние Температуры Хранения и Обработки Гидроксилламинном на Постсинтетический Рост

Образец	Условия Хранения	Радиус на d0	Радиус после w1	Радиус после w3	Радиус после w9	Радиус после w27
Образец 1 +НА 1 ч	-80°C	89 нм	94 нм	93 нм	91 нм	91 нм
	4°C	89 нм	95 нм	95 нм	96 нм	100 нм
	37°C	89 нм	99 нм	108 нм	107 нм	114 нм
Образец 2 -НА 1 ч	-80°C	88 нм	93 нм	96 нм	94 нм	94 нм
	4°C	88 нм	97 нм	106 нм	106 нм	112 нм
	37°C	88 нм	115 нм	137 нм	178 нм	329 нм
Образец 3 +НА 3,5 ч	-80°C	94 нм	100 нм	98 нм	94 нм	92 нм
	4°C	94 нм	96 нм	98 нм	100 нм	102 нм
	37°C	94 нм	108 нм	121 нм	142 нм	249 нм

Образец 4 -НА 3,5 ч	-80°C	91 нм	98 нм	98 нм	96 нм	100 нм
	4°C	91 нм	111 нм	138 нм	157 нм	99 нм
	37°C	91 нм	148 нм	177 нм	265 нм	409 нм

Как показано в таблице Е4, обработка гидроксиламином снижает рост олигомеров во время хранения при температурах 4°C и 37°C. Наблюдалось, что при хранении при -80°C размер остается стабильным независимо от обработки гидроксиламином. Образцы 3 и 4 активировали в течение 3,5 часов, и они показали более выраженный постсинтетический рост олигомеров. Не желая ограничиваться теорией, в некоторых аспектах время активации 3,5 часа не так чувствительно к изменениям рН, как время активации 1 час (см. Пример 2В), но может привести к более высокому содержанию N-замещенного иминотиолана. Вместе результаты показали, что обработка гидроксиламином уменьшает постсинтетический рост олигомеров мутеина стрептавидина. Данные также продемонстрировали, что хранение при -80°C повышает стабильность олигомеров. Таким образом, в некоторых аспектах объединение обеих обработок гидроксиламином с последующим хранением при температуре -80°C может обеспечить улучшенную стабильность для поддержания постоянного размера, в том числе при длительном хранении.

Пример: Создание растворимого стимулирующего реагента, содержащего олигомеризированный Fab-фрагменты против CD3 и против CD28, обратимо связанные с олигомерами мутеина стрептавидина.

Стимулирующие агенты (Fab-фрагменты против CD3 и против CD28) мультимеризовали путем обратимого связывания с олигомерным реагентом мутеина стрептавидина, полученным, как описано в примере 1. Fab-фрагменты против CD3 и против CD28 обратимо связывались с олигомерным мутеином стрептавидина через пептид-связывающий партнер стрептавидина, слитый с каждым Fab-фрагментом. Fab-фрагмент против CD3 получали из связывающего CD3 моноклонального антитела, продуцируемого линией клеток гибридомы ОКТ3 (ATCC® CRL-8001™; см. также патент США № 4362549), и он содержал переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи антитела против CD3 ОКТ3, описанного в Arakawa et al., J. Biochem. 120, 657-662 (1996). Эти последовательности приведены в SEQ ID NO: 31 и 32, соответственно. Fab-фрагмент против CD28 получали из антитела CD28.3 (депонированного в виде синтетической одноцепочечной Fv-конструкции под номером доступа GenBank AF451974.1; см. Также Vanhove et al., BLOOD, 15 июля 2003 г., том 102, № 2, страницы 564-570), и он содержал переменные домены тяжелой и легкой цепей антитела CD28.3 против CD28, представленные в SEQ ID NO: 33 и 34, соответственно. Фрагменты-Fab индивидуально сливали на карбокси-конце их тяжелой цепи с пептид-связывающей последовательностью стрептавидина, содержащей последовательное расположение двух связывающих стрептавидин модулей, имеющих последовательность аминокислот SAWSHPQFEK (GGGS) 2GGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16). Пептид-меченые Fab-фрагменты получали рекомбинантно (см. Публикацию международной патентной заявки № WO 2013/011011 и WO 2013/124474).

Для осуществления обратимого связывания меченные пептидами Fab-фрагменты против CD3 и против CD28 смешивали с реагентом олигомерного мутеина стрептавидина при приблизительно комнатной температуре, тем самым обратимо связывая их с реагентом посредством взаимодействия между метками twin-strep на фрагментах Fab, которые были связывающими партнерами, способными обратимо связываться с сайтами связывания на реагенте. В некоторых случаях меченые пептидом Fab-фрагменты предварительно смешивали перед иммобилизацией на олигомерном реагенте мутеина

стрептавида, что в некоторых случаях может приводить к более равномерному распределению различных молекул Fab.

Пример 4: Оценка Активности Олигомеризированных Fab-фрагментов против CD3 и против CD28, обратимо связанных с олигомерами мутеина стрептавида

5 Fab-фрагменты против CD3 и против CD28, обратимо связанные с различными олигомерными реагентами стрептавида из каждой партии, описанной в таблице E1, с помощью процесса, описанного в примере 1, оценивали на способность стимулировать Т-клетки. Эти олигомерные реагенты стрептавида имели средний радиус около 95 нм. Метаболическую активность клеток в качестве показателя пролиферации клеток

10 оценивали путем колориметрического контроля расщепления стабильной соли тетразолия WST-1 до растворимого комплекса красителя и формазана.

Т-клетки от трех разных доноров инкубировали с мультимеризованными Fab-фрагментами против CD3/против CD28, обратимо связанными с олигомерным реагентом стрептавида. Клетки также инкубировали с контрольными олигомерными реагентами,

15 которые имели средний радиус 101 (внутренний эталон) или 36 нм, которые также были обратимо связаны с Fab-фрагментами против CD3/против CD28. После инкубации реагент WST-1 наносили на клетки, и уровни метаболической активности оценивали, измеряя в качестве показаний поглощение при 450 нм. Результаты были нормализованы по количеству клеток в анализируемой культуре и представлены как отношение WST-1

20 к количеству клеток.

Как показано на фиг. 6B, средняя активность WST-1 Т-клеток, стимулированных каждым из протестированных реагентов, была сопоставимой. Кроме того, степень стимуляции была одинаковой для всех протестированных реагентов и была сопоставима с аналогичным размером внутреннего эталонного реагента (обычно варьировала в

25 пределах ± 2 стандартных отклонения). На фиг.6A показана активность WST-1, изображенная в виде отдельной точки данных для каждого реагента. На фиг.6A и фиг. 6B показано, что стимуляция Т-клеток, как наблюдалось по активности WST-1, была ниже при использовании Fab против CD3/против CD28, мультимеризованных на меньшем 36 нм каркасе олигомерного реагента мутеина стрептавида.

30 Пример 5: Иллюстративный способ получения олигомерного мутеина стрептавида.

Олигомерные реагенты мутеина стрептавида получали с помощью иллюстративного способа, аналогичного способу, описанному в примере 1, с некоторыми модификациями. В частности, после инкубации с NEM образец, содержащий олигомеризованный мутеин стрептавида, центрифугировали, и супернатант

35 фильтровали через мембрану 0,45 мкм. Отфильтрованный раствор затем обрабатывали 100 мМ гидроксиламином при pH 6,35 в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем образец загружали в колонку для эксклюзионной хроматографии (SEC) с помощью хроматографической системы АКТА Explorer (GE Healthcare). Фракции с милли-единицей оптической плотности (mAU), превышающей или равной 1500 mAU, объединяли и затем

40 стерильно фильтровали через фильтр 0,45 мкм, а затем фильтр 0,22 мкм. Олигомеризованный стрептавидин хранили при -80°C . Таким образом, в отличие от способа, описанного в Примере 1, не проводили дополнительную гель-фильтрацию на основе PD-10.

Размер и стабильность олигомерных реагентов мутеина стрептавида, полученных

45 согласно иллюстративному способу, сравнивали с олигомерами, полученными согласно способу, описанному в примере 1. Олигомеры разделяли на фракции, которые хранили при -80°C , 4°C или 37°C . Размер олигомера измеряли с помощью DLS сразу после синтеза (0 день) и в различные моменты времени после синтеза. В обоих способах,

независимо от того, удаляли ли гидроксилламин после SEC или до SEC, получали олигомеры сопоставимого размера и стабильности. Как показано на фиг. 11, олигомеры, хранившиеся при -80°C или 4°C , демонстрировали среднее изменение размера менее 10% в течение 46 недель после синтеза. Олигомеры, хранившиеся при 37°C , показали увеличение размера примерно на 50% через 9 недель после синтеза.

Пример 6: Оценка разных полученных серий олигомерных реагентов мутеина стрептавидина

Различные серии олигомерных реагентов мутеина стрептавидина, состоящих из разных партий исходного материала, оценивали в качестве части процесса конструирования Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR). Три отдельные серии олигомерных реагентов мутеина стрептавидина получали из отдельных партий STREP-TACTIN® M2, по существу, как описано выше. Fab против CD3 и против CD28, содержащие слитый партнер по связыванию пептида стрептавидина из одной и той же полученной серии, обратимо связывали с отдельными олигомерами мутеина стрептавидина из каждой серии, по существу, как описано выше. Три отдельные серии олигомерных реагентов мутеина стрептавидина имели средние диаметры от 100 до 109 нм.

Три отдельные серии олигомерных реагентов мутеина стрептавидина, конъюгированных с Fab против CD3/против CD28, использовали для стимуляции первичных Т-клеток CD4+ и CD8+. Т-клетки CD4+ и CD8+ индивидуально отбирали из образца афереза от трех отдельных доноров до объединения выбранных клеток при определенном соотношении Т-клеток CD4+ к CD8+. Затем комбинированные Т-клетки CD4+ и CD8+ обрабатывали химерным антигенным рецептором (CAR) с помощью иллюстративного способа конструирования, который включал инкубацию клеток с большим количеством олигомерных реагентов мутеина стрептавидина, конъюгированных с Fab против CD3/против CD28, с трансдукцией с помощью лентивируса, а затем выращиванием для размножения. Перед завершением размножения клетки обрабатывали биотином для диссоциации Fab против CD3/против CD28 от олигомерных реагентов стрептавидина. Условия для инкубации, трансдукции и культивирования были одинаковыми для всех протестированных серий олигомерных реагентов мутеина стрептавидина, конъюгированных с Fab против CD3/против CD28, и каждую серию тестировали с использованием до четырех повторений для каждого из трех донорских образцов. Для контроля эффективности трансдукции сконструированных Т-клеток лентивирус доставлял полинуклеотид, кодирующий CAR, отделенный от усеченного рецептора последовательностью проскока рибосомы, для использования в качестве суррогатного маркера для выявления экспрессии CAR.

количественно определяли общее количество жизнеспособных клеток на различных этапах примерного технологического процесса. Перед добавлением конъюгированного с Fab олигомерного реагента мутеина стрептавидина (день 0) и в разные дни процесса клетки метили красителем на жизнеспособность. Как показано на фиг. 12A и 12B, общее количество жизнеспособных клеток и процент жизнеспособных клеток, измеренные на разных стадиях процесса конструирования, были одинаковыми для клеток, полученных от разных доноров и с использованием разных серий конъюгированных с Fab олигомерных реагентов мутеина стрептавидина.

Эффективность трансдукции измеряли в клетках, собранных в результате иллюстративного способа конструирования. Клетки метили антителами, специфичными к CD4, CD8 и суррогатному маркеру, и анализировали с помощью проточной цитометрии. Процент клеток CAR+, CAR+ CD4+, CAR+ CD8+ среди всех жизнеспособных

Т-клеток показан на фиг. 13. Эффективность трансдукции была одинаковой среди различных конъюгированных с Fab олигомерных реагентов мутеина стрептавидина, и наблюдаемая вариабельность в основном зависела от источника-донора.

5 Сконструированные CAR+ Т-клетки также исследовали на различные маркеры, связанные с фенотипами памяти или истощения. Т-клетки метили антителами, специфичными к CD3, CD4, CD8 и суррогатным маркерам, а также к маркерам, связанным с памятью CCR7, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO и CD62L, или маркерам, связанным с истощением CCR7, LAG3, PD-1 и TIM3, а затем анализировали с помощью проточной цитометрии. Не наблюдалось значительных изменений в окрашивании 10 маркеров, связанных с памятью или истощением. Провели принципиальный компонентный анализ по фенотипическим маркерам, связанным с памятью и истощением. Кластеры, полученные из сравнения кумулятивных данных, разделенные по донорам, а не по отдельным сериям конъюгированных с Fab олигомерных реагентов мутеина стрептавидина, согласуются с составом реагентов в отношении связанных с 15 памятью и истощением фенотипов Т-клеток, которые могут возникать во время процесса конструирования.

Сконструированные CAR+ Т-клетки анализировали на наличие остаточного Fab или мутеина стрептавидина на клеточных поверхностях путем обнаружения остаточных Fab против CD3 и против CD28 путем окрашивания StrepTactin-PE или путем 20 обнаружения остаточного мутеина стрептавидина с антителом, специфичным к StrepTactin. Как показано на фиг. 14, менее 1% жизнеспособных Т-клеток были положительными в отношении Fab или мутеина стрептавидина.

Активность CAR-зависимого антигена оценивали путем совместного культивирования сконструированных CAR+ Т-клеток с облученными клетками, экспрессирующими 25 антиген-мишень CAR. В качестве отрицательного контроля служили Т-клетки, культивируемые в отсутствие облученных антиген-экспрессирующих клеток. После четырех часов совместного культивирования Т-клетки оценивали на внутриклеточный IL-2, IFN-гамма и TNF-альфа с помощью внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS), окрашенных на суррогатный маркер, указывающий на экспрессию CAR и CD3, 30 и оценивали с помощью проточной цитометрии. Аналогичные процентные значения клеток, положительных по IL-2, IFN-гамма и TNF-альфа, а также процентные значения клеток, экспрессирующих два или три цитокина, наблюдали среди CAR+ CD3+ Т-клеток, происходящих от разных доноров, и среди клеток, продуцируемых в присутствии 35 различных серий конъюгированных с Fab олигомерных реагентов мутеина стрептавидина.

Цитолитическую активность оценивали в сконструированных CAR+ Т-клетках после совместного культивирования клеток с клетками-мишенями, экспрессирующими антиген-мишень CAR, при соотношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням 5:1. Прилипшие 40 клетки-мишени высевали в лунки электронного планшета для микротитрования, и количество клеток-мишеней количественно определяли путем измерения импеданса электрического тока между прикрепленными электродами. Для контроля клетки-мишени культивировали отдельно или с Т-клетками, которые инкубировали во время иллюстративного процесса конструирования с реагентом в виде парамагнитных шариков, конъюгированных с эталонными антителами против CD3/против CD28-. Как 45 показано на фиг. 15, CAR+ Т-клетки в анализе продемонстрировали эффективное уничтожение. Наблюдаемая цитолитическая активность была сопоставимой среди Т-клеток, полученных от разных отдельных доноров, и среди разных полученных серий конъюгированных с Fab олигомерных реагентов мутеина стрептавидина.

Взяты вместе, эти данные с высокой степенью согласуются с составом конъюгированных с Fab олигомерных реагентов мутеина стрептавидина, полученных с помощью предоставленных способов.

Настоящее изобретение не предназначено для ограничения по объему конкретными раскрытыми вариантами осуществления, которые предоставлены, например, для иллюстрации различных аспектов изобретения. Различные модификации описанных композиций и способов станут очевидными из описания и идей, приведенных здесь. Такие варианты можно применять на практике без отклонения от истинного объема и сущности раскрытия и предназначены для попадания в рамки настоящего раскрытия.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

№	Последовательность	Описание
1	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWL LTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAACKAGVNNGNPLDAVQQ	Стрептавидин Вид: Streptomyces avidinii UniProt № P22629
2	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKS TLVGHDTFTKVKPSAAS	минимальный стрептавидин вид: Streptomyces avidinii
3	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQW LLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAACKAGVNNGNPLDAVQQ	Мутеин Стрептавидина Val44-Thr45- Ala46-Arg47 Вид: Streptomyces avidinii
4	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWK STLVGHDTFTKVKPSAAS	Мутеин Стрептавидин Val44-Thr45- Ala46-Arg47 Вид: Streptomyces avidinii
5	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYIGARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWL LTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAACKAGVNNGNPLDAVQQ	Мутеин Стрептавидин Ile44-Gly45- Ala46-Arg47 Вид: Streptomyces avidinii
6	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYIGARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKS TLVGHDTFTKVKPSAAS	Мутеин Стрептавидин Ile44-Gly45- Ala46-Arg47 Вид: Streptomyces avidinii
7	Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly	Стрептавидин-связывающий пептид, Strep-tag®
8	WSHPQFEK	Strep-tag® II
9	His-Pro-Baa	Стрептавидин-связывающий пептид Baa выбирают из глутамина, аспарагина и метионина
10	His-Pro-Gln-Phe	Стрептавидин-связывающий пептид
11	Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa	Стрептавидин-связывающий пептид Oaa is Trp, Lys или Arg; Xaa представляет собой любую аминокислоту; Yaa представляет собой Gly или Glu Zaa представляет собой Gly, Lys или Arg
12	-Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa-	Стрептавидин-связывающий пептид Xaa представляет собой любую аминокислоту; Yaa представляет собой Gly или Glu Zaa представляет собой Gly, Lys или Arg
13	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa)n-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-	Последовательные модули стрептавидин-связывающего пептида Xaa представляет собой любую аминокислоту; n составляет либо 8, либо 12
14	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)n-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys	Последовательные модули стрептавидин-связывающего пептида n составляет 2 или 3
15	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
16	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSAWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
17	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
18	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
19	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSAWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
20	Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala	HA-tag
21	Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys	VSV-G-tag

	22	Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp	HSV-tag
	23	Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly	T7-эпитоп
	24	Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu	HSV-эпитоп
	25	Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu	Мус-эпитоп
5	26	Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr	V5-tag
	27	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGS SGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYS TLVGHDTFTKVKPSAAS	Мутеин Стрептавидин Пе44-Gly45- Ala-46-Arg47 и Glu117, Gly120, Try121 (мутеин m1-9) Вид: Streptomyces avidinii
	28	DPSKDSKAQVSAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYYVTARGNAESRYV LTGRYDSAPATDGSALTGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQW LLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Мутеин Стрептавидин Пе44-Gly45- Ala-46-Arg47 и Glu117, Gly120, Try121 (мутеин m1-9) Вид: Streptomyces avidinii
10	29	AMQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTTFGVHVVWRQSPGKGLEWLVGIWAS GITD YNVPFMSRLSITKDNSKSQVFFKLNLSLQPD DTAIYYCAKNDPGTFAYWGO GTLVTVSAGSTKGPSVFPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAWLQSSGLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVEPKSCGSA WSHPQ FEKGGGSGGG SGGSAWSHPQFEK	Вариабельный домен Тяжелой цепи Fab-фрагмента m13B8.2
15	30	AMDIQMTQSPASLSASVGETVTFTRASEMIYSYLAWYQQKQKSPQLLVHDAKT LAEGVPSRFSGGGSGTQFSLKINTLQPEDFGTYCYCAHYGNPPTFGGGTKLEIKRGIA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDLHKLQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKAKPACITELЬK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGS	Вариабельный домен Легкой цепи Fab-фрагмента m13B8.2
	31	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Thr Thr Asp Lys Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	Вариабельный домен Тяжелой цепи антитела ОКТ3 против CD3
20	32	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn	Вариабельный домен Легкой цепи антитела ОКТ3 против CD3
25	33	Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val	Вариабельный домен Тяжелой цепи антитела против CD28 CD28.3
	34	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Ser Glu Ser Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	Вариабельный домен Легкой цепи антитела против CD28 CD28.3
30	35	His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys	MAT-tag
35	36	YNLDVARGARSFSPRAGRHFYRVLQVGNVIVGAPGEGNSTGSLYQCQSGTGHC LPVTLRGSNYTSKYLGMTLATDPTDGSILACDPGLSRTCDQNTYLSGLCYLFRQNLQ GPMQLQGRPGFQECIKGNVDLFLFDGSMQLQDEFQKILDFMKDVMKKLSNTSYQF AAVQFSTSYKTEFDSDYVKKRDPDALLKHVKHMLLLTNTFGAINYVATEVFREEL GARPDATKVLIIITDGEATDSGNIDAAKDIRYIIGIGKHFQTKESQETLHKFASKPASE FVKILDTFEKLKDLFTELQKKIYVIEGTSKQDLTSMELSSSGISADLSRGHAVVGA VGAKDWAAGGFLDLKADLQDDTFIGNPLTPEVRAGYLGTYVTWLPQRKTSLLAS GAPRYQH MGRVLLFQEPQGGGHWSQVQTIHGTQIGSYFGGELCGVDVDQDGETE LLLIGAPLFYGEQRRGRVFIYQRRQLGFEEVSELQGDPGYPLGRFGEAITALTDINGD GLVDVAVGAPLEEQAVYIFNGRHGGLSPQPSQRIEGTQVLSGIQWFGRSIHGVKDL EGDGLADVAVGAESQMIVLSSRPVDMVTLMSFSPAIPVHEVECSYSTSNKMKEG VNITICFQIKSLPIPFQGRIVANLTYTLQLDGHRTRRRGLFPGGRHELRRNIAVTTSM SCTDFSFHFPVCVQDLISPINVSLNFWLWEEEGTPRDQRAQKGDIPILRPSLHSETWE IPFEKNCGEDKKCEANLRVFSFSPARSRALRLTAFASLSVELSLNLEEDAYWVQLDL HFPPGLSFRKVEMLKPHSQIPVSCHEELPEESRLLSRALSCNVSSPIFKAGHSVALQMM FNTLVNSSWGDVSELHANVTCNNEDSDLEEDNSATTIIPILYINILIQDQEDSTLYVS FTPKGPKIHQVKHMYQVRIQPSIHDHNIPTLEAVVGVPPQSEGPITHQWSVQMEPP VPCHYEDLERLPDAAEPCPLGALFRCPVVFQREILVQVIGTLELVGEIEASSMFLCS SLSISFNSSKHFHLYGSNASLAQVVMKVVDVYEKQMLYLYVLSGIGGLLLLLLIFIV LYKVGFFKRNLEKMEAGRGVPPNGIPAEDSEQLASQGEAGDPGCKLPLHEKDSESG GGKD	LFA-1α (homo sapiens)
40	37	QECTKFKVSSCRECIESGPGCTWCQKLNFTGPGDPDSIRCDTRPQLLMRGAADDIM DPTSLAETQEDHNGGQKQLSPQKVTLYLRPGQAAAFNVTFRRAKGYPIDLYLMD LSYSMLDDLNRNVKLLGGDLLRALNEITESGRIGFGSFVDKTVLPFVNTHPDKLRNPC PNKEKEQPFFAFRHLVHLKLTNNSNQFQTEVGGKQLISGNLDAPEGGLDA MMQV AAC PEEIGWRNVTRLLVFATDDGFHAGDGKLGAILTPNDGRCHLEDNLYKRSNEFDYP SVGQLAHKLAENNIQPIFAVTSRMVKTYEKLTIEIPKSAV GELSEDSSNVVQLIKNAY NKLSSRVFLDHNALPDTLKVTYDSFCSNGVTHRNQPRGDCDGVQINVPITFQVKVT ATECIQEQSFVIRALGFTDIVTVQVLPQCECRCDQRDRSLCHGKGFLECGICRCDT GYIGKNCCEQTOGRSSQELEGSCRKDNNSIICSGLDGDCVCGQCLCHTSDVPGKLIYG QYCECDTINCERYNGQVCGGPGRGLCFGCKRCHPGFEGSACQCERTTEGCLNPRR	LFA-1β (homo sapiens)

