



(51) МПК
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/28 (2023.02); *C07K 19/00* (2023.02); *C12N 15/63* (2023.02); *A61K 39/395* (2023.02); *A61P 35/00* (2023.02)

(21)(22) Заявка: **2019123366**, **23.01.2018**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.01.2018

Дата регистрации:
07.07.2023

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
23.01.2017 CN 201710058581.8;
30.09.2017 CN 201710920346.7

(43) Дата публикации заявки: **24.02.2021** Бюл. № 6(45) Опубликовано: **07.07.2023** Бюл. № 19(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: **23.08.2019**(86) Заявка РСТ:
CN 2018/073863 (23.01.2018)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2018/133877 (26.07.2018)

Адрес для переписки:
190000, Санкт-Петербург, ВОХ-сервис 1125

(72) Автор(ы):

ВАН, Пэн (CN),
ВАН, Хуамао (CN),
ЦЗЯН, Хуа (CN)

(73) Патентообладатель(и):

КРЕЙДЖ медикал Ко., Лимитед (НК)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: **RU 2447085 C2, 10.04.2012. CN**
103562225 A, 05.02.2014. WO 2014122143 A1,
14.08.2014.

(54) АНТИТЕЛО, НАЦЕЛЕННОЕ НА ВСМА, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к антителу, которое специфически связывается с ВСМА. Также раскрыты нуклеиновая кислота, кодирующая указанное антитело; вектор и клетка-хозяин, экспрессирующие указанное антитело; иммуноконъюгат и химерный рецептор антигена, содержащие указанное антитело; нуклеиновая кислота, кодирующая указанный химерный рецептор; вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту; вирус, содержащий указанный вектор; иммунная клетка, содержащая

указанные нуклеиновую кислоту, вектор или вирус. Раскрыты применение указанного антитела для получения лекарственного средства, конъюгата, многофункционального антитела, агента для диагностики опухоли, иммунной клетки; применение указанного иммуноконъюгата для получения лекарственного средства, агента для диагностики опухоли, иммунной клетки; применение указанной иммунной клетки для получения лекарственного средства. Изобретение позволяет эффективно лечить заболевания, ассоциированные с

RU 2799655 C2

RU 2799655 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 16/28 (2023.02); *C07K 19/00* (2023.02); *C12N 15/63* (2023.02); *A61K 39/395* (2023.02); *A61P 35/00* (2023.02)

(21)(22) Application: **2019123366, 23.01.2018**(24) Effective date for property rights:
23.01.2018Registration date:
07.07.2023

Priority:

(30) Convention priority:
23.01.2017 CN 201710058581.8;
30.09.2017 CN 201710920346.7(43) Application published: **24.02.2021** Bull. № 6(45) Date of publication: **07.07.2023** Bull. № 19(85) Commencement of national phase: **23.08.2019**(86) PCT application:
CN 2018/073863 (23.01.2018)(87) PCT publication:
WO 2018/133877 (26.07.2018)Mail address:
190000, Sankt-Peterburg, VOKH-servis 1125

(72) Inventor(s):

VAN, Pen (CN),
VAN, Khuamao (CN),
TSZYAN, Khua (CN)

(73) Proprietor(s):

KREJDZH medikal Ko., Limited (HK)(54) **BCMA-TARGETED ANTIBODY AND ITS USE**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to an antibody that binds to BCMA. Also a nucleic acid encoding the said antibody; a vector and a host cell expressing the said antibody; immunoconjugate and chimeric antigen receptor containing the specified antibody; a nucleic acid encoding the said chimeric receptor; a vector containing the said nucleic acid; a virus containing the said vector; an immune cell containing the said nucleic acid, and either vector or virus are disclosed. The use

of the said antibody for the production of a medicinal product, a conjugate, a multifunctional antibody, a tumor diagnostic agent, an immune cell; the use of the specified immunoconjugate for the production of a medicinal product, an agent for the diagnosis of a tumor, an immune cell; using the said immune cell to produce a medicinal product are disclosed.

EFFECT: invention makes it possible to effectively treat diseases associated with BCMA expression.

43 cl, 16 dwg, 4 tbl

Область техники

Настоящее изобретение относится к области иммунотерапии или диагностики опухолей, и, в частности, настоящее изобретение относится к антителу, нацеленному на ВСМА, и вариантам его применения.