	VECSGRGRRCRCNVCECHSGYQLPLCQECPCGCPSPCGKYISCAECLKFEKGFPGKNC AACPGQLSNNPVKGRCTCKERDSEGCWVAYTLEQQDGMDRYLIYVDESRECVAGP NIAAIVGGTVAGIVLIGILLVWIKALIHLSDLREYRRFEKEKLSQWNNNDNPLFKSA TTTVMNPKFAES	
5	38 DFLAHHGTDCWVYHYSEKPMNWQRARRFCRDNVTDLVAIQNKAEIEYLEKTLPF RSYYWIGIRKIGGIWTVWGTNKSLEEAENWGDGEPNNKKNKEDCWEIYIKRNKDA GKWNDDACHKLKAALCYTASCQPWSCSGHGECVEIINNYTCNCDVGYYPQCQF VIQCEPLEAPELGTMDCTHPLGNFSFSSQCAFSCSEGTNLTGIEETTGPFGNWSSPE PTCQVIQCEPLSAPDLGIMNCSHPLASFSTACTFCSEGTTELIGKKKTICESSGIWSN PSPICQKLDKFSMIKEGDYNPLFIPVAVMVTAFSGLAFIHWLARRLKKGKSKRSM NDPY	L-селектин (homo sapiens)
10	39 FKIEETTPESRYLAQIGDSVSLTCTTGCESPFFSWRTQIDSPNGKVTNEGTTSTLTMN PVSFNGEHSYLCATCESRKLKLEKGIQVEIYSPKDPPEIHLSGPLEAGKPITVKCSVADV YPFDRLEIDLKGDHLMKSQEFLEADRSLETKSLEVTFPTVEDIGKVLVCRACKL HIDEMDSVPTVRQAVKELQVYISPKNTVISVNPSTKLQEGGSVTMTCSSEGLPAPEIF WSKKLDNGNLQHLSGNATLTLIAMRMEDSGIYVCEGVNLIGKNRKEVELIVQEKPF TVEISPGPRIAAQIGDSVMLTCSV MGCESPFSWRTQIDSPLSGKVRSEGTNSTLTL PVSFENEHSYLCVTCGHKKLEKGIQVELYSPFRDPEIEMSGGLVNGSSVTVSCKVP SVYPLDRLEIELKGETILENIEFLEDTDMKSLENKSLEMTFIPTIEDTGKALVCQAKL HIDMEFEPKQRQSTQTYLVNAPRDTTVLSPSSILEEGSSVNMTCLSQGFAPKIL WSRQLPNGELQPLSENATLTLISTKMEDSGVYLCEGINQAGRSRKEVELIIVQVTPKDI KLTAFPSSEVKEGDTVIIISCTCGNVPETWIIKKKAETGDTVLSIDGAYTIRKAQLK DAGVYECESKNKVGSQLRSLTLDVQGRENNKDYFSEPLLIVYFASSLIIPAIGMIYF ARKANMKGYSYLVEAQKSKV	VCAM-1 (homo sapiens)
15	40 YNVDTESALLYQPHNTLFGYSVVLHSHGANRWLLVGAAPTANWLANASVINPGAI YRCRIGKNPGQTCEQLQLGSPNGEPCGKTCLEERDNQWLGVTLSRQPGENGSIVTC GHRWKNIFYIKNENKLP TGCCYGVPPDLRTEL SKRIAPCYQDYVKKFGENFASCQA GISSFYTKDLIV MGAPGSSYWTGSLFVYNTITNKYKAFLDKQNVKFGSYLGSYV AGHFRSQHTTEVVGGAPQHEQIGKAYIFSIDEKELNILHEMKGKGLGSYFGASVCAV DLNADGFSDLLV GAMPQSTIREGRVVFVYINSGGAVMNAMEINLVGSDKYAARF GESIVNLGDIDNDFEDV AIGAPQEDDLQGAIIYINGRADGISSTFSQRIEGLQISKSL SMFGQISGQIDADNGYVDVAVGAFRSDSAVLRTRPVVIVDASLHSPESVNRKTF DCVENGWPSVCIDLTLCSYKGEVPGYIVLFINMSLDVNRKAESPFRFYFSSNGTS DVITGSIQVSSREANCRTHQAFMRKDVDRDLTPIQIEAAYHLGPHVISKRSTEEFPLQ PILQKKEKDIMKKTINFARFAHENCASADLQVSAKIGFLKPHENKTYLAVGSMKT LMLNVSFLNAGDDAYETTLHVKLPVGLYFIKILELEEKQINCEVTDNSGVVQLDCSI GYIYVDHL SRIDISFLLDVSSLRAEEDLSITVHATCENEEMDNLKHRSVTVAIPLK YEVKLTVHGFVNPTSFVYGSNDENEPETC MVEKMNLTFHVINTGNSMAPNVSVEI MVPNSFSPQTDKLFNILDVQTTTGECHFENYQRVCALEEQKKSAMQTLKGIIVRFLSK TDKRLLYCIKADPHCLNFCNFGKMESGKEASVHIQLEGRPSILEMDETSALKFEIRA TGFPEPNRVIENLKDENV AHVLLGLELHHQRPKRYFTIVIISSLLGLIVLLLISYVM WKAGFFKRQYKSILQEENRRDSWSYINSKSNDD	VLA-4 (homo sapiens)
25	41 APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLRMLTFKFYMPKKATELKH QCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIKLGSETTFMCEYADETATI VEFLNRWITFCQSIHSTLT	IL-2
30	42 HKCDITLQEIITLNSLTEQKTLCTELTVDIFAASKNTEKETFCRAATVLRQFYSH HEKDTRCLGATAQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLE RLKTIMREKYSKCSS	IL-4
35	43 DCDIEGKDGKQYESVLMV SIDQLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFL FRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGGQVKGKPAALGEAQPTKS LEENKSLKEQKLNLDL CFLKRLLEIQTWCWNKIL MGTKEH	IL-7
40	44 SPGQGTQSENSCTHFPGNL PNMRLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLKESLLEDF KGYLGCCQALSEMIQFYLEEVMQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRRLRRCHRFL PCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINIEAYMTMKIRN	IL-10
45	45 GIHVFLGCFASAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTA MKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTEGCKECELEEKNIKE FLQSFVHIVQMFINTS	IL-15
50	46 GITIPRNPGPCNSEDKNFPRVTVMNLNIHNRNTNTNPKRSSDYNNRSTSPWNLHRNE DPERYPSVIWEAKCRHLGGINADGNVDYHMNSVPIQEIILVLRREPPHCNPSFRLEK ILVSVGCTCVTPIVHHVA	IL-17
55	47 TPVVRKGRCSICSTNQGTIHLQSLKDLKQFAPSPCEKIEIATLKNGVQTCLNPDSAD VKELIKKWEKQVSQKQKNGKHKQKVKVLRKRSQRSRQKKT	CXCL9
60	48 VPLSRVTRCTCISISNQPVNPRSLEKLEIPASQFCPRVEIATMKKKGEKRCLNPESKA IKNLLKAVSKERSKRSP	CXCL10
65	49 GTNDAEDCCLSVTQKPIPGYIVRNHYLLIKDGCVRPAVFTTLRGRQLCAPDQPW VERIIQRLQRTS AKMKRRSS	CCL19
70	50 SDGGAQDCCLKYSQRKIPAKVVRYSYRKQEPSLGCIPAILFLPRKRSQAEKADPKPE LWVQQLMQHLDKTPSQKPAQGCGRKDRGASKTGKKGKSGKGRTERSQTPKGP	CCL21
75	51 QGVFEDCCLAYHYPIGWAVLRRAWTYRIQEVSGSCNLPAAIFYLPKRHRKVCGNPK SREVQRAMKLLDARNKVFAKLHHTQTFQAGPHAVKKLSSGNSKLSKSSKFSNPISS SKRNVSLISANSGL	CCL25
80	52 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly	αCD16 антигено 3G8 VH

	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
5	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	αCD16 антитело 3G8 VL
10	YNLDVVRGARSFSPPRAGRHFYRVLQVGVNGVIVGAPGEGNSTGSLYQCQSGTGHC LPVTLRGSNYTSKYLGMTLATDPTDGSILACDPGLSRTCDQNTYLSGLCYLFRQNLQ GPMLQGRPFQECIKGNVDLFLFDGSMQLPDEFQKILDFMKDV/MKKLSNTSYQF AAVQFSTSYKTEFDFSDYVKKRDPDALLKHVKHMLLLTNTFGAINYVATEVFREEL GARPDATKVLIIITDGEATDSGNIDAAKDIIRYIIGIGKHFQTKESQETLHKFASKPASE FVKILDTFEKLKDLFTLQKQKIYVIEGTSKQDLT/SFNMELSSSGISADLSRGHAVVGA VGAKDVAGGFLDLKADLQDDTFIGNPLTEVVRAGYLGYTVTWLPSRQKTSLLAS GAPRYQH MGRVLLFQEPQGGGHWSQVQTIHGTQIGSYFGGELCGVDVDQDGETE LLLIGAPLFYGEQRGGRVFIYQRRQLGFEEVSELQGDGPYPLGRFGAITALTIDINGD GLVDVAVGAPLEEQAVYIFNGRHGGLSPQSPQRIEGTQVLSGIQWFGRSIHGVKDL EGDGLADVAVGAESQMIVLSRPVVDVMTLMSFPAEIPVHEVECSYSTSNKMKKEG VNTICFQIKSLIPQFQGRIVANLTYTLQLDGHRTRRRGLFPGGRHELRRNIAVTTSM SCTDFSFHFVPCVQDLISPINVSLNFSLWEEEGTPRDQRAQKGDIPPIRLPSLHSETWE IPFEKNCGEDKKCEANLRVFSFSPARSRALRLTAFASLSVELSLNLEEDAYWVQLDL HFPPGLSFRKVEMLKPHSQIPVSCPEELPEESRLLSRALSCNVSSPIFKAGHSVALQMM FNTLVNNSWGDVSELHANVTCNNEDSDLEDNSATTIIPILYINILIQDQEDSTLYVS FTPKGPKIHQVHMYQVRIQPSIHDHNIPTLEAVVGVPPQPPSEGPITHQWSVQMEPP VPCHYEDLERLPDAAEPCLPALFRCPVVFQREILVQVIGTLELV/GEIEASSMFLCS SL/SISFNSSKHFHLYGSNASLAQVVMKVDVVEKQML	LFA-1α Внеклеточный домен (ECD)
15	QECTKFKVSSCRECIESGPGCTWCQKLNFTGPGDPDSIRCDTRPQLLMRGAADDIM DPTSLAETQEDHNGGQKQLSPQKVTLVLRPGQAAAFNVTFRRAKGYPIDLYLMD LSYSMLDLDRNVKLLGGDLLRALNEITESGRIGFGSFVDKTVLPFVNTHPKLRNPC PNKEKECQPPFAFRHVLKLTNNSNQFQTEV/GKQLISGNLDAPEGGLDA MMQV AAC PEEIGWRNVTLRNLV/FATDDGFHAGDGKLGAILTPNDGRCHLEDNLYKRSNEFDYP SVGQLAHKLANNIPIFAVTSRMVKTYEKLEIIPKSAVGELESSESSNVVQLIKNAY NKLSSRVFLDHNALPDTLKVTYDSFCSNGVTHRNQPRGDCDGVQINVPITFQVKVT ATECIQEQSFFVIRALGFTDIVTVQVLPQCECRCRDQSRDRSLCHGKGFLECGICRCDDT GYIGKCECQYQGRSSQELGSCRKDNNSIICSGLDGDCVCGQCLCHTSDVPGKLIYG QYCECDTINCERYNGQVCGPGRGLCFCGKCRCHPGFEGSACQCERTTEGCLNPRR VECSSGRRCRCNVCECHSGYQLPLCQCEPCGCPSPCGKYISCAECLKFEKGFPGKNC S AACPLQLSNNPVKGRCTCKERDSEGCWVAYTLEQQDGMDRYLIYVDESRECVAG PN	LFA-1β Внеклеточный Домен (ECD)
20	FKIETTPESRYLAQIGDSVSLTCTTGCESPFFSWRTQIDSPLNGKVTNEGTTSTLTMN PVSFGNEHSYLCTATCESRKLEKGIQVEIYSFPPKDPEIHLSGPLEAGKPIV/KCSVADV YPFDRLEIDLKGDHLMKMSQEFLEADDRKSLKSLVTFPTVIEDIGKVLV/CRAKL HIDEVMSVPTVRQAV/KELQVYISPKNTVISVNPSTKLEGGSVTMTCSSEGLPAPEIF WSKKLDNGLNQLHLSGNATLTLIAMRMEDSGIYVCEGVNLIGKNRKEVELIV/QEKPF TVEISPGPRIAAQIGDSVMLTCSV VGCESPSFSWRTQIDSPSGKVRSEGTNSTLTLSP VSFENEHSYLCTVTCGHKLEKGIQVELY/SFPRDPEIEMSGGLVNGSSVTVSCKVPS VYPLDRLEIELLNGFETILENIEFLEDTDMKSLNKSLEMFTIPTIEDTGKALVCQAKLH IDDMEFEPKQRQSTQTYLVN/APRDTTVL/SPSSILEEGSSVNMTCLSQGFPAKILW SRQLPNGELQPLSENATLTLISTKMEDSGVYLCEGINQAGRSRKEVELI/QVTPKDIK LTAFPSESVEKEDT/VIISCTCGNVPETWILKKAETGDTVLKSIDGAYTIRKAQLKD AGVYECESKNKVGSLRSLTLDVQGRENNKDYFSPE	VCAM-1 Внеклеточный Домен (ECD)
25	WTYHYSEKPMNWQRARRFRDNYTDLVAIQNKAEIYLEKTL/PFSRSYYWIGIRKI GGIWTVVGTNKSLEEAENWGDGEPNNKKNKEDC/VEIYIKRNKDAGKWNDDACH KLKAALCYLTASCQPWSCSGHGECVEIINNYTCNCDVGYYPQCFVIQCEPLEAPE LGTMDCTHPLDGNFSSQCAFSCSEGTNLTGIEETT/CGPFGNWSSPEPTCQVIQCEPL SAPDLGIMNCSHPLASFSTACTFICSEGT/ELIGKKTICESSGIWSNPSPICQKLDKS FSMIKEGDYN	L-селектин Внеклеточный Домен (ECD)
30	NVDTESALLYQGHNTLFGYSVVLHSHGANRWLVGAPTANWLANASVINPGAIIY RCRIGKNPGQTCQLQLGSPNGEPCGKTCLEERDNQWLGVTLSRQPGENGSI/VTG HRWKNFIEIKENKLP/PTGGCYGVPDLRTEL/SKRIAPCYQDYVKKFGENFASCQAG ISSFYTKDLIV MGAPGSSYWTGSLFVYNITNKYKAFLDKQNQV/KFGSYLGYVGA GHFRSQHTTEVVGGAPQHEQIGKAY/IFSIDEKELNILHEMKGKGLGSYFGASVCAVD LNADGFSDDL/GAPMQSTIREEGRVVFVYNSGSGAVMNA/MTNLV/GSDKYAARFG ESIVNLGDDIDNDGFEDVAIGAPQEDDLQGAIIY/NGRADGISSTFSQRIEGLQISKLSL MFGQSIGQIDADNNGYVDVAVGAFRSDSAVLLRTRPV/VIVDASL/SHPESVNR/TKF DCVENGWPSVICDLTL/CFYSK/KEVPGYVLFV/NMSLDVNRKAESP/PRFYSSNGTS DVITGSIQVSSREANCRTHQAFMRKDV/RDILTP/IEAAYHLGPHV/ISKRSTEEFP/PLQ PILQKKEKDIMKKTINFAR/FAHENC/SADLQVSAKIGFLK/PHENKTYLAV/GSMKT LMLNVSLFNAGDDAYETTLHV/KLPVGLYFIKILELEEKQINCEVTDNSGVVQLDCSI GYIYVDHL/SRIDIS/FLLDVSSL/SRAEEDL/SITVHATCENEEM/DNLKHSR/TVAIPLK YE/VKLT/VHGFVN/PTSFVYGSNDENEPE TCMVEKM/NLTFHV/INTGNSMAPNV/SVEI M/PNSFS/PQTDKLF/NILDVQ/TTTGEC/HFENYQRVCALE/QQKSAMQTLKGI/VRFLSK TDKRLLYCIKADPHCL/NFLCNFGK/MSGKEASVHIQLEGRPS/ILEMDETSAL/KFEIRA TGFPEPN/PRVIEL/NKDENV/AHVLL/LEGLHH/QRPKRYFT	VLA-4 Внеклеточный Домен (ECD)
35	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATD GSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAW KSTLVGHDTFTKVKPSAAS	минимальный стрептавидин Вид: Streptomyces avidinii
40	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATD GSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAW KSTLVGHDTFTKVKPSAAS	Мутеин Стрептавидин Val44-Thr45-Ala46-Arg47 Вид: Streptomyces avidinii

61	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYYIGARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKS TLVGHDTFTKVKPSAAS	Мутеин Стрептавидин Ile44-Gly45- Ala-46-Arg47 Вид: Streptomyces avidinii
----	---	--

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

5 <110> JUNO THERAPEUTICS GMBH
SCHMIDT, Thomas
STEMBERGER, Christian
KOWSKI, Tom
PRENTICE, Ken

10 <120> олигомерные реагенты в виде частиц и способы их применения
<130> 735042008540
<140> еще не присвоено
<141> одновременно с
<150> US 62/491,245
<151> 2017-04-27

15 <160> 61
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 159
<212> PRT

20 <213> Streptomyces avidinii
<220>
<221> misc_feature
<223> Streptavidin
<400> 1

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

35 Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
85 90 95
Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
100 105 110
40 Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
115 120 125
Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
130 135 140
Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln
145 150 155

45 <210> 2
<211> 126
<212> PRT
<213> Streptomyces avidinii

<220>

<221> прочий признак

<223> Минимальный стрептавидин

<400> 2

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

<210> 3

<211> 159

<212> PRT

<213> Streptomyces avidinii

25 <220>

<221> прочий признак

<223> Мутеин Стрептавидина Val44-Thr45-Ala46-Arg47

<400> 3

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

<210> 4
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Streptomyces avidinii
 5 <220>
 <221> прочий признак
 <223> Мутеин Стрептавидина Val44-Thr45-Ala46-Arg47
 <400> 4
 Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
 10 1 5 10 15
 Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr
 20 25 30
 Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
 35 40 45
 15 Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val
 50 55 60
 Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
 65 70 75 80
 Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu
 20 85 90 95
 Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val
 100 105 110
 Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 115 120 125
 25 <210> 5
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Streptomyces avidinii
 <220>
 30 <221> прочий признак
 <223> Мутеин Стрептавидина Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47
 <400> 5
 Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 35 Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
 20 25 30
 Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly Ala Arg Gly
 35 40 45
 Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
 40 50 55 60
 Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
 65 70 75 80
 Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
 85 90 95
 45 Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
 100 105 110
 Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
 115 120 125

Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
 130 135 140
 Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln
 145 150 155
 5 <210> 6
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Streptomyces avidinii
 <220>
 10 <221> прочий признак
 <223> Мутеин Стрептавидина Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47
 <400> 6
 Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
 1 5 10 15
 15 Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly
 20 25 30
 Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
 35 40 45
 20 Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val
 50 55 60
 Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
 65 70 75 80
 Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu
 85 90 95
 25 Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val
 100 105 110
 Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 115 120 125
 30 <210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> Стрептавидин-связывающий пептид, Strep-tag
 35 <400> 7
 Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly
 1 5
 <210> 8
 <211> 8
 40 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> Strep-tag
 <400> 8
 45 Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly
 1 5
 <210> 9
 <211> 3

<212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> Стрептавидин-связывающий пептид
 5 <220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (3)..(3)
 <223> Хаа выбирают из глутамина, аспарагина и метионина
 <400> 9
 10 His Pro Xaa
 1
 <210> 10
 <211> 4
 <212> PRT
 15 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> Стрептавидин-связывающий пептид
 <400> 10
 His Pro Gln Phe
 20 1
 <210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 25 <220>
 <223> Стрептавидин-связывающий пептид
 <220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (1)..(1)
 30 <223> Хаа представляет собой Trp, Lys или Arg;
 <220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту
 35 <220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (7)..(7)
 <223> Хаа представляет собой Gly или Glu
 <220>
 40 <221> ВАРИАНТ
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа представляет собой Gly, Lys или Arg
 <400> 11
 Xaa Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa
 45 1 5
 <210> 12
 <211> 8
 <212> PRT

<213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> Стрептавидин-связывающий пептид
 <220>
 5 <221> ВАРИАНТ
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту
 <220>
 <221> ВАРИАНТ
 10 <222> (7)..(7)
 <223> Хаа представляет собой Gly или Glu
 <220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (8)..(8)
 15 <223> Хаа представляет собой Gly, Lys или Arg
 <400> 12
 Trp Хаа His Pro Gln Phe Хаа Хаа
 1 5
 <210> 13
 20 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> Последовательные модули стрептавидин-связывающего пептида
 25 <220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа представляет собой любую аминокислоту
 <220>
 30 <221> ПОВТОР
 <222> (9)..(9)
 <223> Хаа повторяется 8 или 12 раз
 <400> 13
 Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Хаа Trp Ser His Pro Gln Phe Glu
 35 1 5 10 15
 Lys
 <210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 40 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> Последовательные модули стрептавидин-связывающего пептида
 <220>
 <221> ПОВТОР
 45 <222> (9)..(12)
 <223> повторяющийся 2 или 3 раза
 <400> 14
 Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro

<211> 28
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 5 <223> Twin-Strep-tag
 <400> 19
 Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 10 20 25
 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 15 <220>
 <223> HA-tag
 <400> 20
 Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 1 5
 20 <210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 25 <223> VSV-G-tag
 <400> 21
 Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
 1 5 10
 <210> 22
 30 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> HSV-tag
 35 <400> 22
 Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp
 1 5 10
 <210> 23
 <211> 10
 40 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> T7-эпитоп
 <400> 23
 45 Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> HSV-эпитоп
 5 <400> 24
 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 1 5 10
 <210> 25
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> Мус-эпитоп
 <400> 25
 15 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> V5-tag
 <400> 26
 Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
 25 1 5 10
 <210> 27
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Streptomyces avidinii
 30 <220>
 <221> прочий признак
 <223> Мутеин Стрептавидина Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 and Glu117, Gly120,
 Try121 (мутеин m1-9)
 <400> 27
 35 Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
 1 5 10 15
 Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr
 20 25 30
 Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
 40 35 40 45
 Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val
 50 55 60
 Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
 65 70 75 80
 45 Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu
 85 90 95
 Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val
 100 105 110

RU 2777989 C2

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 115 120 125
 <210> 28
 <211> 139
 5 <212> PRT
 <213> Streptomyces avidinii
 <220>
 <221> прочий признак
 <223> Мутеин Стрептавидина Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 and Glu117, Gly120,
 10 Try121 (мутеин m1-9)
 <400> 28
 Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
 15 20 25 30
 Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr Ala Arg Gly
 35 40 45
 Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
 50 55 60
 20 Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
 65 70 75 80
 Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
 85 90 95
 Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
 25 100 105 110
 Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val Gly His Asp
 115 120 125
 Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 130 135
 30 <210> 29
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 35 <223> Вариабельный домен тяжелой цепи Fab-фрагмента m13B8.2
 <400> 29
 Ala Met Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15
 Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 40 20 25 30
 Thr Phe Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Ser Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Val Pro
 50 55 60
 45 Phe Met Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80
 Phe Phe Lys Leu Asn Ser Leu Gln Pro Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
 85 90 95

RU 2777 989 C2

Cys Ala Lys Asn Asp Pro Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 5 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 10 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 15 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser
 210 215 220
 Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 20 245 250
 <210> 30
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 25 <220>
 <223> Вариабельный домен легкой цепи Fab-фрагмента m13B8.2
 <400> 30
 Ala Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 30 Val Gly Glu Thr Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser Glu Met Ile Tyr
 20 25 30
 Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu
 35 35 40 45
 Leu Val His Asp Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 35 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala His Tyr Gly Asn
 85 90 95
 40 Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Ile
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 45 130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser

RU 2 777 989 C2

165 170 175
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 5 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Ser
 210 215
 <210> 31
 <211> 119
 10 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> Вариабельный домен легкой цепи антитела ОКТ3 против CD3
 <400> 31
 15 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 20 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 25 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 30 115
 <210> 32
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 35 <220>
 <223> Вариабельный домен легкой цепи антитела ОКТ3 против CD3
 <400> 32
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 40 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
 45 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr

RU 2 777 989 C2

85 90 95
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
 100 105
 <210> 33
 5 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> Вариабельный домен тяжелой цепи антитела CD28.3 против CD28
 10 <400> 33
 Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg
 1 5 10 15
 Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His
 20 25 30
 15 Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe
 35 40 45
 Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys Gly Lys
 50 55 60
 Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu
 20 65 70 75 80
 Thr Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg
 85 90 95
 Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 25 Met Val Thr Val
 115
 <210> 34
 <211> 108
 <212> PRT
 30 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> Вариабельный домен легкой цепи антитела CD28.3 против CD28
 <400> 34
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 35 1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 40 Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys
 45 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105
 <210> 35

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 5 <223> MAT tag
 <400> 35
 His Asn His Arg His Lys His Gly Gly Gly Cys
 1 5 10
 <210> 36
 10 <211> 1145
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> ПРОЧИЙ ПРИЗНАК
 15 <223> LFA-1альфа
 <400> 36
 Tyr Asn Leu Asp Val Arg Gly Ala Arg Ser Phe Ser Pro Pro Arg Ala
 1 5 10 15
 Gly Arg His Phe Gly Tyr Arg Val Leu Gln Val Gly Asn Gly Val Ile
 20 20 25 30
 Val Gly Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Thr Gly Ser Leu Tyr Gln Cys
 35 40 45
 Gln Ser Gly Thr Gly His Cys Leu Pro Val Thr Leu Arg Gly Ser Asn
 50 55 60
 25 Tyr Thr Ser Lys Tyr Leu Gly Met Thr Leu Ala Thr Asp Pro Thr Asp
 65 70 75 80
 Gly Ser Ile Leu Ala Cys Asp Pro Gly Leu Ser Arg Thr Cys Asp Gln
 85 90 95
 Asn Thr Tyr Leu Ser Gly Leu Cys Tyr Leu Phe Arg Gln Asn Leu Gln
 30 100 105 110
 Gly Pro Met Leu Gln Gly Arg Pro Gly Phe Gln Glu Cys Ile Lys Gly
 115 120 125
 Asn Val Asp Leu Val Phe Leu Phe Asp Gly Ser Met Ser Leu Gln Pro
 130 135 140
 35 Asp Glu Phe Gln Lys Ile Leu Asp Phe Met Lys Asp Val Met Lys Lys
 145 150 155 160
 Leu Ser Asn Thr Ser Tyr Gln Phe Ala Ala Val Gln Phe Ser Thr Ser
 165 170 175
 Tyr Lys Thr Glu Phe Asp Phe Ser Asp Tyr Val Lys Arg Lys Asp Pro
 40 180 185 190
 Asp Ala Leu Leu Lys His Val Lys His Met Leu Leu Leu Thr Asn Thr
 195 200 205
 Phe Gly Ala Ile Asn Tyr Val Ala Thr Glu Val Phe Arg Glu Glu Leu
 210 215 220
 45 Gly Ala Arg Pro Asp Ala Thr Lys Val Leu Ile Ile Ile Thr Asp Gly
 225 230 235 240
 Glu Ala Thr Asp Ser Gly Asn Ile Asp Ala Ala Lys Asp Ile Ile Arg
 245 250 255

RU 2777989 C2

Tyr Ile Ile Gly Ile Gly Lys His Phe Gln Thr Lys Glu Ser Gln Glu
 260 265 270
 Thr Leu His Lys Phe Ala Ser Lys Pro Ala Ser Glu Phe Val Lys Ile
 275 280 285
 5 Leu Asp Thr Phe Glu Lys Leu Lys Asp Leu Phe Thr Glu Leu Gln Lys
 290 295 300
 Lys Ile Tyr Val Ile Glu Gly Thr Ser Lys Gln Asp Leu Thr Ser Phe
 305 310 315 320
 Asn Met Glu Leu Ser Ser Ser Gly Ile Ser Ala Asp Leu Ser Arg Gly
 10 325 330 335
 His Ala Val Val Gly Ala Val Gly Ala Lys Asp Trp Ala Gly Gly Phe
 340 345 350
 Leu Asp Leu Lys Ala Asp Leu Gln Asp Asp Thr Phe Ile Gly Asn Glu
 355 360 365
 15 Pro Leu Thr Pro Glu Val Arg Ala Gly Tyr Leu Gly Tyr Thr Val Thr
 370 375 380
 Trp Leu Pro Ser Arg Gln Lys Thr Ser Leu Leu Ala Ser Gly Ala Pro
 385 390 395 400
 Arg Tyr Gln His Met Gly Arg Val Leu Leu Phe Gln Glu Pro Gln Gly
 20 405 410 415
 Gly Gly His Trp Ser Gln Val Gln Thr Ile His Gly Thr Gln Ile Gly
 420 425 430
 Ser Tyr Phe Gly Gly Glu Leu Cys Gly Val Asp Val Asp Gln Asp Gly
 435 440 445
 25 Glu Thr Glu Leu Leu Leu Ile Gly Ala Pro Leu Phe Tyr Gly Glu Gln
 450 455 460
 Arg Gly Gly Arg Val Phe Ile Tyr Gln Arg Arg Gln Leu Gly Phe Glu
 465 470 475 480
 Glu Val Ser Glu Leu Gln Gly Asp Pro Gly Tyr Pro Leu Gly Arg Phe
 30 485 490 495
 Gly Glu Ala Ile Thr Ala Leu Thr Asp Ile Asn Gly Asp Gly Leu Val
 500 505 510
 Asp Val Ala Val Gly Ala Pro Leu Glu Glu Gln Gly Ala Val Tyr Ile
 515 520 525
 35 Phe Asn Gly Arg His Gly Gly Leu Ser Pro Gln Pro Ser Gln Arg Ile
 530 535 540
 Glu Gly Thr Gln Val Leu Ser Gly Ile Gln Trp Phe Gly Arg Ser Ile
 545 550 555 560
 His Gly Val Lys Asp Leu Glu Gly Asp Gly Leu Ala Asp Val Ala Val
 40 565 570 575
 Gly Ala Glu Ser Gln Met Ile Val Leu Ser Ser Arg Pro Val Val Asp
 580 585 590
 Met Val Thr Leu Met Ser Phe Ser Pro Ala Glu Ile Pro Val His Glu
 595 600 605
 45 Val Glu Cys Ser Tyr Ser Thr Ser Asn Lys Met Lys Glu Gly Val Asn
 610 615 620
 Ile Thr Ile Cys Phe Gln Ile Lys Ser Leu Ile Pro Gln Phe Gln Gly
 625 630 635 640

RU 2777989 C2

Arg Leu Val Ala Asn Leu Thr Tyr Thr Leu Gln Leu Asp Gly His Arg
 645 650 655
 Thr Arg Arg Arg Gly Leu Phe Pro Gly Gly Arg His Glu Leu Arg Arg
 660 665 670
 5 Asn Ile Ala Val Thr Thr Ser Met Ser Cys Thr Asp Phe Ser Phe His
 675 680 685
 Phe Pro Val Cys Val Gln Asp Leu Ile Ser Pro Ile Asn Val Ser Leu
 690 695 700
 10 Asn Phe Ser Leu Trp Glu Glu Glu Gly Thr Pro Arg Asp Gln Arg Ala
 705 710 715 720
 Gln Gly Lys Asp Ile Pro Pro Ile Leu Arg Pro Ser Leu His Ser Glu
 725 730 735
 Thr Trp Glu Ile Pro Phe Glu Lys Asn Cys Gly Glu Asp Lys Lys Cys
 740 745 750
 15 Glu Ala Asn Leu Arg Val Ser Phe Ser Pro Ala Arg Ser Arg Ala Leu
 755 760 765
 Arg Leu Thr Ala Phe Ala Ser Leu Ser Val Glu Leu Ser Leu Ser Asn
 770 775 780
 20 Leu Glu Glu Asp Ala Tyr Trp Val Gln Leu Asp Leu His Phe Pro Pro
 785 790 795 800
 Gly Leu Ser Phe Arg Lys Val Glu Met Leu Lys Pro His Ser Gln Ile
 805 810 815
 Pro Val Ser Cys Glu Glu Leu Pro Glu Glu Ser Arg Leu Leu Ser Arg
 820 825 830
 25 Ala Leu Ser Cys Asn Val Ser Ser Pro Ile Phe Lys Ala Gly His Ser
 835 840 845
 Val Ala Leu Gln Met Met Phe Asn Thr Leu Val Asn Ser Ser Trp Gly
 850 855 860
 30 Asp Ser Val Glu Leu His Ala Asn Val Thr Cys Asn Asn Glu Asp Ser
 865 870 875 880
 Asp Leu Leu Glu Asp Asn Ser Ala Thr Thr Ile Ile Pro Ile Leu Tyr
 885 890 895
 Pro Ile Asn Ile Leu Ile Gln Asp Gln Glu Asp Ser Thr Leu Tyr Val
 900 905 910
 35 Ser Phe Thr Pro Lys Gly Pro Lys Ile His Gln Val Lys His Met Tyr
 915 920 925
 Gln Val Arg Ile Gln Pro Ser Ile His Asp His Asn Ile Pro Thr Leu
 930 935 940
 40 Glu Ala Val Val Gly Val Pro Gln Pro Pro Ser Glu Gly Pro Ile Thr
 945 950 955 960
 His Gln Trp Ser Val Gln Met Glu Pro Pro Val Pro Cys His Tyr Glu
 965 970 975
 Asp Leu Glu Arg Leu Pro Asp Ala Ala Glu Pro Cys Leu Pro Gly Ala
 980 985 990
 45 Leu Phe Arg Cys Pro Val Val Phe Arg Gln Glu Ile Leu Val Gln Val
 995 1000 1005
 Ile Gly Thr Leu Glu Leu Val Gly Glu Ile Glu Ala Ser Ser Met
 1010 1015 1020

RU 2777 989 C2

Phe Ser Leu Cys Ser Ser Leu Ser Ile Ser Phe Asn Ser Ser Lys
 1025 1030 1035
 His Phe His Leu Tyr Gly Ser Asn Ala Ser Leu Ala Gln Val Val
 1040 1045 1050
 5 Met Lys Val Asp Val Val Tyr Glu Lys Gln Met Leu Tyr Leu Tyr
 1055 1060 1065
 Val Leu Ser Gly Ile Gly Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ile Phe
 1070 1075 1080
 Ile Val Leu Tyr Lys Val Gly Phe Phe Lys Arg Asn Leu Lys Glu
 10 1085 1090 1095
 Lys Met Glu Ala Gly Arg Gly Val Pro Asn Gly Ile Pro Ala Glu
 1100 1105 1110
 Asp Ser Glu Gln Leu Ala Ser Gly Gln Glu Ala Gly Asp Pro Gly
 1115 1120 1125
 15 Cys Leu Lys Pro Leu His Glu Lys Asp Ser Glu Ser Gly Gly Gly
 1130 1135 1140
 Lys Asp
 1145
 <210> 37
 20 <211> 747
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> ПРОЧИЙ ПРИЗНАК
 25 <223> LFA-1бета
 <400> 37
 Gln Glu Cys Thr Lys Phe Lys Val Ser Ser Cys Arg Glu Cys Ile Glu
 1 5 10 15
 Ser Gly Pro Gly Cys Thr Trp Cys Gln Lys Leu Asn Phe Thr Gly Pro
 30 20 25 30
 Gly Asp Pro Asp Ser Ile Arg Cys Asp Thr Arg Pro Gln Leu Leu Met
 35 40 45
 Arg Gly Cys Ala Ala Asp Asp Ile Met Asp Pro Thr Ser Leu Ala Glu
 50 55 60
 35 Thr Gln Glu Asp His Asn Gly Gly Gln Lys Gln Leu Ser Pro Gln Lys
 65 70 75 80
 Val Thr Leu Tyr Leu Arg Pro Gly Gln Ala Ala Ala Phe Asn Val Thr
 85 90 95
 Phe Arg Arg Ala Lys Gly Tyr Pro Ile Asp Leu Tyr Tyr Leu Met Asp
 40 100 105 110
 Leu Ser Tyr Ser Met Leu Asp Asp Leu Arg Asn Val Lys Lys Leu Gly
 115 120 125
 Gly Asp Leu Leu Arg Ala Leu Asn Glu Ile Thr Glu Ser Gly Arg Ile
 130 135 140
 45 Gly Phe Gly Ser Phe Val Asp Lys Thr Val Leu Pro Phe Val Asn Thr
 145 150 155 160
 His Pro Asp Lys Leu Arg Asn Pro Cys Pro Asn Lys Glu Lys Glu Cys
 165 170 175

RU 2777989 C2

	Gln	Pro	Pro	Phe	Ala	Phe	Arg	His	Val	Leu	Lys	Leu	Thr	Asn	Asn	Ser
				180					185					190		
	Asn	Gln	Phe	Gln	Thr	Glu	Val	Gly	Lys	Gln	Leu	Ile	Ser	Gly	Asn	Leu
			195					200					205			
5	Asp	Ala	Pro	Glu	Gly	Gly	Leu	Asp	Ala	Met	Met	Gln	Val	Ala	Ala	Cys
		210					215					220				
	Pro	Glu	Glu	Ile	Gly	Trp	Arg	Asn	Val	Thr	Arg	Leu	Leu	Val	Phe	Ala
	225					230					235					240
	Thr	Asp	Asp	Gly	Phe	His	Phe	Ala	Gly	Asp	Gly	Lys	Leu	Gly	Ala	Ile
10				245						250					255	
	Leu	Thr	Pro	Asn	Asp	Gly	Arg	Cys	His	Leu	Glu	Asp	Asn	Leu	Tyr	Lys
				260					265					270		
	Arg	Ser	Asn	Glu	Phe	Asp	Tyr	Pro	Ser	Val	Gly	Gln	Leu	Ala	His	Lys
			275					280					285			
15	Leu	Ala	Glu	Asn	Asn	Ile	Gln	Pro	Ile	Phe	Ala	Val	Thr	Ser	Arg	Met
		290					295					300				
	Val	Lys	Thr	Tyr	Glu	Lys	Leu	Thr	Glu	Ile	Ile	Pro	Lys	Ser	Ala	Val
	305					310					315					320
	Gly	Glu	Leu	Ser	Glu	Asp	Ser	Ser	Asn	Val	Val	Gln	Leu	Ile	Lys	Asn
20					325					330					335	
	Ala	Tyr	Asn	Lys	Leu	Ser	Ser	Arg	Val	Phe	Leu	Asp	His	Asn	Ala	Leu
				340					345					350		
	Pro	Asp	Thr	Leu	Lys	Val	Thr	Tyr	Asp	Ser	Phe	Cys	Ser	Asn	Gly	Val
		355						360					365			
25	Thr	His	Arg	Asn	Gln	Pro	Arg	Gly	Asp	Cys	Asp	Gly	Val	Gln	Ile	Asn
		370					375					380				
	Val	Pro	Ile	Thr	Phe	Gln	Val	Lys	Val	Thr	Ala	Thr	Glu	Cys	Ile	Gln
	385					390					395					400
	Glu	Gln	Ser	Phe	Val	Ile	Arg	Ala	Leu	Gly	Phe	Thr	Asp	Ile	Val	Thr
30				405						410					415	
	Val	Gln	Val	Leu	Pro	Gln	Cys	Glu	Cys	Arg	Cys	Arg	Asp	Gln	Ser	Arg
				420						425				430		
	Asp	Arg	Ser	Leu	Cys	His	Gly	Lys	Gly	Phe	Leu	Glu	Cys	Gly	Ile	Cys
		435						440					445			
35	Arg	Cys	Asp	Thr	Gly	Tyr	Ile	Gly	Lys	Asn	Cys	Glu	Cys	Gln	Thr	Gln
		450					455					460				
	Gly	Arg	Ser	Ser	Gln	Glu	Leu	Glu	Gly	Ser	Cys	Arg	Lys	Asp	Asn	Asn
	465					470					475					480
	Ser	Ile	Ile	Cys	Ser	Gly	Leu	Gly	Asp	Cys	Val	Cys	Gly	Gln	Cys	Leu
40				485						490					495	
	Cys	His	Thr	Ser	Asp	Val	Pro	Gly	Lys	Leu	Ile	Tyr	Gly	Gln	Tyr	Cys
			500						505					510		
	Glu	Cys	Asp	Thr	Ile	Asn	Cys	Glu	Arg	Tyr	Asn	Gly	Gln	Val	Cys	Gly
		515						520					525			
45	Gly	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Cys	Phe	Cys	Gly	Lys	Cys	Arg	Cys	His	Pro
		530					535					540				
	Gly	Phe	Glu	Gly	Ser	Ala	Cys	Gln	Cys	Glu	Arg	Thr	Thr	Glu	Gly	Cys
	545					550					555					560

RU 2777989 C2

Thr Ala Ser Cys Gln Pro Trp Ser Cys Ser Gly His Gly Glu Cys Val
 130 135 140
 Glu Ile Ile Asn Asn Tyr Thr Cys Asn Cys Asp Val Gly Tyr Tyr Gly
 145 150 155 160
 5 Pro Gln Cys Gln Phe Val Ile Gln Cys Glu Pro Leu Glu Ala Pro Glu
 165 170 175
 Leu Gly Thr Met Asp Cys Thr His Pro Leu Gly Asn Phe Ser Phe Ser
 180 185 190
 Ser Gln Cys Ala Phe Ser Cys Ser Glu Gly Thr Asn Leu Thr Gly Ile
 10 195 200 205
 Glu Glu Thr Thr Cys Gly Pro Phe Gly Asn Trp Ser Ser Pro Glu Pro
 210 215 220
 Thr Cys Gln Val Ile Gln Cys Glu Pro Leu Ser Ala Pro Asp Leu Gly
 225 230 235 240
 15 Ile Met Asn Cys Ser His Pro Leu Ala Ser Phe Ser Phe Thr Ser Ala
 245 250 255
 Cys Thr Phe Ile Cys Ser Glu Gly Thr Glu Leu Ile Gly Lys Lys Lys
 260 265 270
 Thr Ile Cys Glu Ser Ser Gly Ile Trp Ser Asn Pro Ser Pro Ile Cys
 20 275 280 285
 Gln Lys Leu Asp Lys Ser Phe Ser Met Ile Lys Glu Gly Asp Tyr Asn
 290 295 300
 Pro Leu Phe Ile Pro Val Ala Val Met Val Thr Ala Phe Ser Gly Leu
 305 310 315 320
 25 Ala Phe Ile Ile Trp Leu Ala Arg Arg Leu Lys Lys Gly Lys Lys Ser
 325 330 335
 Lys Arg Ser Met Asn Asp Pro Tyr
 340
 <210> 39
 30 <211> 715
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> ПРОЧИЙ ПРИЗНАК
 35 <223> VCAM-1
 <400> 39
 Phe Lys Ile Glu Thr Thr Pro Glu Ser Arg Tyr Leu Ala Gln Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Ser Val Ser Leu Thr Cys Ser Thr Thr Gly Cys Glu Ser Pro Phe
 40 20 25 30
 Phe Ser Trp Arg Thr Gln Ile Asp Ser Pro Leu Asn Gly Lys Val Thr
 35 40 45
 Asn Glu Gly Thr Thr Ser Thr Leu Thr Met Asn Pro Val Ser Phe Gly
 50 55 60
 45 Asn Glu His Ser Tyr Leu Cys Thr Ala Thr Cys Glu Ser Arg Lys Leu
 65 70 75 80
 Glu Lys Gly Ile Gln Val Glu Ile Tyr Ser Phe Pro Lys Asp Pro Glu
 85 90 95

RU 2777989 C2

Ile His Leu Ser Gly Pro Leu Glu Ala Gly Lys Pro Ile Thr Val Lys
100 105 110
Cys Ser Val Ala Asp Val Tyr Pro Phe Asp Arg Leu Glu Ile Asp Leu
115 120 125
5 Leu Lys Gly Asp His Leu Met Lys Ser Gln Glu Phe Leu Glu Asp Ala
130 135 140
Asp Arg Lys Ser Leu Glu Thr Lys Ser Leu Glu Val Thr Phe Thr Pro
145 150 155 160
Val Ile Glu Asp Ile Gly Lys Val Leu Val Cys Arg Ala Lys Leu His
10 165 170 175
Ile Asp Glu Met Asp Ser Val Pro Thr Val Arg Gln Ala Val Lys Glu
180 185 190
Leu Gln Val Tyr Ile Ser Pro Lys Asn Thr Val Ile Ser Val Asn Pro
195 200 205
15 Ser Thr Lys Leu Gln Glu Gly Gly Ser Val Thr Met Thr Cys Ser Ser
210 215 220
Glu Gly Leu Pro Ala Pro Glu Ile Phe Trp Ser Lys Lys Leu Asp Asn
225 230 235 240
Gly Asn Leu Gln His Leu Ser Gly Asn Ala Thr Leu Thr Leu Ile Ala
20 245 250 255
Met Arg Met Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Val Cys Glu Gly Val Asn Leu
260 265 270
Ile Gly Lys Asn Arg Lys Glu Val Glu Leu Ile Val Gln Glu Lys Pro
275 280 285
25 Phe Thr Val Glu Ile Ser Pro Gly Pro Arg Ile Ala Ala Gln Ile Gly
290 295 300
Asp Ser Val Met Leu Thr Cys Ser Val Met Gly Cys Glu Ser Pro Ser
305 310 315 320
Phe Ser Trp Arg Thr Gln Ile Asp Ser Pro Leu Ser Gly Lys Val Arg
30 325 330 335
Ser Glu Gly Thr Asn Ser Thr Leu Thr Leu Ser Pro Val Ser Phe Glu
340 345 350
Asn Glu His Ser Tyr Leu Cys Thr Val Thr Cys Gly His Lys Lys Leu
355 360 365
35 Glu Lys Gly Ile Gln Val Glu Leu Tyr Ser Phe Pro Arg Asp Pro Glu
370 375 380
Ile Glu Met Ser Gly Gly Leu Val Asn Gly Ser Ser Val Thr Val Ser
385 390 395 400
Cys Lys Val Pro Ser Val Tyr Pro Leu Asp Arg Leu Glu Ile Glu Leu
40 405 410 415
Leu Lys Gly Glu Thr Ile Leu Glu Asn Ile Glu Phe Leu Glu Asp Thr
420 425 430
Asp Met Lys Ser Leu Glu Asn Lys Ser Leu Glu Met Thr Phe Ile Pro
435 440 445
45 Thr Ile Glu Asp Thr Gly Lys Ala Leu Val Cys Gln Ala Lys Leu His
450 455 460
Ile Asp Asp Met Glu Phe Glu Pro Lys Gln Arg Gln Ser Thr Gln Thr
465 470 475 480

RU 2777989 C2

Leu Tyr Val Asn Val Ala Pro Arg Asp Thr Thr Val Leu Val Ser Pro
 485 490 495
 Ser Ser Ile Leu Glu Glu Gly Ser Ser Val Asn Met Thr Cys Leu Ser
 500 505 510
 5 Gln Gly Phe Pro Ala Pro Lys Ile Leu Trp Ser Arg Gln Leu Pro Asn
 515 520 525
 Gly Glu Leu Gln Pro Leu Ser Glu Asn Ala Thr Leu Thr Leu Ile Ser
 530 535 540
 Thr Lys Met Glu Asp Ser Gly Val Tyr Leu Cys Glu Gly Ile Asn Gln
 10 545 550 555 560
 Ala Gly Arg Ser Arg Lys Glu Val Glu Leu Ile Ile Gln Val Thr Pro
 565 570 575
 Lys Asp Ile Lys Leu Thr Ala Phe Pro Ser Glu Ser Val Lys Glu Gly
 580 585 590
 15 Asp Thr Val Ile Ile Ser Cys Thr Cys Gly Asn Val Pro Glu Thr Trp
 595 600 605
 Ile Ile Leu Lys Lys Lys Ala Glu Thr Gly Asp Thr Val Leu Lys Ser
 610 615 620
 Ile Asp Gly Ala Tyr Thr Ile Arg Lys Ala Gln Leu Lys Asp Ala Gly
 20 625 630 635 640
 Val Tyr Glu Cys Glu Ser Lys Asn Lys Val Gly Ser Gln Leu Arg Ser
 645 650 655
 Leu Thr Leu Asp Val Gln Gly Arg Glu Asn Asn Lys Asp Tyr Phe Ser
 660 665 670
 25 Pro Glu Leu Leu Val Leu Tyr Phe Ala Ser Ser Leu Ile Ile Pro Ala
 675 680 685
 Ile Gly Met Ile Ile Tyr Phe Ala Arg Lys Ala Asn Met Lys Gly Ser
 690 695 700
 Tyr Ser Leu Val Glu Ala Gln Lys Ser Lys Val
 30 705 710 715
 <210> 40
 <211> 999
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <220>
 <221> ПРОЧИЙ ПРИЗНАК
 <223> VLA-4
 <400> 40
 Tyr Asn Val Asp Thr Glu Ser Ala Leu Leu Tyr Gln Gly Pro His Asn
 40 1 5 10 15
 Thr Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu His Ser His Gly Ala Asn Arg
 20 25 30
 Trp Leu Leu Val Gly Ala Pro Thr Ala Asn Trp Leu Ala Asn Ala Ser
 35 40 45
 45 Val Ile Asn Pro Gly Ala Ile Tyr Arg Cys Arg Ile Gly Lys Asn Pro
 50 55 60
 Gly Gln Thr Cys Glu Gln Leu Gln Leu Gly Ser Pro Asn Gly Glu Pro
 65 70 75 80

RU 2777 989 C2

	Cys	Gly	Lys	Thr	Cys	Leu	Glu	Glu	Arg	Asp	Asn	Gln	Trp	Leu	Gly	Val
					85					90					95	
	Thr	Leu	Ser	Arg	Gln	Pro	Gly	Glu	Asn	Gly	Ser	Ile	Val	Thr	Cys	Gly
					100					105					110	
5	His	Arg	Trp	Lys	Asn	Ile	Phe	Tyr	Ile	Lys	Asn	Glu	Asn	Lys	Leu	Pro
					115					120					125	
	Thr	Gly	Gly	Cys	Tyr	Gly	Val	Pro	Pro	Asp	Leu	Arg	Thr	Glu	Leu	Ser
					130					135					140	
	Lys	Arg	Ile	Ala	Pro	Cys	Tyr	Gln	Asp	Tyr	Val	Lys	Lys	Phe	Gly	Glu
10					145										150	
															155	
	Asn	Phe	Ala	Ser	Cys	Gln	Ala	Gly	Ile	Ser	Ser	Phe	Tyr	Thr	Lys	Asp
					165										170	
															175	
	Leu	Ile	Val	Met	Gly	Ala	Pro	Gly	Ser	Ser	Tyr	Trp	Thr	Gly	Ser	Leu
					180										185	
															190	
15	Phe	Val	Tyr	Asn	Ile	Thr	Thr	Asn	Lys	Tyr	Lys	Ala	Phe	Leu	Asp	Lys
					195										200	
															205	
	Gln	Asn	Gln	Val	Lys	Phe	Gly	Ser	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Ser	Val	Gly	Ala
					210										215	
															220	
	Gly	His	Phe	Arg	Ser	Gln	His	Thr	Thr	Glu	Val	Val	Gly	Gly	Ala	Pro
20					225										230	
															235	
	Gln	His	Glu	Gln	Ile	Gly	Lys	Ala	Tyr	Ile	Phe	Ser	Ile	Asp	Glu	Lys
					245										250	
															255	
	Glu	Leu	Asn	Ile	Leu	His	Glu	Met	Lys	Gly	Lys	Lys	Leu	Gly	Ser	Tyr
					260										265	
															270	
25	Phe	Gly	Ala	Ser	Val	Cys	Ala	Val	Asp	Leu	Asn	Ala	Asp	Gly	Phe	Ser
					275										280	
															285	
	Asp	Leu	Leu	Val	Gly	Ala	Pro	Met	Gln	Ser	Thr	Ile	Arg	Glu	Glu	Gly
					290										295	
															300	
	Arg	Val	Phe	Val	Tyr	Ile	Asn	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Val	Met	Asn	Ala
30					305										310	
															315	
	Met	Glu	Thr	Asn	Leu	Val	Gly	Ser	Asp	Lys	Tyr	Ala	Ala	Arg	Phe	Gly
					325										330	
															335	
	Glu	Ser	Ile	Val	Asn	Leu	Gly	Asp	Ile	Asp	Asn	Asp	Gly	Phe	Glu	Asp
					340										345	
															350	
35	Val	Ala	Ile	Gly	Ala	Pro	Gln	Glu	Asp	Asp	Leu	Gln	Gly	Ala	Ile	Tyr
					355										360	
															365	
	Ile	Tyr	Asn	Gly	Arg	Ala	Asp	Gly	Ile	Ser	Ser	Thr	Phe	Ser	Gln	Arg
					370										375	
															380	
	Ile	Glu	Gly	Leu	Gln	Ile	Ser	Lys	Ser	Leu	Ser	Met	Phe	Gly	Gln	Ser
40					385										390	
															395	
	Ile	Ser	Gly	Gln	Ile	Asp	Ala	Asp	Asn	Asn	Gly	Tyr	Val	Asp	Val	Ala
					405										410	
															415	
	Val	Gly	Ala	Phe	Arg	Ser	Asp	Ser	Ala	Val	Leu	Leu	Arg	Thr	Arg	Pro
					420										425	
															430	
45	Val	Val	Ile	Val	Asp	Ala	Ser	Leu	Ser	His	Pro	Glu	Ser	Val	Asn	Arg
					435										440	
															445	
	Thr	Lys	Phe	Asp	Cys	Val	Glu	Asn	Gly	Trp	Pro	Ser	Val	Cys	Ile	Asp
					450										455	
															460	

RU 2777989 C2

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

RU 2777989 C2

Lys Thr Asp Lys Arg Leu Leu Tyr Cys Ile Lys Ala Asp Pro His Cys
 850 855 860
 Leu Asn Phe Leu Cys Asn Phe Gly Lys Met Glu Ser Gly Lys Glu Ala
 865 870 875 880
 5 Ser Val His Ile Gln Leu Glu Gly Arg Pro Ser Ile Leu Glu Met Asp
 885 890 895
 Glu Thr Ser Ala Leu Lys Phe Glu Ile Arg Ala Thr Gly Phe Pro Glu
 900 905 910
 Pro Asn Pro Arg Val Ile Glu Leu Asn Lys Asp Glu Asn Val Ala His
 10 915 920 925
 Val Leu Leu Glu Gly Leu His His Gln Arg Pro Lys Arg Tyr Phe Thr
 930 935 940
 Ile Val Ile Ile Ser Ser Ser Leu Leu Leu Gly Leu Ile Val Leu Leu
 945 950 955 960
 15 Leu Ile Ser Tyr Val Met Trp Lys Ala Gly Phe Phe Lys Arg Gln Tyr
 965 970 975
 Lys Ser Ile Leu Gln Glu Glu Asn Arg Arg Asp Ser Trp Ser Tyr Ile
 980 985 990
 Asn Ser Lys Ser Asn Asp Asp
 20 995
 <210> 41
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <220>
 <221> ПРОЧИЙ ПРИЗНАК
 <223> IL-2
 <400> 41
 Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 30 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 35 35 40 45
 35 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 40 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125
 45 Ile Ser Thr Leu Thr
 130
 <210> 42
 <211> 129

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> ПРОЧИЙ ПРИЗНАК
 5 <223> IL-4
 <400> 42
 His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser
 1 5 10 15
 Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile
 10 20 25 30
 Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala
 35 40 45
 Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg
 50 55 60
 15 Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile
 65 70 75 80
 Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu
 85 90 95
 Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe
 20 100 105 110
 Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser
 115 120 125
 Ser
 <210> 43
 25 <211> 152
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> ПРОЧИЙ ПРИЗНАК
 30 <223> IL-7
 <400> 43
 Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
 1 5 10 15
 Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
 35 20 25 30
 Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
 35 40 45
 Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
 50 55 60
 40 Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
 65 70 75 80
 Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
 85 90 95
 Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
 45 100 105 110
 Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
 115 120 125
 Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys

130 135 140
 Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
 145 150
 <210> 44
 5 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> ПРОЧИЙ ПРИЗНАК
 10 <223> IL-10
 <400> 44
 Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
 1 5 10 15
 Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
 15 20 25 30
 Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
 35 40 45
 Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
 50 55 60
 20 Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
 85 90 95
 Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
 25 100 105 110
 Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
 115 120 125
 Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
 130 135 140
 30 Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
 145 150 155 160
 <210> 45
 <211> 133
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> ПРОЧИЙ ПРИЗНАК
 <223> IL-15
 <400> 45
 40 Gly Ile His Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys
 1 5 10 15
 Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu
 20 25 30
 Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser
 35 40 45
 45 Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu
 50 55 60
 Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp

RU 2777989 C2

35 40 45
 Val Gln Thr Cys Leu Asn Pro Asp Ser Ala Asp Val Lys Glu Leu Ile
 50 55 60
 Lys Lys Trp Glu Lys Gln Val Ser Gln Lys Lys Lys Gln Lys Asn Gly
 5 65 70 75 80
 Lys Lys His Gln Lys Lys Lys Val Leu Lys Val Arg Lys Ser Gln Arg
 85 90 95
 Ser Arg Gln Lys Lys Thr Thr
 100
 10 <210> 48
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 15 <221> ПРОЧИЙ ПРИЗНАК
 <223> CXCL10
 <400> 48
 Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys Ile Ser Ile Ser Asn
 1 5 10 15
 20 Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu Glu Ile Ile Pro Ala
 20 25 30
 Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met Lys Lys Lys
 35 40 45
 Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn Leu
 25 50 55 60
 Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Arg Ser Lys Arg Ser Pro
 65 70 75
 <210> 49
 <211> 77
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> ПРОЧИЙ ПРИЗНАК
 <223> CCL19
 35 <400> 49
 Gly Thr Asn Asp Ala Glu Asp Cys Cys Leu Ser Val Thr Gln Lys Pro
 1 5 10 15
 Ile Pro Gly Tyr Ile Val Arg Asn Phe His Tyr Leu Leu Ile Lys Asp
 20 25 30
 40 Gly Cys Arg Val Pro Ala Val Val Phe Thr Thr Leu Arg Gly Arg Gln
 35 40 45
 Leu Cys Ala Pro Pro Asp Gln Pro Trp Val Glu Arg Ile Ile Gln Arg
 50 55 60
 Leu Gln Arg Thr Ser Ala Lys Met Lys Arg Arg Ser Ser
 45 65 70 75
 <210> 50
 <211> 111
 <212> PRT

<213> Homo sapiens
 <220>
 <221> ПРОЧИЙ ПРИЗНАК
 <223> CCL21
 5 <400> 50
 Ser Asp Gly Gly Ala Gln Asp Cys Cys Leu Lys Tyr Ser Gln Arg Lys
 1 5 10 15
 Ile Pro Ala Lys Val Val Arg Ser Tyr Arg Lys Gln Glu Pro Ser Leu
 20 25 30
 10 Gly Cys Ser Ile Pro Ala Ile Leu Phe Leu Pro Arg Lys Arg Ser Gln
 35 40 45
 Ala Glu Leu Cys Ala Asp Pro Lys Glu Leu Trp Val Gln Gln Leu Met
 50 55 60
 15 Gln His Leu Asp Lys Thr Pro Ser Pro Gln Lys Pro Ala Gln Gly Cys
 65 70 75 80
 Arg Lys Asp Arg Gly Ala Ser Lys Thr Gly Lys Lys Gly Lys Gly Ser
 85 90 95
 Lys Gly Cys Lys Arg Thr Glu Arg Ser Gln Thr Pro Lys Gly Pro
 100 105 110
 20 <210> 51
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 25 <221> ПРОЧИЙ ПРИЗНАК
 <223> CCL25
 <400> 51
 Gln Gly Val Phe Glu Asp Cys Cys Leu Ala Tyr His Tyr Pro Ile Gly
 1 5 10 15
 30 Trp Ala Val Leu Arg Arg Ala Trp Thr Tyr Arg Ile Gln Glu Val Ser
 20 25 30
 Gly Ser Cys Asn Leu Pro Ala Ala Ile Phe Tyr Leu Pro Lys Arg His
 35 40 45
 Arg Lys Val Cys Gly Asn Pro Lys Ser Arg Glu Val Gln Arg Ala Met
 35 50 55 60
 Lys Leu Leu Asp Ala Arg Asn Lys Val Phe Ala Lys Leu His His Asn
 65 70 75 80
 Thr Gln Thr Phe Gln Ala Gly Pro His Ala Val Lys Lys Leu Ser Ser
 85 90 95
 40 Gly Asn Ser Lys Leu Ser Ser Ser Lys Phe Ser Asn Pro Ile Ser Ser
 100 105 110
 Ser Lys Arg Asn Val Ser Leu Leu Ile Ser Ala Asn Ser Gly Leu
 115 120 125
 <210> 52
 45 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>

RU 2777 989 C2

<223> антитело 3G8 VH против CD16

<400> 52

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

<210> 53

20 <211> 111

<212> PRT

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<223> антитело 3G8 VL против CD16

25 <400> 53

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

40 <210> 54

<211> 1065

<212> PRT

<213> Искусственная Последовательность

<220>

45 <223> Внеклеточный домен (ECD) LFA-1альфа

<400> 54

Tyr Asn Leu Asp Val Arg Gly Ala Arg Ser Phe Ser Pro Pro Arg Ala
 1 5 10 15

RU 2777989 C2

Gly Arg His Phe Gly Tyr Arg Val Leu Gln Val Gly Asn Gly Val Ile
 20 25 30
 Val Gly Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Thr Gly Ser Leu Tyr Gln Cys
 35 40 45
 5 Gln Ser Gly Thr Gly His Cys Leu Pro Val Thr Leu Arg Gly Ser Asn
 50 55 60
 Tyr Thr Ser Lys Tyr Leu Gly Met Thr Leu Ala Thr Asp Pro Thr Asp
 65 70 75 80
 Gly Ser Ile Leu Ala Cys Asp Pro Gly Leu Ser Arg Thr Cys Asp Gln
 10 85 90 95
 Asn Thr Tyr Leu Ser Gly Leu Cys Tyr Leu Phe Arg Gln Asn Leu Gln
 100 105 110
 Gly Pro Met Leu Gln Gly Arg Pro Gly Phe Gln Glu Cys Ile Lys Gly
 115 120 125
 15 Asn Val Asp Leu Val Phe Leu Phe Asp Gly Ser Met Ser Leu Gln Pro
 130 135 140
 Asp Glu Phe Gln Lys Ile Leu Asp Phe Met Lys Asp Val Met Lys Lys
 145 150 155 160
 Leu Ser Asn Thr Ser Tyr Gln Phe Ala Ala Val Gln Phe Ser Thr Ser
 20 165 170 175
 Tyr Lys Thr Glu Phe Asp Phe Ser Asp Tyr Val Lys Arg Lys Asp Pro
 180 185 190
 Asp Ala Leu Leu Lys His Val Lys His Met Leu Leu Leu Thr Asn Thr
 195 200 205
 25 Phe Gly Ala Ile Asn Tyr Val Ala Thr Glu Val Phe Arg Glu Glu Leu
 210 215 220
 Gly Ala Arg Pro Asp Ala Thr Lys Val Leu Ile Ile Ile Thr Asp Gly
 225 230 235 240
 Glu Ala Thr Asp Ser Gly Asn Ile Asp Ala Ala Lys Asp Ile Ile Arg
 30 245 250 255
 Tyr Ile Ile Gly Ile Gly Lys His Phe Gln Thr Lys Glu Ser Gln Glu
 260 265 270
 Thr Leu His Lys Phe Ala Ser Lys Pro Ala Ser Glu Phe Val Lys Ile
 275 280 285
 35 Leu Asp Thr Phe Glu Lys Leu Lys Asp Leu Phe Thr Glu Leu Gln Lys
 290 295 300
 Lys Ile Tyr Val Ile Glu Gly Thr Ser Lys Gln Asp Leu Thr Ser Phe
 305 310 315 320
 Asn Met Glu Leu Ser Ser Ser Gly Ile Ser Ala Asp Leu Ser Arg Gly
 40 325 330 335
 His Ala Val Val Gly Ala Val Gly Ala Lys Asp Trp Ala Gly Gly Phe
 340 345 350
 Leu Asp Leu Lys Ala Asp Leu Gln Asp Asp Thr Phe Ile Gly Asn Glu
 355 360 365
 45 Pro Leu Thr Pro Glu Val Arg Ala Gly Tyr Leu Gly Tyr Thr Val Thr
 370 375 380
 Trp Leu Pro Ser Arg Gln Lys Thr Ser Leu Leu Ala Ser Gly Ala Pro
 385 390 395 400

RU 2777989 C2

Arg Tyr Gln His Met Gly Arg Val Leu Leu Phe Gln Glu Pro Gln Gly
 405 410 415

Gly Gly His Trp Ser Gln Val Gln Thr Ile His Gly Thr Gln Ile Gly
 420 425 430

5 Ser Tyr Phe Gly Gly Glu Leu Cys Gly Val Asp Val Asp Gln Asp Gly
 435 440 445

Glu Thr Glu Leu Leu Leu Ile Gly Ala Pro Leu Phe Tyr Gly Glu Gln
 450 455 460

10 Arg Gly Gly Arg Val Phe Ile Tyr Gln Arg Arg Gln Leu Gly Phe Glu
 465 470 475 480

Glu Val Ser Glu Leu Gln Gly Asp Pro Gly Tyr Pro Leu Gly Arg Phe
 485 490 495

Gly Glu Ala Ile Thr Ala Leu Thr Asp Ile Asn Gly Asp Gly Leu Val
 500 505 510

15 Asp Val Ala Val Gly Ala Pro Leu Glu Glu Gln Gly Ala Val Tyr Ile
 515 520 525

Phe Asn Gly Arg His Gly Gly Leu Ser Pro Gln Pro Ser Gln Arg Ile
 530 535 540

20 Glu Gly Thr Gln Val Leu Ser Gly Ile Gln Trp Phe Gly Arg Ser Ile
 545 550 555 560

His Gly Val Lys Asp Leu Glu Gly Asp Gly Leu Ala Asp Val Ala Val
 565 570 575

Gly Ala Glu Ser Gln Met Ile Val Leu Ser Ser Arg Pro Val Val Asp
 580 585 590

25 Met Val Thr Leu Met Ser Phe Ser Pro Ala Glu Ile Pro Val His Glu
 595 600 605

Val Glu Cys Ser Tyr Ser Thr Ser Asn Lys Met Lys Glu Gly Val Asn
 610 615 620

30 Ile Thr Ile Cys Phe Gln Ile Lys Ser Leu Ile Pro Gln Phe Gln Gly
 625 630 635 640

Arg Leu Val Ala Asn Leu Thr Tyr Thr Leu Gln Leu Asp Gly His Arg
 645 650 655

Thr Arg Arg Arg Gly Leu Phe Pro Gly Gly Arg His Glu Leu Arg Arg
 660 665 670

35 Asn Ile Ala Val Thr Thr Ser Met Ser Cys Thr Asp Phe Ser Phe His
 675 680 685

Phe Pro Val Cys Val Gln Asp Leu Ile Ser Pro Ile Asn Val Ser Leu
 690 695 700

40 Asn Phe Ser Leu Trp Glu Glu Glu Gly Thr Pro Arg Asp Gln Arg Ala
 705 710 715 720

Gln Gly Lys Asp Ile Pro Pro Ile Leu Arg Pro Ser Leu His Ser Glu
 725 730 735

Thr Trp Glu Ile Pro Phe Glu Lys Asn Cys Gly Glu Asp Lys Lys Cys
 740 745 750

45 Glu Ala Asn Leu Arg Val Ser Phe Ser Pro Ala Arg Ser Arg Ala Leu
 755 760 765

Arg Leu Thr Ala Phe Ala Ser Leu Ser Val Glu Leu Ser Leu Ser Asn
 770 775 780

RU 2777989 C2

Leu Glu Glu Asp Ala Tyr Trp Val Gln Leu Asp Leu His Phe Pro Pro
 785 790 795 800
 Gly Leu Ser Phe Arg Lys Val Glu Met Leu Lys Pro His Ser Gln Ile
 805 810 815
 5 Pro Val Ser Cys Glu Glu Leu Pro Glu Glu Ser Arg Leu Leu Ser Arg
 820 825 830
 Ala Leu Ser Cys Asn Val Ser Ser Pro Ile Phe Lys Ala Gly His Ser
 835 840 845
 Val Ala Leu Gln Met Met Phe Asn Thr Leu Val Asn Ser Ser Trp Gly
 10 850 855 860
 Asp Ser Val Glu Leu His Ala Asn Val Thr Cys Asn Asn Glu Asp Ser
 865 870 875 880
 Asp Leu Leu Glu Asp Asn Ser Ala Thr Thr Ile Ile Pro Ile Leu Tyr
 885 890 895
 15 Pro Ile Asn Ile Leu Ile Gln Asp Gln Glu Asp Ser Thr Leu Tyr Val
 900 905 910
 Ser Phe Thr Pro Lys Gly Pro Lys Ile His Gln Val Lys His Met Tyr
 915 920 925
 Gln Val Arg Ile Gln Pro Ser Ile His Asp His Asn Ile Pro Thr Leu
 20 930 935 940
 Glu Ala Val Val Gly Val Pro Gln Pro Pro Ser Glu Gly Pro Ile Thr
 945 950 955 960
 His Gln Trp Ser Val Gln Met Glu Pro Pro Val Pro Cys His Tyr Glu
 965 970 975
 25 Asp Leu Glu Arg Leu Pro Asp Ala Ala Glu Pro Cys Leu Pro Gly Ala
 980 985 990
 Leu Phe Arg Cys Pro Val Val Phe Arg Gln Glu Ile Leu Val Gln Val
 995 1000 1005
 Ile Gly Thr Leu Glu Leu Val Gly Glu Ile Glu Ala Ser Ser Met
 30 1010 1015 1020
 Phe Ser Leu Cys Ser Ser Leu Ser Ile Ser Phe Asn Ser Ser Lys
 1025 1030 1035
 His Phe His Leu Tyr Gly Ser Asn Ala Ser Leu Ala Gln Val Val
 1040 1045 1050
 35 Met Lys Val Asp Val Val Tyr Glu Lys Gln Met Leu
 1055 1060 1065
 <210> 55
 <211> 678
 <212> PRT
 40 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> Внеклеточный домен (ECD) LFA-1бета
 <400> 55
 Gln Glu Cys Thr Lys Phe Lys Val Ser Ser Cys Arg Glu Cys Ile Glu
 45 1 5 10 15
 Ser Gly Pro Gly Cys Thr Trp Cys Gln Lys Leu Asn Phe Thr Gly Pro
 20 25 30
 Gly Asp Pro Asp Ser Ile Arg Cys Asp Thr Arg Pro Gln Leu Leu Met

RU 2777989 C2

		35					40				45						
		Arg	Gly	Cys	Ala	Ala	Asp	Asp	Ile	Met	Asp	Pro	Thr	Ser	Leu	Ala	Glu
		50					55				60						
		Thr	Gln	Glu	Asp	His	Asn	Gly	Gly	Gln	Lys	Gln	Leu	Ser	Pro	Gln	Lys
5		65					70				75					80	
		Val	Thr	Leu	Tyr	Leu	Arg	Pro	Gly	Gln	Ala	Ala	Ala	Phe	Asn	Val	Thr
						85					90				95		
		Phe	Arg	Arg	Ala	Lys	Gly	Tyr	Pro	Ile	Asp	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Met	Asp
					100					105					110		
10		Leu	Ser	Tyr	Ser	Met	Leu	Asp	Asp	Leu	Arg	Asn	Val	Lys	Lys	Leu	Gly
					115					120				125			
		Gly	Asp	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Asn	Glu	Ile	Thr	Glu	Ser	Gly	Arg	Ile
					130				135				140				
		Gly	Phe	Gly	Ser	Phe	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Leu	Pro	Phe	Val	Asn	Thr
15		145					150					155				160	
		His	Pro	Asp	Lys	Leu	Arg	Asn	Pro	Cys	Pro	Asn	Lys	Glu	Lys	Glu	Cys
					165							170				175	
		Gln	Pro	Pro	Phe	Ala	Phe	Arg	His	Val	Leu	Lys	Leu	Thr	Asn	Asn	Ser
					180					185					190		
20		Asn	Gln	Phe	Gln	Thr	Glu	Val	Gly	Lys	Gln	Leu	Ile	Ser	Gly	Asn	Leu
					195				200					205			
		Asp	Ala	Pro	Glu	Gly	Gly	Leu	Asp	Ala	Met	Met	Gln	Val	Ala	Ala	Cys
					210				215				220				
		Pro	Glu	Glu	Ile	Gly	Trp	Arg	Asn	Val	Thr	Arg	Leu	Leu	Val	Phe	Ala
25		225					230					235				240	
		Thr	Asp	Asp	Gly	Phe	His	Phe	Ala	Gly	Asp	Gly	Lys	Leu	Gly	Ala	Ile
					245							250				255	
		Leu	Thr	Pro	Asn	Asp	Gly	Arg	Cys	His	Leu	Glu	Asp	Asn	Leu	Tyr	Lys
					260					265					270		
30		Arg	Ser	Asn	Glu	Phe	Asp	Tyr	Pro	Ser	Val	Gly	Gln	Leu	Ala	His	Lys
					275				280					285			
		Leu	Ala	Glu	Asn	Asn	Ile	Gln	Pro	Ile	Phe	Ala	Val	Thr	Ser	Arg	Met
					290				295				300				
		Val	Lys	Thr	Tyr	Glu	Lys	Leu	Thr	Glu	Ile	Ile	Pro	Lys	Ser	Ala	Val
35		305					310					315				320	
		Gly	Glu	Leu	Ser	Glu	Asp	Ser	Ser	Asn	Val	Val	Gln	Leu	Ile	Lys	Asn
					325							330				335	
		Ala	Tyr	Asn	Lys	Leu	Ser	Ser	Arg	Val	Phe	Leu	Asp	His	Asn	Ala	Leu
					340						345				350		
40		Pro	Asp	Thr	Leu	Lys	Val	Thr	Tyr	Asp	Ser	Phe	Cys	Ser	Asn	Gly	Val
					355				360						365		
		Thr	His	Arg	Asn	Gln	Pro	Arg	Gly	Asp	Cys	Asp	Gly	Val	Gln	Ile	Asn
					370				375				380				
		Val	Pro	Ile	Thr	Phe	Gln	Val	Lys	Val	Thr	Ala	Thr	Glu	Cys	Ile	Gln
45		385					390					395				400	
		Glu	Gln	Ser	Phe	Val	Ile	Arg	Ala	Leu	Gly	Phe	Thr	Asp	Ile	Val	Thr
					405							410				415	
		Val	Gln	Val	Leu	Pro	Gln	Cys	Glu	Cys	Arg	Cys	Arg	Asp	Gln	Ser	Arg

RU 2777989 C2

		420		425		430										
	Asp	Arg	Ser	Leu	Cys	His	Gly	Lys	Gly	Phe	Leu	Glu	Cys	Gly	Ile	Cys
			435					440					445			
	Arg	Cys	Asp	Thr	Gly	Tyr	Ile	Gly	Lys	Asn	Cys	Glu	Cys	Gln	Thr	Gln
5		450					455					460				
	Gly	Arg	Ser	Ser	Gln	Glu	Leu	Glu	Gly	Ser	Cys	Arg	Lys	Asp	Asn	Asn
	465				470					475					480	
	Ser	Ile	Ile	Cys	Ser	Gly	Leu	Gly	Asp	Cys	Val	Cys	Gly	Gln	Cys	Leu
				485					490					495		
10	Cys	His	Thr	Ser	Asp	Val	Pro	Gly	Lys	Leu	Ile	Tyr	Gly	Gln	Tyr	Cys
			500					505					510			
	Glu	Cys	Asp	Thr	Ile	Asn	Cys	Glu	Arg	Tyr	Asn	Gly	Gln	Val	Cys	Gly
			515					520					525			
	Gly	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Cys	Phe	Cys	Gly	Lys	Cys	Arg	Cys	His	Pro
15		530					535					540				
	Gly	Phe	Glu	Gly	Ser	Ala	Cys	Gln	Cys	Glu	Arg	Thr	Thr	Glu	Gly	Cys
	545				550					555					560	
	Leu	Asn	Pro	Arg	Arg	Val	Glu	Cys	Ser	Gly	Arg	Gly	Arg	Cys	Arg	Cys
				565						570				575		
20	Asn	Val	Cys	Glu	Cys	His	Ser	Gly	Tyr	Gln	Leu	Pro	Leu	Cys	Gln	Glu
			580					585					590			
	Cys	Pro	Gly	Cys	Pro	Ser	Pro	Cys	Gly	Lys	Tyr	Ile	Ser	Cys	Ala	Glu
			595					600					605			
	Cys	Leu	Lys	Phe	Glu	Lys	Gly	Pro	Phe	Gly	Lys	Asn	Cys	Ser	Ala	Ala
25		610					615					620				
	Cys	Pro	Gly	Leu	Gln	Leu	Ser	Asn	Asn	Pro	Val	Lys	Gly	Arg	Thr	Cys
	625				630						635				640	
	Lys	Glu	Arg	Asp	Ser	Glu	Gly	Cys	Trp	Val	Ala	Tyr	Thr	Leu	Glu	Gln
				645						650				655		
30	Gln	Asp	Gly	Met	Asp	Arg	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Val	Asp	Glu	Ser	Arg	Glu
			660					665					670			
	Cys	Val	Ala	Gly	Pro	Asn										
			675													
	<210>	56														
35	<211>	674														
	<212>	PRT														
	<213>	Искусственная Последовательность														
	<220>															
	<223>	Внеклеточный домен (ECD) VCAM-1														
40	<400>	56														
	Phe	Lys	Ile	Glu	Thr	Thr	Pro	Glu	Ser	Arg	Tyr	Leu	Ala	Gln	Ile	Gly
	1				5					10				15		
	Asp	Ser	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Thr	Thr	Gly	Cys	Glu	Ser	Pro	Phe
				20					25				30			
45	Phe	Ser	Trp	Arg	Thr	Gln	Ile	Asp	Ser	Pro	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Thr
			35					40					45			
	Asn	Glu	Gly	Thr	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Met	Asn	Pro	Val	Ser	Phe	Gly
		50					55						60			

RU 2777989 C2

	Asn	Glu	His	Ser	Tyr	Leu	Cys	Thr	Ala	Thr	Cys	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu
	65					70					75					80
	Glu	Lys	Gly	Ile	Gln	Val	Glu	Ile	Tyr	Ser	Phe	Pro	Lys	Asp	Pro	Glu
					85					90					95	
5	Ile	His	Leu	Ser	Gly	Pro	Leu	Glu	Ala	Gly	Lys	Pro	Ile	Thr	Val	Lys
					100				105					110		
	Cys	Ser	Val	Ala	Asp	Val	Tyr	Pro	Phe	Asp	Arg	Leu	Glu	Ile	Asp	Leu
			115					120					125			
	Leu	Lys	Gly	Asp	His	Leu	Met	Lys	Ser	Gln	Glu	Phe	Leu	Glu	Asp	Ala
10		130					135					140				
	Asp	Arg	Lys	Ser	Leu	Glu	Thr	Lys	Ser	Leu	Glu	Val	Thr	Phe	Thr	Pro
	145					150					155					160
	Val	Ile	Glu	Asp	Ile	Gly	Lys	Val	Leu	Val	Cys	Arg	Ala	Lys	Leu	His
					165					170						175
15	Ile	Asp	Glu	Met	Asp	Ser	Val	Pro	Thr	Val	Arg	Gln	Ala	Val	Lys	Glu
					180				185						190	
	Leu	Gln	Val	Tyr	Ile	Ser	Pro	Lys	Asn	Thr	Val	Ile	Ser	Val	Asn	Pro
					195				200					205		
	Ser	Thr	Lys	Leu	Gln	Glu	Gly	Gly	Ser	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ser
20			210					215					220			
	Glu	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	Ile	Phe	Trp	Ser	Lys	Lys	Leu	Asp	Asn
						230						235				240
	Gly	Asn	Leu	Gln	His	Leu	Ser	Gly	Asn	Ala	Thr	Leu	Thr	Leu	Ile	Ala
					245					250						255
25	Met	Arg	Met	Glu	Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr	Val	Cys	Glu	Gly	Val	Asn	Leu
					260					265					270	
	Ile	Gly	Lys	Asn	Arg	Lys	Glu	Val	Glu	Leu	Ile	Val	Gln	Glu	Lys	Pro
					275					280					285	
	Phe	Thr	Val	Glu	Ile	Ser	Pro	Gly	Pro	Arg	Ile	Ala	Ala	Gln	Ile	Gly
30			290					295					300			
	Asp	Ser	Val	Met	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Met	Gly	Cys	Glu	Ser	Pro	Ser
					310							315				320
	Phe	Ser	Trp	Arg	Thr	Gln	Ile	Asp	Ser	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys	Val	Arg
					325					330						335
35	Ser	Glu	Gly	Thr	Asn	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Pro	Val	Ser	Phe	Glu
					340					345					350	
	Asn	Glu	His	Ser	Tyr	Leu	Cys	Thr	Val	Thr	Cys	Gly	His	Lys	Lys	Leu
					355				360					365		
	Glu	Lys	Gly	Ile	Gln	Val	Glu	Leu	Tyr	Ser	Phe	Pro	Arg	Asp	Pro	Glu
40							370						375			380
	Ile	Glu	Met	Ser	Gly	Gly	Leu	Val	Asn	Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Ser
						385					390			395		400
	Cys	Lys	Val	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Asp	Arg	Leu	Glu	Ile	Glu	Leu
					405						410					415
45	Leu	Lys	Gly	Glu	Thr	Ile	Leu	Glu	Asn	Ile	Glu	Phe	Leu	Glu	Asp	Thr
					420					425					430	
	Asp	Met	Lys	Ser	Leu	Glu	Asn	Lys	Ser	Leu	Glu	Met	Thr	Phe	Ile	Pro
					435					440						445

RU 2777989 C2

Thr Ile Glu Asp Thr Gly Lys Ala Leu Val Cys Gln Ala Lys Leu His
 450 455 460
 Ile Asp Asp Met Glu Phe Glu Pro Lys Gln Arg Gln Ser Thr Gln Thr
 465 470 475 480
 5 Leu Tyr Val Asn Val Ala Pro Arg Asp Thr Thr Val Leu Val Ser Pro
 485 490 495
 Ser Ser Ile Leu Glu Glu Gly Ser Ser Val Asn Met Thr Cys Leu Ser
 500 505 510
 10 Gln Gly Phe Pro Ala Pro Lys Ile Leu Trp Ser Arg Gln Leu Pro Asn
 515 520 525
 Gly Glu Leu Gln Pro Leu Ser Glu Asn Ala Thr Leu Thr Leu Ile Ser
 530 535 540
 Thr Lys Met Glu Asp Ser Gly Val Tyr Leu Cys Glu Gly Ile Asn Gln
 545 550 555 560
 15 Ala Gly Arg Ser Arg Lys Glu Val Glu Leu Ile Ile Gln Val Thr Pro
 565 570 575
 Lys Asp Ile Lys Leu Thr Ala Phe Pro Ser Glu Ser Val Lys Glu Gly
 580 585 590
 Asp Thr Val Ile Ile Ser Cys Thr Cys Gly Asn Val Pro Glu Thr Trp
 20 595 600 605
 Ile Ile Leu Lys Lys Lys Ala Glu Thr Gly Asp Thr Val Leu Lys Ser
 610 615 620
 Ile Asp Gly Ala Tyr Thr Ile Arg Lys Ala Gln Leu Lys Asp Ala Gly
 625 630 635 640
 25 Val Tyr Glu Cys Glu Ser Lys Asn Lys Val Gly Ser Gln Leu Arg Ser
 645 650 655
 Leu Thr Leu Asp Val Gln Gly Arg Glu Asn Asn Lys Asp Tyr Phe Ser
 660 665 670
 Pro Glu
 30 <210> 57
 <211> 294
 <212> PRT
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 35 <223> Внеклеточный домен (ECD) L-селектина
 <400> 57
 Trp Thr Tyr His Tyr Ser Glu Lys Pro Met Asn Trp Gln Arg Ala Arg
 1 5 10 15
 Arg Phe Cys Arg Asp Asn Tyr Thr Asp Leu Val Ala Ile Gln Asn Lys
 40 20 25 30
 Ala Glu Ile Glu Tyr Leu Glu Lys Thr Leu Pro Phe Ser Arg Ser Tyr
 35 40 45
 Tyr Trp Ile Gly Ile Arg Lys Ile Gly Gly Ile Trp Thr Trp Val Gly
 50 55 60
 45 Thr Asn Lys Ser Leu Thr Glu Glu Ala Glu Asn Trp Gly Asp Gly Glu
 65 70 75 80
 Pro Asn Asn Lys Lys Asn Lys Glu Asp Cys Val Glu Ile Tyr Ile Lys
 85 90 95

RU 2777989 C2

Arg Asn Lys Asp Ala Gly Lys Trp Asn Asp Asp Ala Cys His Lys Leu
 100 105 110
 Lys Ala Ala Leu Cys Tyr Thr Ala Ser Cys Gln Pro Trp Ser Cys Ser
 115 120 125
 5 Gly His Gly Glu Cys Val Glu Ile Ile Asn Asn Tyr Thr Cys Asn Cys
 130 135 140
 Asp Val Gly Tyr Tyr Gly Pro Gln Cys Gln Phe Val Ile Gln Cys Glu
 145 150 155 160
 Pro Leu Glu Ala Pro Glu Leu Gly Thr Met Asp Cys Thr His Pro Leu
 10 165 170 175
 Gly Asn Phe Ser Phe Ser Ser Gln Cys Ala Phe Ser Cys Ser Glu Gly
 180 185 190
 Thr Asn Leu Thr Gly Ile Glu Glu Thr Thr Cys Gly Pro Phe Gly Asn
 195 200 205
 15 Trp Ser Ser Pro Glu Pro Thr Cys Gln Val Ile Gln Cys Glu Pro Leu
 210 215 220
 Ser Ala Pro Asp Leu Gly Ile Met Asn Cys Ser His Pro Leu Ala Ser
 225 230 235 240
 Phe Ser Phe Thr Ser Ala Cys Thr Phe Ile Cys Ser Glu Gly Thr Glu
 20 245 250 255
 Leu Ile Gly Lys Lys Lys Thr Ile Cys Glu Ser Ser Gly Ile Trp Ser
 260 265 270
 Asn Pro Ser Pro Ile Cys Gln Lys Leu Asp Lys Ser Phe Ser Met Ile
 275 280 285
 25 Lys Glu Gly Asp Tyr Asn
 290
 <210> 58
 <211> 943
 <212> PRT
 30 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> Внеклеточный домен (ECD) VLA-4
 <400> 58
 Asn Val Asp Thr Glu Ser Ala Leu Leu Tyr Gln Gly Pro His Asn Thr
 35 1 5 10 15
 Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu His Ser His Gly Ala Asn Arg Trp
 20 25 30
 Leu Leu Val Gly Ala Pro Thr Ala Asn Trp Leu Ala Asn Ala Ser Val
 35 40 45
 40 Ile Asn Pro Gly Ala Ile Tyr Arg Cys Arg Ile Gly Lys Asn Pro Gly
 50 55 60
 Gln Thr Cys Glu Gln Leu Gln Leu Gly Ser Pro Asn Gly Glu Pro Cys
 65 70 75 80
 Gly Lys Thr Cys Leu Glu Glu Arg Asp Asn Gln Trp Leu Gly Val Thr
 45 85 90 95
 Leu Ser Arg Gln Pro Gly Glu Asn Gly Ser Ile Val Thr Cys Gly His
 100 105 110
 Arg Trp Lys Asn Ile Phe Tyr Ile Lys Asn Glu Asn Lys Leu Pro Thr

RU 2777989 C2

		115				120				125							
		Gly	Gly	Cys	Tyr	Gly	Val	Pro	Pro	Asp	Leu	Arg	Thr	Glu	Leu	Ser	Lys
		130				135				140							
		Arg	Ile	Ala	Pro	Cys	Tyr	Gln	Asp	Tyr	Val	Lys	Lys	Phe	Gly	Glu	Asn
5		145				150				155							160
		Phe	Ala	Ser	Cys	Gln	Ala	Gly	Ile	Ser	Ser	Phe	Tyr	Thr	Lys	Asp	Leu
						165				170							175
		Ile	Val	Met	Gly	Ala	Pro	Gly	Ser	Ser	Tyr	Trp	Thr	Gly	Ser	Leu	Phe
						180				185							190
10		Val	Tyr	Asn	Ile	Thr	Thr	Asn	Lys	Tyr	Lys	Ala	Phe	Leu	Asp	Lys	Gln
						195				200							205
		Asn	Gln	Val	Lys	Phe	Gly	Ser	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Ser	Val	Gly	Ala	Gly
						210				215							220
		His	Phe	Arg	Ser	Gln	His	Thr	Thr	Glu	Val	Val	Gly	Gly	Ala	Pro	Gln
15		225				230				235							240
		His	Glu	Gln	Ile	Gly	Lys	Ala	Tyr	Ile	Phe	Ser	Ile	Asp	Glu	Lys	Glu
						245				250							255
		Leu	Asn	Ile	Leu	His	Glu	Met	Lys	Gly	Lys	Lys	Leu	Gly	Ser	Tyr	Phe
						260				265							270
20		Gly	Ala	Ser	Val	Cys	Ala	Val	Asp	Leu	Asn	Ala	Asp	Gly	Phe	Ser	Asp
						275				280							285
		Leu	Leu	Val	Gly	Ala	Pro	Met	Gln	Ser	Thr	Ile	Arg	Glu	Glu	Gly	Arg
						290				295							300
		Val	Phe	Val	Tyr	Ile	Asn	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Val	Met	Asn	Ala	Met
25		305				310				315							320
		Glu	Thr	Asn	Leu	Val	Gly	Ser	Asp	Lys	Tyr	Ala	Ala	Arg	Phe	Gly	Glu
						325				330							335
		Ser	Ile	Val	Asn	Leu	Gly	Asp	Ile	Asp	Asn	Asp	Gly	Phe	Glu	Asp	Val
						340				345							350
30		Ala	Ile	Gly	Ala	Pro	Gln	Glu	Asp	Asp	Leu	Gln	Gly	Ala	Ile	Tyr	Ile
						355				360							365
		Tyr	Asn	Gly	Arg	Ala	Asp	Gly	Ile	Ser	Ser	Thr	Phe	Ser	Gln	Arg	Ile
						370				375							380
		Glu	Gly	Leu	Gln	Ile	Ser	Lys	Ser	Leu	Ser	Met	Phe	Gly	Gln	Ser	Ile
35		385				390				395							400
		Ser	Gly	Gln	Ile	Asp	Ala	Asp	Asn	Asn	Gly	Tyr	Val	Asp	Val	Ala	Val
						405				410							415
		Gly	Ala	Phe	Arg	Ser	Asp	Ser	Ala	Val	Leu	Leu	Arg	Thr	Arg	Pro	Val
						420				425							430
40		Val	Ile	Val	Asp	Ala	Ser	Leu	Ser	His	Pro	Glu	Ser	Val	Asn	Arg	Thr
						435				440							445
		Lys	Phe	Asp	Cys	Val	Glu	Asn	Gly	Trp	Pro	Ser	Val	Cys	Ile	Asp	Leu
						450				455							460
		Thr	Leu	Cys	Phe	Ser	Tyr	Lys	Gly	Lys	Glu	Val	Pro	Gly	Tyr	Ile	Val
45		465				470				475							480
		Leu	Phe	Tyr	Asn	Met	Ser	Leu	Asp	Val	Asn	Arg	Lys	Ala	Glu	Ser	Pro
						485				490							495
		Pro	Arg	Phe	Tyr	Phe	Ser	Ser	Asn	Gly	Thr	Ser	Asp	Val	Ile	Thr	Gly

RU 2777989 C2

		500		505		510											
	Ser	Ile	Gln	Val	Ser	Ser	Arg	Glu	Ala	Asn	Cys	Arg	Thr	His	Gln	Ala	
			515					520					525				
5	Phe	Met	Arg	Lys	Asp	Val	Arg	Asp	Ile	Leu	Thr	Pro	Ile	Gln	Ile	Glu	
		530					535					540					
	Ala	Ala	Tyr	His	Leu	Gly	Pro	His	Val	Ile	Ser	Lys	Arg	Ser	Thr	Glu	
	545					550					555					560	
	Glu	Phe	Pro	Pro	Leu	Gln	Pro	Ile	Leu	Gln	Gln	Lys	Lys	Glu	Lys	Asp	
					565					570						575	
10	Ile	Met	Lys	Lys	Thr	Ile	Asn	Phe	Ala	Arg	Phe	Cys	Ala	His	Glu	Asn	
					580				585					590			
	Cys	Ser	Ala	Asp	Leu	Gln	Val	Ser	Ala	Lys	Ile	Gly	Phe	Leu	Lys	Pro	
			595					600					605				
15	His	Glu	Asn	Lys	Thr	Tyr	Leu	Ala	Val	Gly	Ser	Met	Lys	Thr	Leu	Met	
	610						615					620					
	Leu	Asn	Val	Ser	Leu	Phe	Asn	Ala	Gly	Asp	Asp	Ala	Tyr	Glu	Thr	Thr	
	625					630					635					640	
	Leu	His	Val	Lys	Leu	Pro	Val	Gly	Leu	Tyr	Phe	Ile	Lys	Ile	Leu	Glu	
					645					650						655	
20	Leu	Glu	Glu	Lys	Gln	Ile	Asn	Cys	Glu	Val	Thr	Asp	Asn	Ser	Gly	Val	
					660				665						670		
	Val	Gln	Leu	Asp	Cys	Ser	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Val	Asp	His	Leu	Ser	
			675					680					685				
25	Arg	Ile	Asp	Ile	Ser	Phe	Leu	Leu	Asp	Val	Ser	Ser	Leu	Ser	Arg	Ala	
	690						695					700					
	Glu	Glu	Asp	Leu	Ser	Ile	Thr	Val	His	Ala	Thr	Cys	Glu	Asn	Glu	Glu	
	705					710					715					720	
	Glu	Met	Asp	Asn	Leu	Lys	His	Ser	Arg	Val	Thr	Val	Ala	Ile	Pro	Leu	
					725					730					735		
30	Lys	Tyr	Glu	Val	Lys	Leu	Thr	Val	His	Gly	Phe	Val	Asn	Pro	Thr	Ser	
					740				745						750		
	Phe	Val	Tyr	Gly	Ser	Asn	Asp	Glu	Asn	Glu	Pro	Glu	Thr	Cys	Met	Val	
			755					760					765				
35	Glu	Lys	Met	Asn	Leu	Thr	Phe	His	Val	Ile	Asn	Thr	Gly	Asn	Ser	Met	
	770						775					780					
	Ala	Pro	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Ile	Met	Val	Pro	Asn	Ser	Phe	Ser	Pro	
	785					790					795					800	
	Gln	Thr	Asp	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile	Leu	Asp	Val	Gln	Thr	Thr	Thr	Gly	
					805					810						815	
40	Glu	Cys	His	Phe	Glu	Asn	Tyr	Gln	Arg	Val	Cys	Ala	Leu	Glu	Gln	Gln	
					820				825					830			
	Lys	Ser	Ala	Met	Gln	Thr	Leu	Lys	Gly	Ile	Val	Arg	Phe	Leu	Ser	Lys	
			835					840					845				
45	Thr	Asp	Lys	Arg	Leu	Leu	Tyr	Cys	Ile	Lys	Ala	Asp	Pro	His	Cys	Leu	
	850						855					860					
	Asn	Phe	Leu	Cys	Asn	Phe	Gly	Lys	Met	Glu	Ser	Gly	Lys	Glu	Ala	Ser	
	865					870					875					880	
	Val	His	Ile	Gln	Leu	Glu	Gly	Arg	Pro	Ser	Ile	Leu	Glu	Met	Asp	Glu	

				885					890				895			
	Thr	Ser	Ala	Leu	Lys	Phe	Glu	Ile	Arg	Ala	Thr	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro
				900					905				910			
	Asn	Pro	Arg	Val	Ile	Glu	Leu	Asn	Lys	Asp	Glu	Asn	Val	Ala	His	Val
5			915					920					925			
	Leu	Leu	Glu	Gly	Leu	His	His	Gln	Arg	Pro	Lys	Arg	Tyr	Phe	Thr	
			930					935					940			
	<210>	59														
	<211>	127														
10	<212>	PRT														
	<213>	Streptomyces avidinii														
	<220>															
	<221>	ПРОЧИЙ ПРИЗНАК														
	<223>	Минимальный стрептавидин														
15	<400>	59														
	Met	Glu	Ala	Gly	Ile	Thr	Gly	Thr	Trp	Tyr	Asn	Gln	Leu	Gly	Ser	Thr
	1			5						10					15	
	Phe	Ile	Val	Thr	Ala	Gly	Ala	Asp	Gly	Ala	Leu	Thr	Gly	Thr	Tyr	Glu
				20					25					30		
20	Ser	Ala	Val	Gly	Asn	Ala	Glu	Ser	Arg	Tyr	Val	Leu	Thr	Gly	Arg	Tyr
			35					40						45		
	Asp	Ser	Ala	Pro	Ala	Thr	Asp	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Leu	Gly	Trp	Thr
			50				55					60				
	Val	Ala	Trp	Lys	Asn	Asn	Tyr	Arg	Asn	Ala	His	Ser	Ala	Thr	Thr	Trp
25	65					70					75				80	
	Ser	Gly	Gln	Tyr	Val	Gly	Gly	Ala	Glu	Ala	Arg	Ile	Asn	Thr	Gln	Trp
					85					90					95	
	Leu	Leu	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Glu	Ala	Asn	Ala	Trp	Lys	Ser	Thr	Leu
				100					105					110		
30	Val	Gly	His	Asp	Thr	Phe	Thr	Lys	Val	Lys	Pro	Ser	Ala	Ala	Ser	
			115					120						125		
	<210>	60														
	<211>	127														
	<212>	PRT														
35	<213>	Streptomyces avidinii														
	<220>															
	<221>	ПРОЧИЙ ПРИЗНАК														
	<223>	Мутеин Стрептавидина Val44-Thr45-Ala46-Arg47														
	<400>	60														
40	Met	Glu	Ala	Gly	Ile	Thr	Gly	Thr	Trp	Tyr	Asn	Gln	Leu	Gly	Ser	Thr
	1			5						10					15	
	Phe	Ile	Val	Thr	Ala	Gly	Ala	Asp	Gly	Ala	Leu	Thr	Gly	Thr	Tyr	Val
				20					25					30		
	Thr	Ala	Arg	Gly	Asn	Ala	Glu	Ser	Arg	Tyr	Val	Leu	Thr	Gly	Arg	Tyr
45			35					40					45			
	Asp	Ser	Ala	Pro	Ala	Thr	Asp	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Leu	Gly	Trp	Thr
			50				55					60				
	Val	Ala	Trp	Lys	Asn	Asn	Tyr	Arg	Asn	Ala	His	Ser	Ala	Thr	Thr	Trp

	65				70					75				80		
	Ser	Gly	Gln	Tyr	Val	Gly	Gly	Ala	Glu	Ala	Arg	Ile	Asn	Thr	Gln	Trp
					85					90				95		
	Leu	Leu	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Glu	Ala	Asn	Ala	Trp	Lys	Ser	Thr	Leu
5				100				105						110		
	Val	Gly	His	Asp	Thr	Phe	Thr	Lys	Val	Lys	Pro	Ser	Ala	Ala	Ser	
			115					120					125			
	<210>	61														
	<211>	126														
10	<212>	PRT														
	<213>	Streptomyces	avidinii													
	<220>															
	<221>	ПРОЧИЙ	ПРИЗНАК													
	<223>	Мутеин	Стрептавидина	Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47												
15	<400>	61														
	Glu	Ala	Gly	Ile	Thr	Gly	Thr	Trp	Tyr	Asn	Gln	Leu	Gly	Ser	Thr	Phe
	1			5					10					15		
	Ile	Val	Thr	Ala	Gly	Ala	Asp	Gly	Ala	Leu	Thr	Gly	Thr	Tyr	Ile	Gly
			20					25					30			
20	Ala	Arg	Gly	Asn	Ala	Glu	Ser	Arg	Tyr	Val	Leu	Thr	Gly	Arg	Tyr	Asp
			35					40					45			
	Ser	Ala	Pro	Ala	Thr	Asp	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Leu	Gly	Trp	Thr	Val
	50					55						60				
	Ala	Trp	Lys	Asn	Asn	Tyr	Arg	Asn	Ala	His	Ser	Ala	Thr	Thr	Trp	Ser
25	65				70				75					80		
	Gly	Gln	Tyr	Val	Gly	Gly	Ala	Glu	Ala	Arg	Ile	Asn	Thr	Gln	Trp	Leu
				85					90					95		
	Leu	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Glu	Ala	Asn	Ala	Trp	Lys	Ser	Thr	Leu	Val
			100					105					110			
30	Gly	His	Asp	Thr	Phe	Thr	Lys	Val	Lys	Pro	Ser	Ala	Ala	Ser		
			115					120					125			

(57) Формула изобретения

1. Олигомерный реагент в виде частиц для мультимеризации одного или более связывающих агентов, где олигомерный реагент в виде частиц представляет собой растворимый олигомер из от 1500 до 7500 тетрамеров стрептавидина или его функционально активного фрагмента или молекулы мутеина стрептавидина или ее функционально активного фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ или Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ в положениях последовательности, соответствующим положениям 44-47 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1.

2. Олигомерный реагент в виде частиц по п. 1, где каждый из стрептавидина или молекул мутеина стрептавидина или их функционально активных фрагментов содержит участок связывания для биотина, аналога биотина или стрептавидин-связывающего пептида.

3. Олигомерный реагент в виде частиц по п. 1 или 2, где каждый из функционально активных фрагментов начинаются на N-конце в области позиций аминокислот 10-16 последовательности SEQ ID NO: 1 и заканчиваются на C-конце в области позиций

аминокислот 133-142 последовательности SEQ ID NO: 1.

4. Олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 1-3, где олигомерный реагент в виде частиц представляет собой растворимый олигомер из от 1500 до 7500 тетрамеров молекулы мутеина стрептавидина или ее функционально активного фрагмента.

5. Олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 1-4, при этом каждая из молекул мутеина стрептавидина или их функционально активных фрагментов обратимо связывается с биотином, аналогом биотина или стрептавидин-связывающим пептидом.

6. Олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 1-5, при этом каждая из молекул мутеина стрептавидина или их функционально активных фрагментов содержит: последовательность аминокислот, которая демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с любой SEQ ID NO: 3-6, 27, 28, 60 или 61, или ее функциональный фрагмент, который обратимо связывается с биотином, аналогом биотина или стрептавидин-связывающим пептидом, где аминокислотная последовательность или ее функциональный фрагмент содержит аминокислотную последовательность, соответствующую Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ или Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷, в положениях последовательности, соответствующим положениям 44-47 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1.

7. Олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 1-6, где каждая из молекул мутеина стрептавидина или их функционально активных фрагментов содержит аминокислотную последовательность, представленной любой из SEQ ID NO: 3-6, 27, 28, 60 или 61, или ее функциональный фрагмент, который обратимо связывается с биотином, аналогом биотина или стрептавидин-связывающим пептидом, где ее функциональный фрагмент содержит аминокислотную последовательность, соответствующую Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ или Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷, в положениях последовательности, соответствующих положениям 44-47 аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1.

8. Олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 1-7, где каждая из молекул мутеина стрептавидина или их функционально активных фрагментов обратимо связывается с стрептавидин-связывающим пептидом.

9. Олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 2-8, где стрептавидин-связывающий пептид представляет собой аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 7 или 8.

10. Олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 1-9, где каждая из молекул мутеина стрептавидина или их функционально активных фрагментов содержит аминокислотную последовательность, представленную любой из SEQ ID NO: 3-6, 27, 28, 60 или 61.

11. Олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 1-10, при этом каждая из молекул мутеина стрептавидина или их функционально активных фрагментов содержит последовательность аминокислот, приведенную в SEQ ID NO: 6.

12. Олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 1-11, при этом олигомер содержит радиус между 50 нм и 150 нм, между 75 нм и 125 нм, между 80 нм и 115 нм или между 90 нм и 110 нм, каждый включительно.

13. Олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 1-12, при этом олигомер содержит радиус 90 нм ± 15 нм или 95 нм ± 20-25 нм.

14. Олигомерный реагент в виде частиц по п. 12 или 13, при этом радиус представляет собой гидродинамический радиус.

15. Олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 1–14, при этом олигомер имеет молекулярную массу между 5×10^7 г/моль и 5×10^8 г/моль, между 1×10^8 г/моль и 5×10^8 г/моль или между 1×10^8 г/моль и 2×10^8 г/моль.

16. Олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 1–15, при этом олигомер содержит между 2000 и 5000, между 2000 и 3000, или между 2000 и 2500 тетрамеров.

17. Олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 1–16, при этом менее чем 20%, 10%, 5%, 1% лизиновых остатков олигомера содержат N-замещенный имиотиолан.

18. Олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 1–17, где стрептавидин или молекулы мутеина стрептавидаина или их функционально активные фрагменты олигомера сшиты гетеробифункциональным сшивающим средством.

19. Олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 1–18, где стрептавидин или молекулы мутеина стрептавидаина или их функционально активные фрагменты олигомера сшиты сшивающим аминную и тиольные группы средством.

20. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц для стимулирования клеток, содержащий олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 1–19, первый рецептор–связывающий агент и второй рецептор–связывающий агент, где:

первый рецептор–связывающий агент содержит (i) первый партнер по связыванию, который связан с одним или более первыми участками связывания стрептавидаина или молекул мутеина стрептавидаина или их функционально активных фрагментов олигомерного реагента в виде частиц, и (ii) первое антитело или фрагмент антитела, которое связывается с рецептором, экспрессированным на поверхности клетки-мишени, для индуцирования первичного сигнала активации в клетке-мишени; и

второй рецептор–связывающий агент содержит (i) второй партнер по связыванию, который связан с одним или более вторыми участками связывания стрептавидаина или молекул мутеина стрептавидаина или их функционально активных фрагментов олигомерного реагента в виде частиц, и (ii) второе антитело или фрагмент антитела, которое связывается с костимулирующей молекулой, экспрессируемой на поверхности клетки-мишени для индуцирования костимулирующего сигнала в клетке-мишени.

21. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по п. 20, где олигомерный реагент в виде частиц представляет собой растворимый олигомер из от 1500 и 7500 тетрамеров молекулы мутеина стрептавидаина или ее функционально активного фрагмента.

22. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по п. 20 или 21, где каждая из молекул мутеина стрептавидаина или их функционально активных фрагментов содержит аминокислотную последовательность, представленную любой из SEQ ID NO: 3–6, 27, 28, 60 или 61.

23. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 20–22, где каждая из молекул мутеина стрептавидаина или их функционально активных фрагментов содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6.

24. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 20–23, где:

первый партнер по связыванию обратимо связан с одним или более первыми участками связывания; и/или

второй партнер по связыванию обратимо связан с одним или более вторыми участками связывания.

25. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 20–24, где первый и/или второй партнер по связыванию содержит биотин, аналог биотина

или стрептавидин–связывающий пептид.

26. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 20-25, где первый и/или второй партнер по связыванию содержит стрептавидин–связывающий пептид.

5 27. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по п. 25 или 26, где стрептавидин–связывающий пептид первого и/или второго партнера по связыванию представляет собой аминокислотную последовательность, представленную любой из SEQ ID NO: 7, 8 и 15-19.

10 28. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 25-27, где стрептавидин–связывающий пептид первого и/или второго партнера по связыванию представляет собой SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWHPQFEK (SEQ ID NO: 16).

29. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 20-28, где клетка-мишень представляет собой иммунную клетку.

15 30. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 20-29, где клетка-мишень представляет собой Т-клетку.

31. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 20-30, где первичный сигнал активации представляет собой связанный с TCR/CD3 комплексом сигнал.

20 32. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 20-31, где первый рецептор–связывающий агент связывается с представителем TCR/CD3 комплекса.

33. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 20-32, где первый рецептор–связывающий агент специфически связывается с CD3.

25 34. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 20-33, где костимулирующая молекула представляет собой CD28, CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 или HVEM.

35. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 20-34, где костимулирующая молекула представляет собой CD28.

30 36. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 25-35, где первый рецептор–связывающий агент содержит стрептавидин–связывающий пептид и антитело против CD3 или фрагмент антитела, и второй рецептор–связывающий агент содержит стрептавидин–связывающий пептид и антитело против CD28 или фрагмент антитела.

35 37. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 20-36, где:

где первый рецептор–связывающий агент содержит первый фрагмент антитела, который связывается с рецептором; и/или

40 где второй рецептор–связывающий агент содержит второй фрагмент антитела, который связывается с костимулирующей молекулой.

38. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по п. 37, где первый и/или второй фрагмент антитела представляет собой фрагмент моновалентного антитела.

45 39. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по п. 37 или 38, где первый и/или второй фрагмент антитела представляет собой Fab.

40 40. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 25-39, где первый рецептор–связывающий агент содержит стрептавидин–связывающий пептид и анти-CD3 Fab, и второй рецептор–связывающий агент содержит

стрептавидин–связывающий пептид и анти-CD28 Fab.

41. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц для селекции клеток, содержащий олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 1-19 и селективный агент, где селективный агент содержит (i) партнер по связыванию, который связан с одним или более участками связывания стрептавидаина или молекул мутеина стрептавидаина или их функционально активных фрагментов олигомерного реагента в виде частиц, и (ii) антитело или фрагмент антитела, которое связывается с селективным маркером, экспрессированным на поверхности клетки-мишени.

42. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по п. 41, где олигомерный реагент в виде частиц представляет собой растворимый олигомер из от 1500 и 7500 тетрамеров молекулы мутеина стрептавидаина или ее функционально активного фрагмента.

43. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по п. 41 или 42, где каждая из молекул мутеина стрептавидаина или их функционально активных фрагментов содержит аминокислотную последовательность, представленную любой из SEQ ID NO: 3-6, 27, 28, 60 или 61.

44. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 41-43, каждая из молекул мутеина стрептавидаина или их функционально активных фрагментов содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6.

45. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 41-44, где партнер по связыванию обратимо связан с одним или более участками связывания.

46. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 41-45, где партнер по связыванию содержит биотин, аналог биотина или стрептавидин–связывающий пептид.

47. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 41-46, где партнер по связыванию содержит стрептавидин–связывающий пептид.

48. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по п. 46 или 47, где стрептавидин–связывающий пептид представляет собой аминокислотную последовательность, представленную любой из SEQ ID NO: 7, 8 и 15-19.

49. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 46-48, где стрептавидин–связывающий пептид представляет собой SAWSHRPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHRPQFEK (SEQ ID NO: 16).

50. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 41-49, где селективный агент содержит фрагмент антитела, который связывается с селективным маркером.

51. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 41-50, где фрагмент антитела представляет собой фрагмент моновалентного антитела.

52. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 41-51, где фрагмент антитела представляет собой Fab.

53. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 41-52, где клетка-мишень представляет собой иммунную клетку.

54. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 41-53, где клетка-мишень представляет собой Т-клетку.

55. Мультимеризированный олигомерный реагент в виде частиц по любому из пп. 41-54, где селективный маркер представляет собой CCR7, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD27, CD45RA, CD45RO, CD62L или CD127.

56. Способ стимулирования клеток, причем способ включает инкубацию композиции клеток, содержащей клетки–мишени, в присутствии мультимеризированного олигомерного реагента в виде частиц по любому из пп. 20–40, стимулируя таким образом клетки–мишени.

57. Способ по п. 56, где олигомерный реагент в виде частиц мультимеризированного олигомерного реагента в виде частиц представляет собой растворимый олигомер из от 1500 и 7500 тетрамеров молекулы мутеина стрептавидина или ее функционально активного фрагмента.

58. Способ по п. 56 или 57, где каждая из молекул мутеина стрептавидина или их функционально активных фрагментов содержит аминокислотную последовательность, представленную любой из SEQ ID NO: 3-6, 27, 28, 60 или 61.

59. Способ по любому из пп. 56-58, где каждая из молекул мутеина стрептавидина или их функционально активных фрагментов содержит аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6.

60. Способ по любому из пп. 56-59, при этом первый партнер по связыванию обратимо связан с одним или более первыми участками связывания; и/или второй партнер по связыванию обратимо связан с одним или более вторыми участками связывания.

61. Способ по любому из пп. 56-60, при этом первый и/или второй партнер по связыванию содержит стрептавидин–связывающий пептид.

62. Способ по п. 61, где стрептавидин–связывающий пептид первого и/или второго партнера по связыванию представляет собой аминокислотную последовательность, представленную любой из SEQ ID NO: 7, 8 и 15-19.

63. Способ по п. 61 или 62, где стрептавидин–связывающий пептид первого и/или второго партнера по связыванию представляет собой
SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO: 16).

64. Способ по любому из пп. 56-63, где:

первый рецептор–связывающий агент содержит первый фрагмент антитела, который связывается с рецептором; и/или

второй рецептор–связывающий агент содержит второй фрагмент антитела, который связывается с костимулирующей молекулой.

65. Способ по п. 64, при этом первый и/или второй фрагмент антитела представляет собой фрагмент моновалентного антитела.

66. Способ по п. 64 или 65, при этом первый и/или второй фрагмент антитела представляет собой Fab.

67. Способ по любому из пп. 56–66, при этом клетками–мишенями являются иммунные клетки.

68. Способ по любому из пп. 56–67, при этом клетки–мишени представляют собой Т–клетки.

69. Способ по любому из пп. 56–68, при этом первичный сигнал активации представляет собой связанный с комплексом TCR/CD3 сигнал.

70. Способ по любому из пп. 56-69, где первый рецептор–связывающий агент связывается с представителем TCR/CD3 комплекса.

71. Способ по любому из пп. 56-70, где первый рецептор–связывающий агент специфически связывается с CD3.

72. Способ по любому из пп. 56-71, где костимулирующая молекула представляет собой CD28, CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 или HVEM.

73. Способ по любому из пп. 56-72, при этом костимулирующей молекулой является

CD28.

74. Способ по любому из пп. 61-63 и 67-73, где первый рецептор–связывающий агент содержит стрептавидин–связывающий пептид и антитело против CD3 или фрагмент антитела, и второй рецептор–связывающий агент содержит стрептавидин–связывающий пептид и антитело против CD28 или фрагмент антитела.

75. Способ по любому из пп. 61-74, где первый рецептор–связывающий агент содержит стрептавидин–связывающий пептид и анти-CD3 Fab, и второй рецептор–связывающий агент содержит стрептавидин–связывающий пептид и анти-CD28 Fab.

76. Способ по любому из пп. 56–75, при этом клетки–мишени экспрессируют рекомбинантный рецептор.

77. Способ по п. 76, где рекомбинантный рецептор представляет собой рекомбинантный T–клеточный рецептор или химерный антигенный рецептор (CAR).

78. Способ по любому из пп. 60–77, дополнительно включающий разрыв обратимой связи между первым партнером по связывания и одним или более первыми участками связывания и/или между вторым партнером по связыванию и одним или более вторыми участками связывания, причем указанный разрыв включает в себя введение в клетки–мишени вещества, способного конкурировать за связывание с одним или более первыми участками связывания и/или одним или более вторыми участками связывания.

79. Способ по п. 78, при этом вещество содержит биотин или аналог биотина.

80. Способ по п. 78 или 79, при этом вещество содержит D–биотин.

25

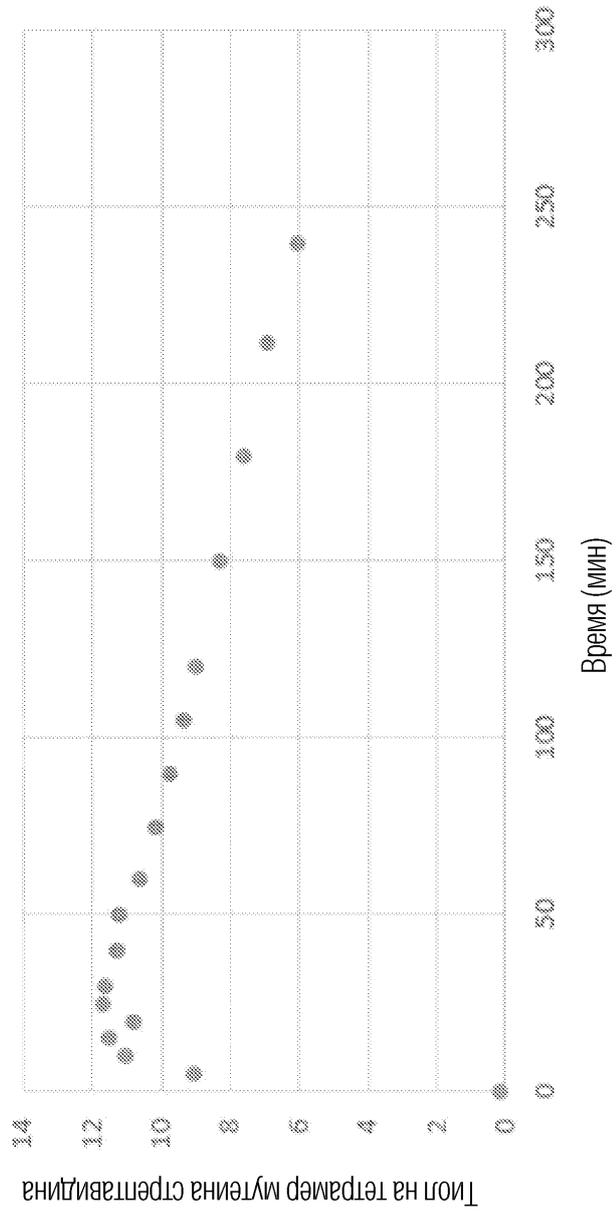
30

35

40

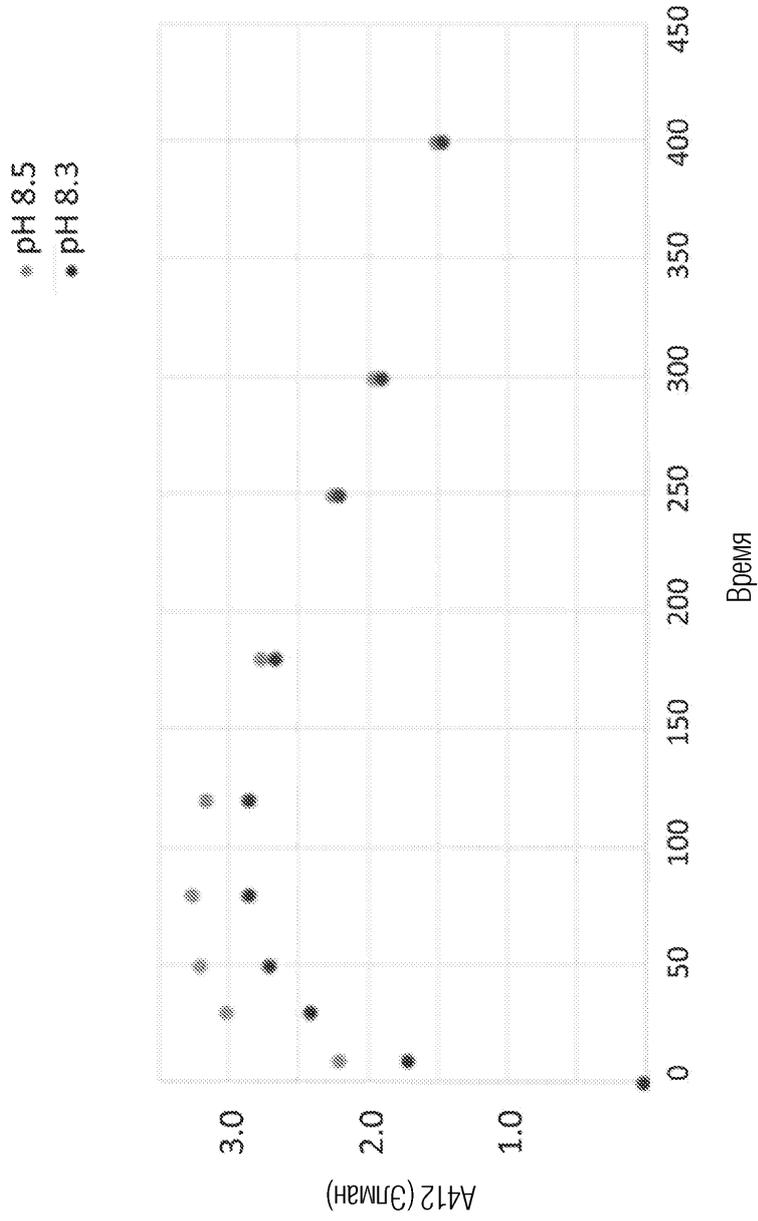
45

1/15



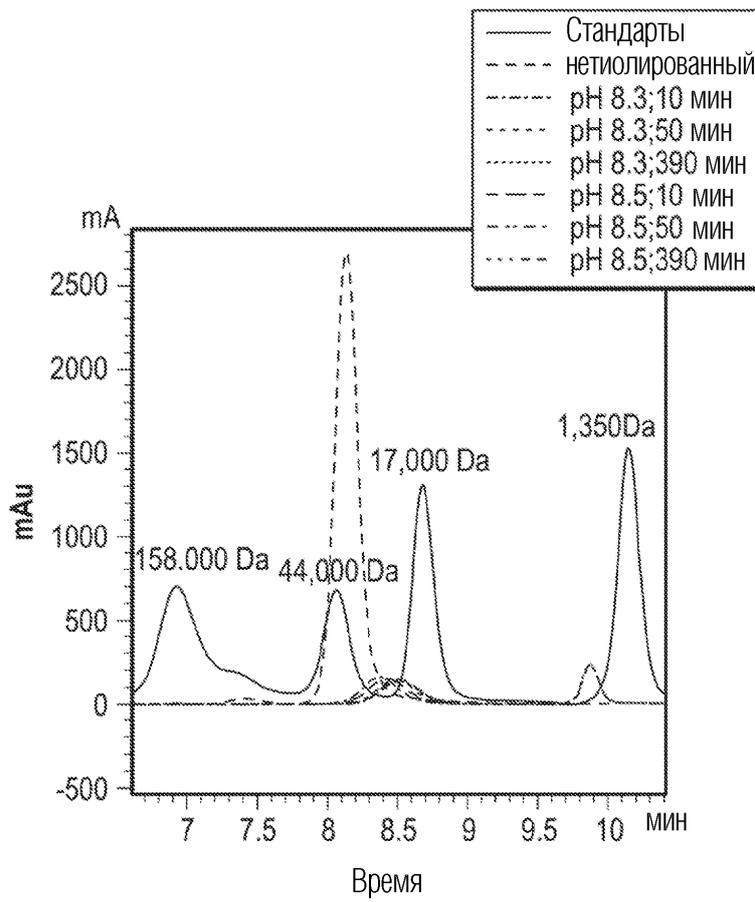
ФИГ. 1

2/15



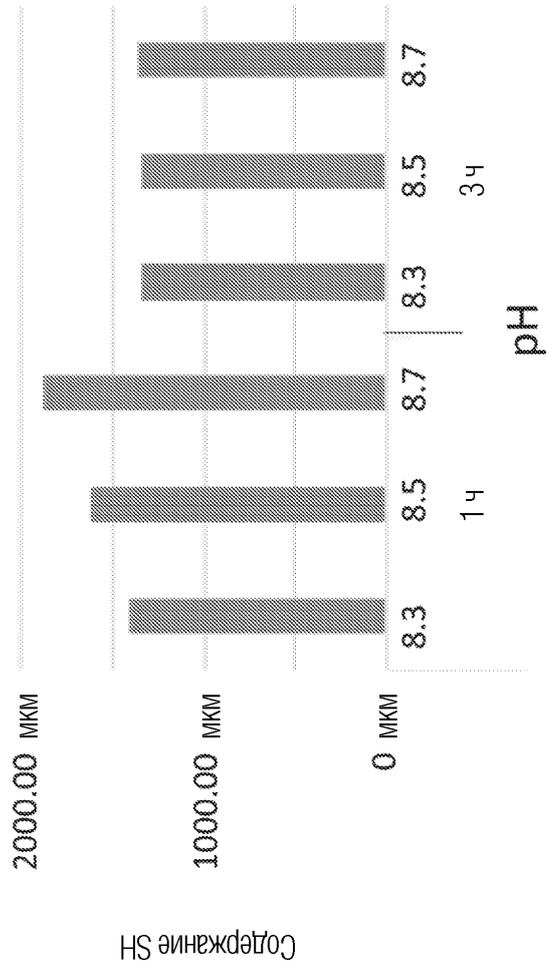
ФИГ. 2

3/15



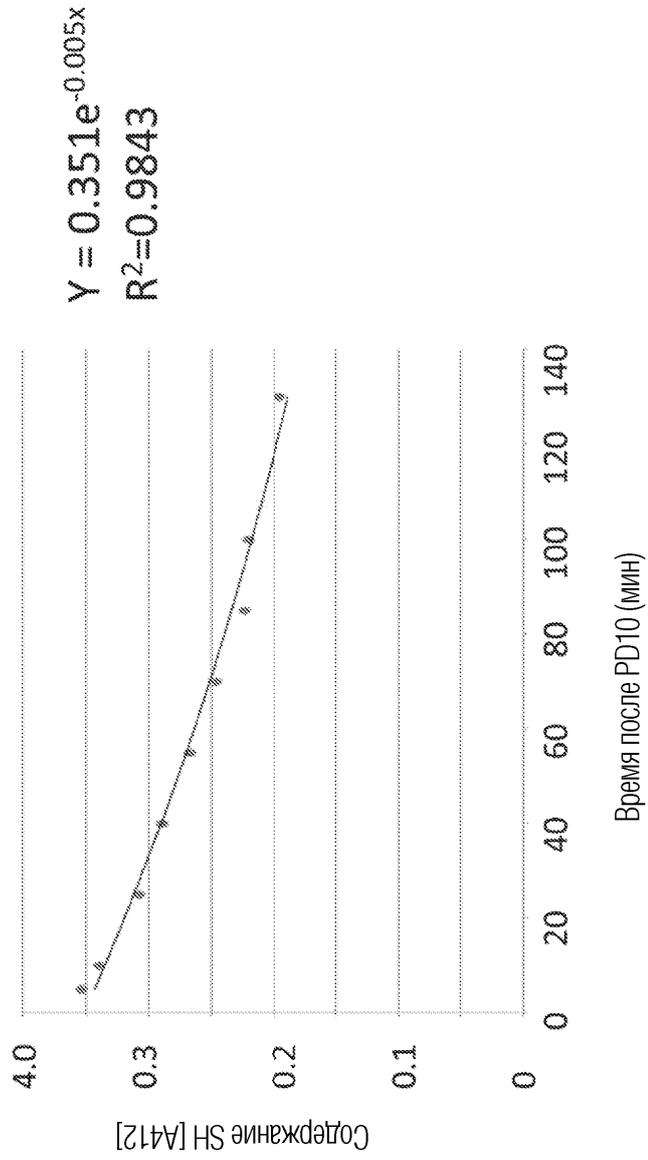
ФИГ. 3

4/15



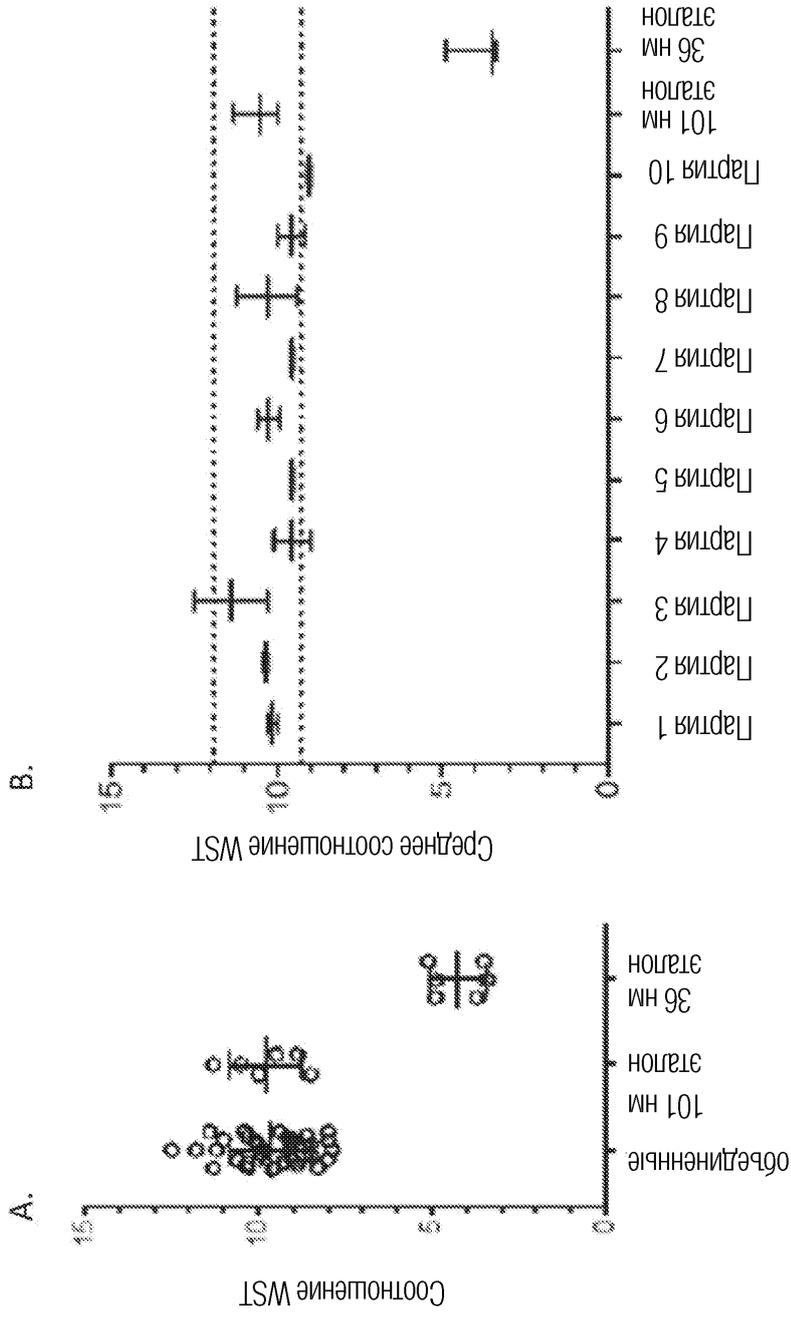
ФИГ. 4

5/15



ФИГ. 5

6/15

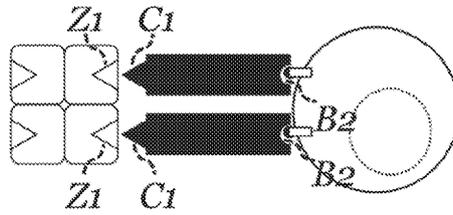


ФИГ. 6В

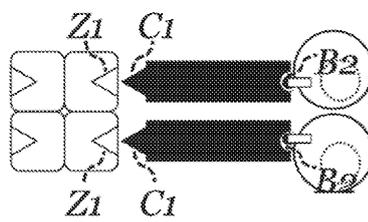
ФИГ. 6А

ФИГ. 7

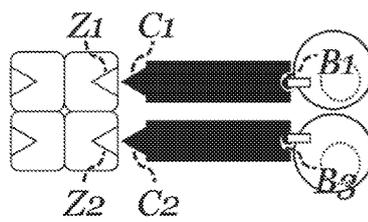
ФИГ. 7А



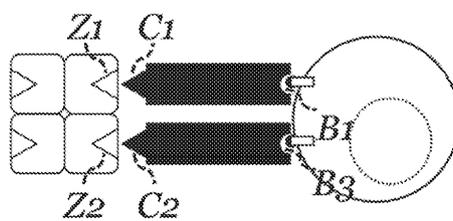
ФИГ. 7В



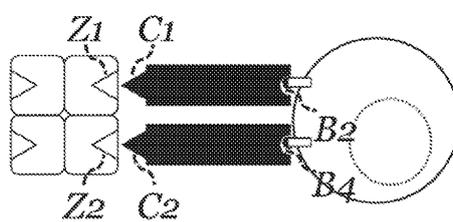
ФИГ. 7С



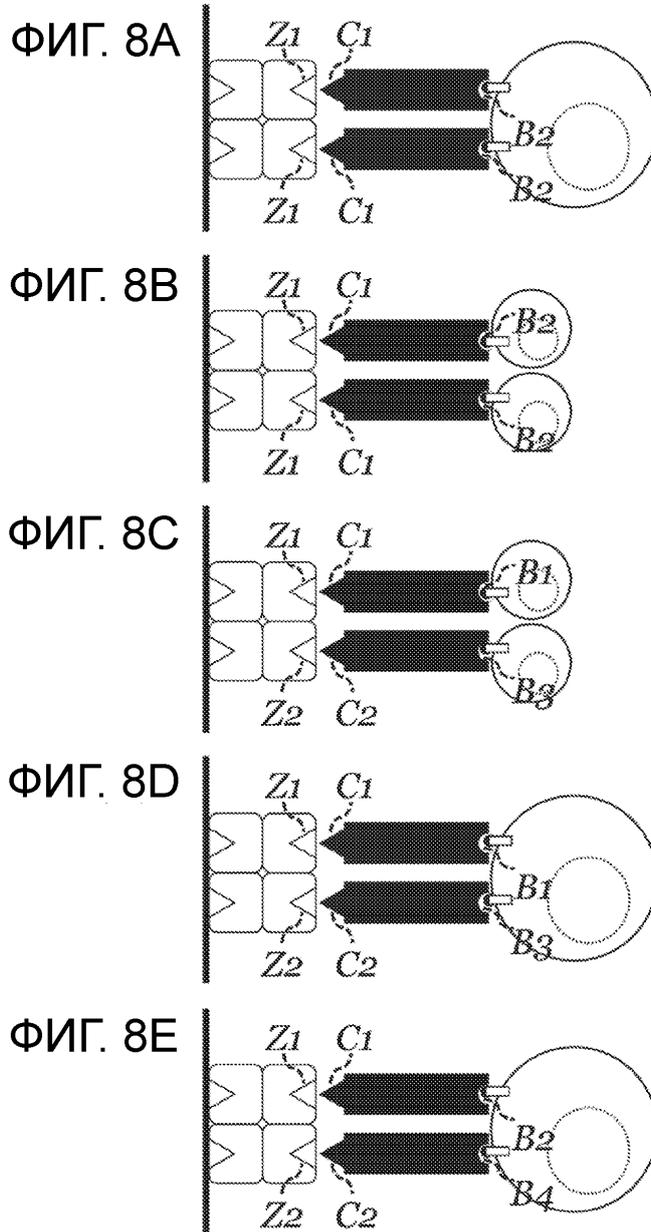
ФИГ. 7D



ФИГ. 7Е

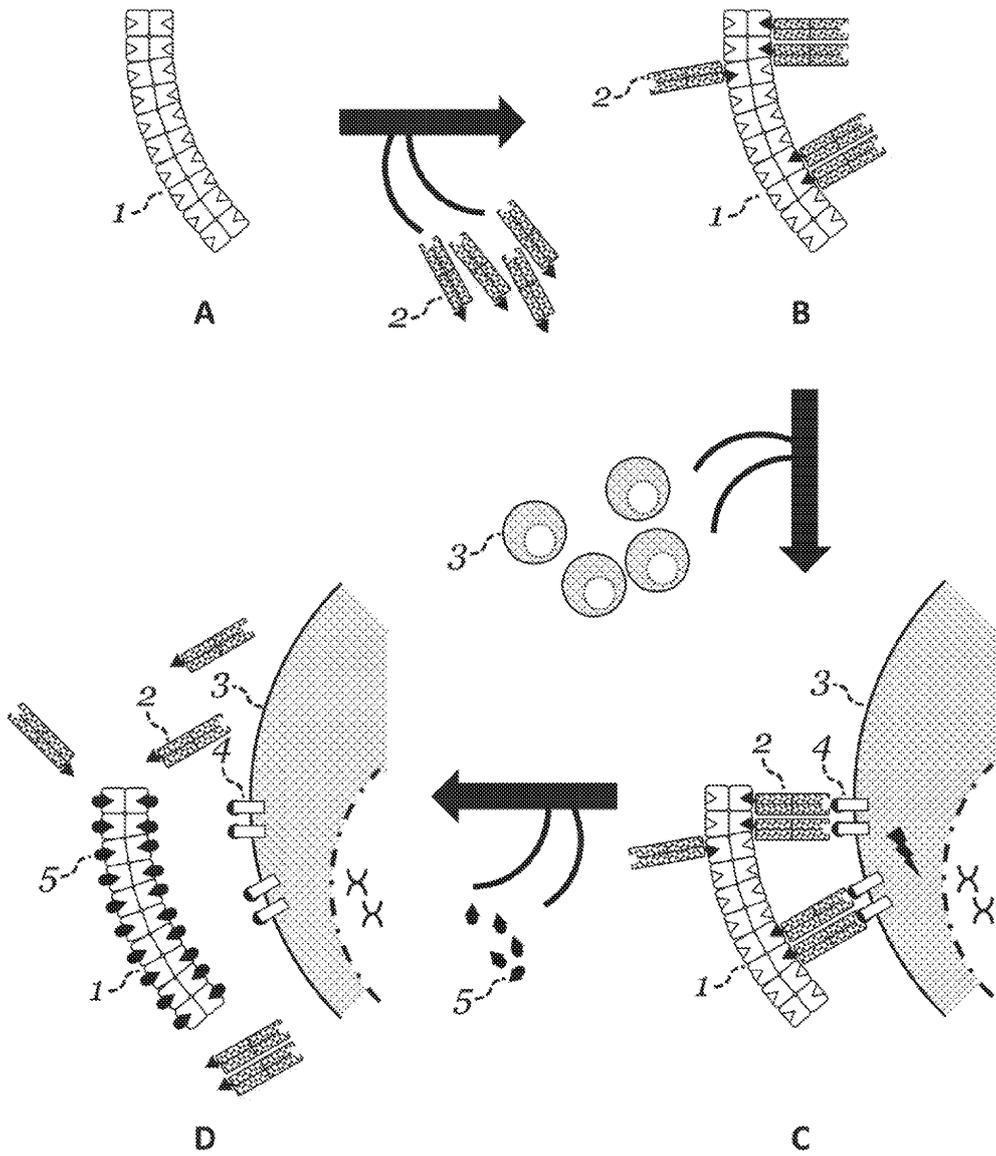


ФИГ. 8



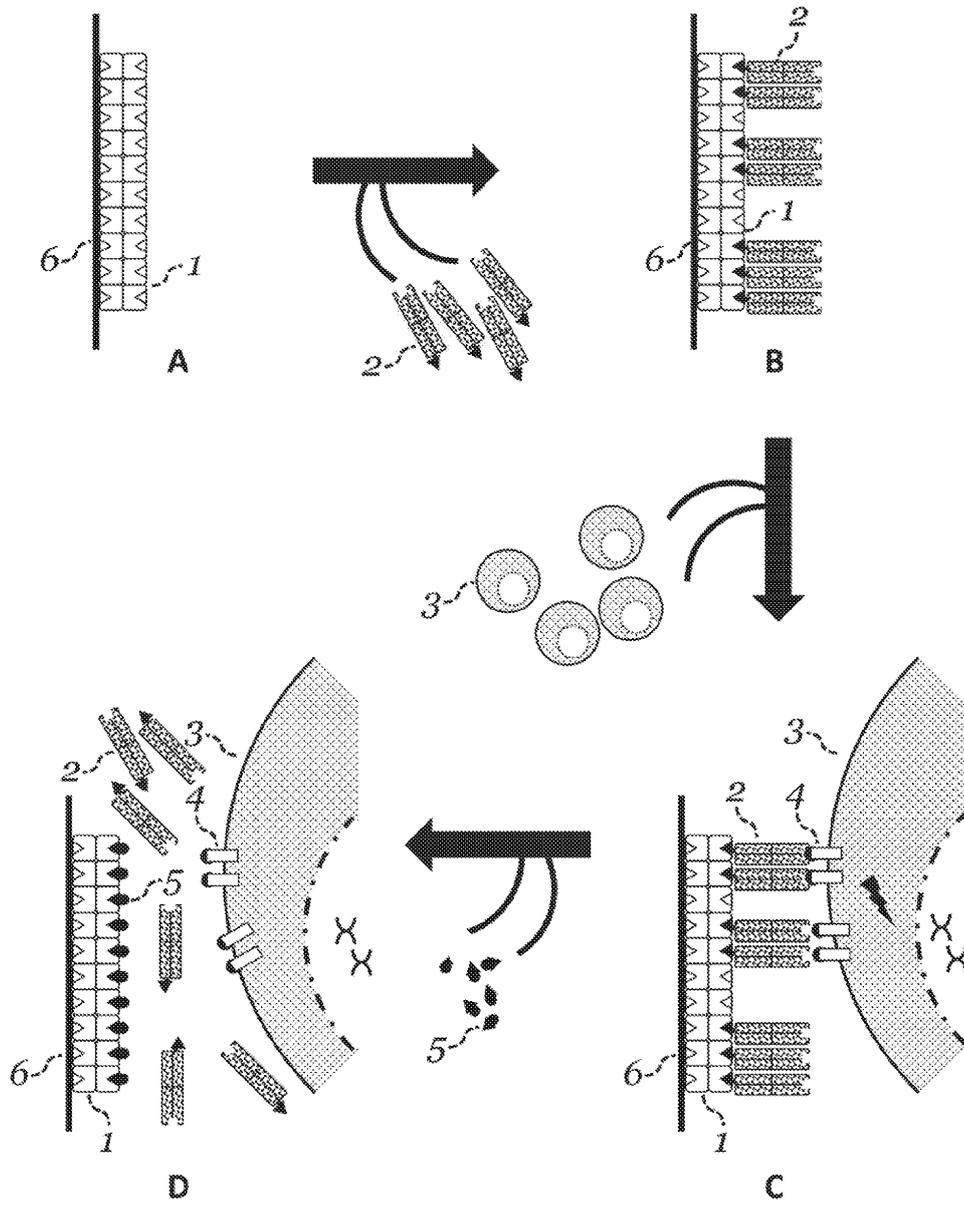
9/15

ФИГ. 9

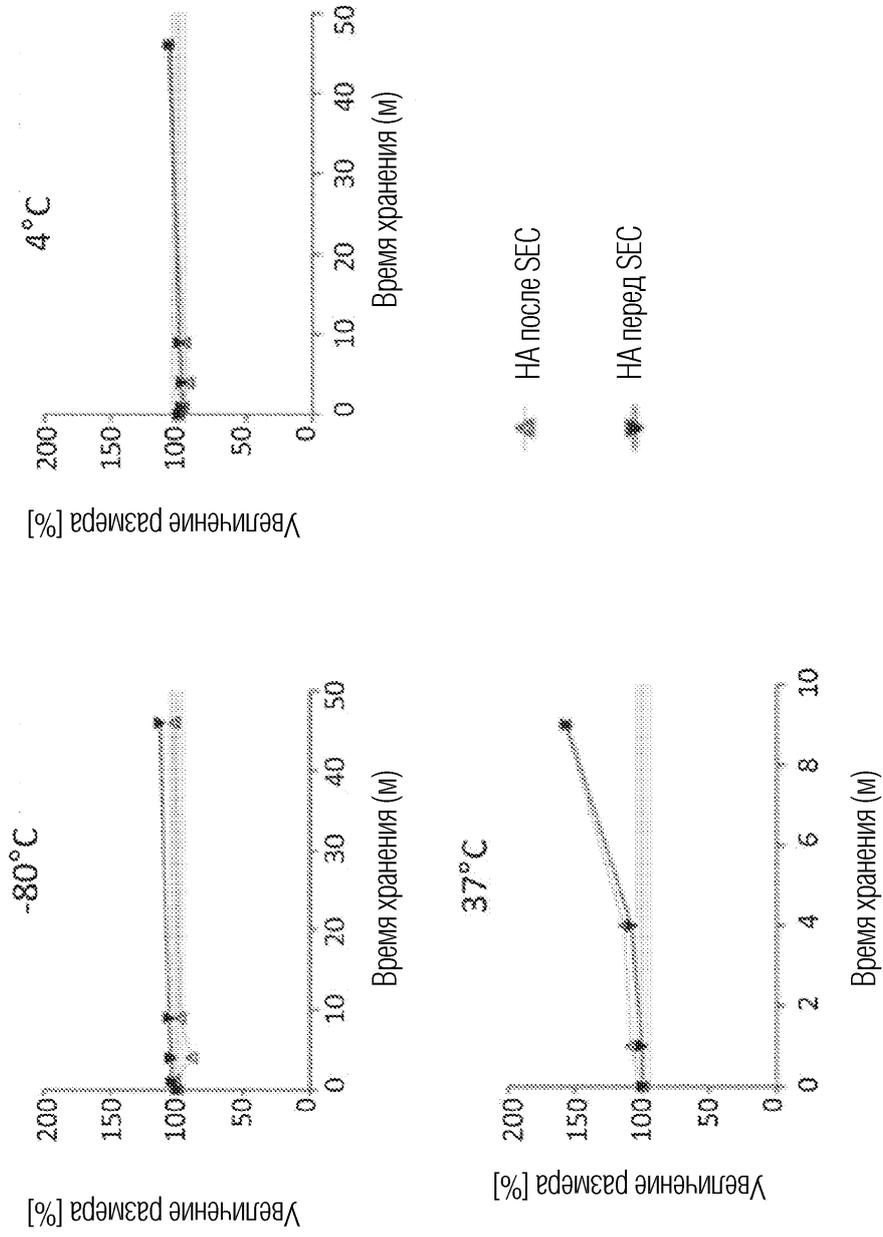


10/15

ФИГ. 10

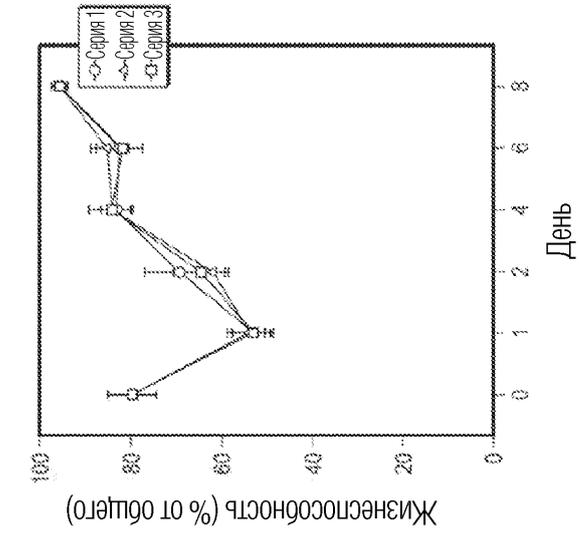


11/15

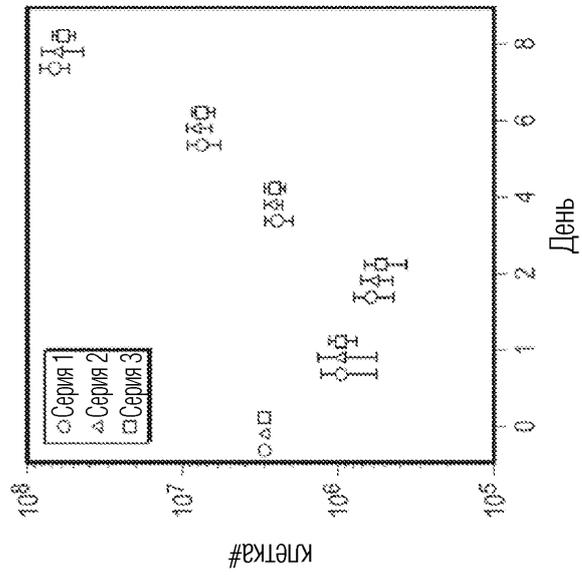


ФИГ. 11

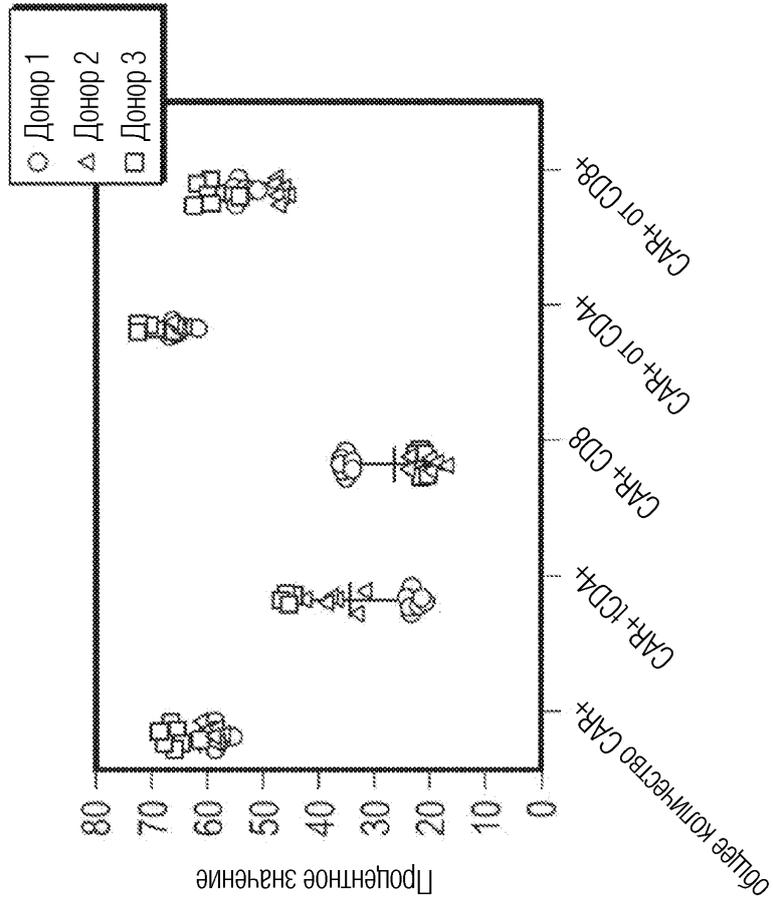
12/15



ФИГ. 12В

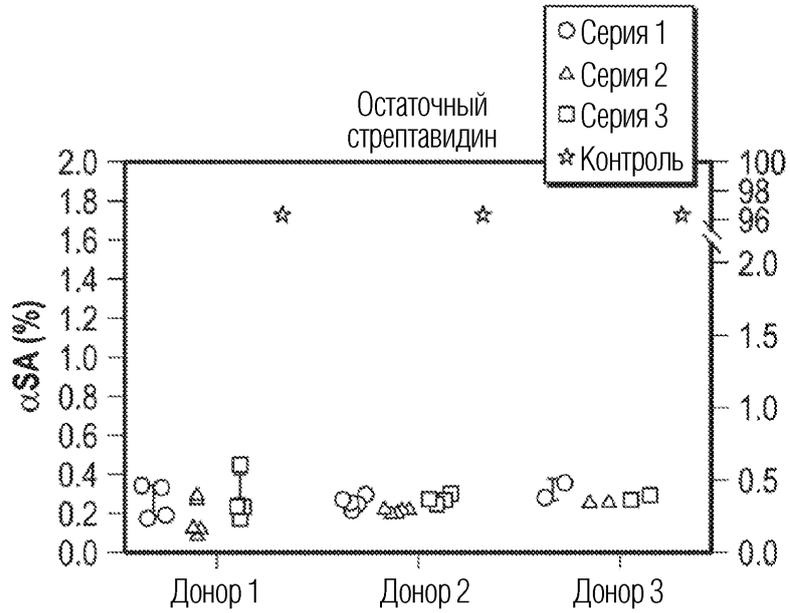
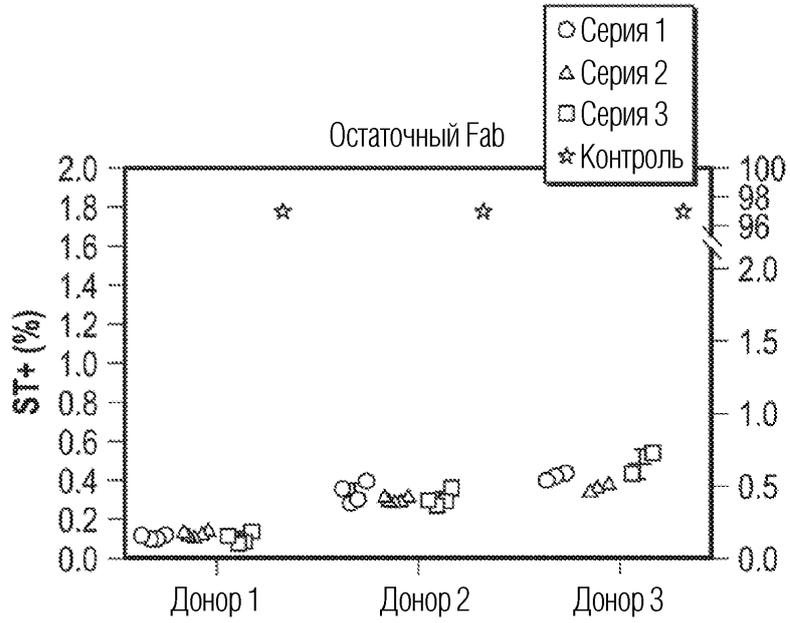


ФИГ. 12А

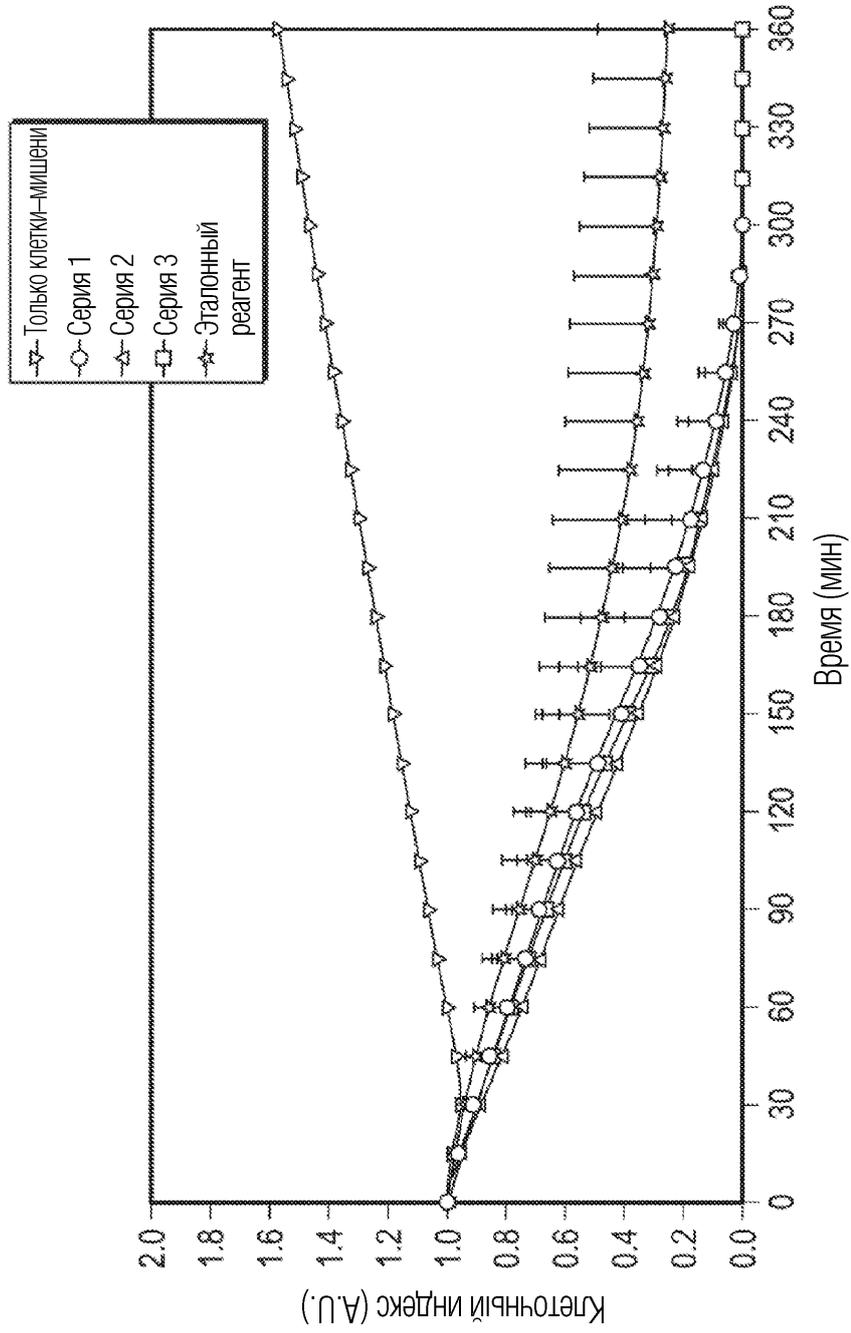


ФИГ. 13

14/15



ФИГ. 14



ФИГ. 15