5 Уровень техники

Множественная миелома (ММ) - распространенное гематологическое злокачественное заболевание, на долю которого приходится 2% всех смертельных исходов от рака. ММ - это гетерогенное заболевание, в основном обусловленное хромосомной транслокацией t(11; 14), t(4; 14), t(8; 14), del(13), del(17) (в числе прочего)
 10 (Drach et al., (1998) Blood 92(3): 802-809; Gertz et al., (2005) Blood 106 (8): 2837-2840; Facon et al., (2001) Blood 97 (6): 1566-1571). Основное состояние при множественной миеломе (ММ) - неконтролируемое размножение и увеличение количества плазматических клеток в костном мозге, что приводит к остеонекрозу. Пациенты с ММ могут испытывать различные симптомы заболевания, обусловленные инфильтрацией костного
 15 мозга, разрушением кости, почечной недостаточностью, иммунодефицитом и психологической нагрузкой из-за диагностированного рака. В настоящее время основными способами лечения данного заболевания являются химиотерапия и трансплантация стволовых клеток. Основными применяемыми химиотерапевтическими лекарственными средствами являются стероиды, талидомид, леналидомид, бортезомиб
 20 или комбинация различных цитотоксических агентов. У молодых пациентов можно использовать химиотерапию в высоких дозах в комбинации с трансплантацией аутологичных стволовых клеток.

ВСМА (антиген созревания В-клеток) представляет собой антиген созревания В-клеток, трансмембранный белок III типа, состоящий из 185 аминокислотных остатков,
 25 и принадлежит к надсемейству рецепторов ФНО. Лиганд ВСМА принадлежит к надсемейству ФНО, например, лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), фактор стимуляции В-лимфоцитов (BAFF). После связывания со своим лигандом ВСМА активизирует пролиферацию и выживание В-клеток. ВСМА специфически и в высокой степени экспрессируется на поверхности плазматических клеток и клеток множественной
 30 миеломы, но не экспрессируется на кроветворных стволовых клетках и других клетках здоровых тканей, поэтому ВСМА может являться идеальной мишенью для направленной терапии ММ.

В заключение можно сказать, что в данной области техники существует срочная
 35 потребность в получении антител, специфичных по отношению к ВСМА, и эффекторных иммунных клеток, нацеленных на ВСМА.

Сущность изобретения

Целью настоящего изобретения является обеспечение антител, специфичных по отношению к ВСМА и эффекторных иммунных клеток, нацеленных на ВСМА.

В первом аспекте настоящего изобретения предложено антитело, нацеленное на
 40 ВСМА, причем указанное антитело выбрано из группы, состоящей из:

(1) антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 1, 60 или 62, и/или содержащую HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 2, 61 или 63, и/или HCDR3, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5;

45 (2) антитела, содержащего вариабельную область легкой цепи, содержащую LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 6, и/или содержащую LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7, и/или содержащую LCDR3, представленную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10;

(3) антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи антитела согласно подпункту (1) и переменную область легкой цепи антитела согласно подпункту (2);

(4) антитела, являющегося вариантом антитела согласно любому из подпунктов (1) - (3) и обладающего такой же или аналогичной активностью, как и антитело согласно любому из подпунктов (1) - (3).

В конкретном варианте реализации антитело выбрано из группы, состоящей из:

(1) антитела, содержащего HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 2, HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 3, и LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 6, LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 8;

(2) антитела, содержащего HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 2, HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 4, LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 6, LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 9;

(3) антитела, содержащего HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 2, HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 5, LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 6, LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 10;

(4) антитела, содержащего HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 60, HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 61, HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 5, LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 6, LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 10;

(5) антитела, содержащего HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 62, HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 63, HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 5, LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 6, LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 10;

(6) антитела, являющегося вариантом антитела согласно любому из подпунктов (1) - (5) и обладающего такой же или аналогичной активностью, как и антитело согласно любому из подпунктов (1) - (5).

В конкретном варианте реализации антитело выбрано из группы, состоящей из:

(1) антитела, где переменная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

(2) антитела, где переменная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

(3) антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи антитела согласно подпункту (1) и переменную область легкой цепи антитела согласно подпункту (2);

(4) антитела, являющегося вариантом антитела согласно любому из подпунктов (1) - (3) и обладающего такой же или аналогичной активностью, как и антитело согласно любому из подпунктов (1) - (3).

В конкретном варианте реализации антитело выбрано из группы, состоящей из:

(1) антитела, где переменная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, а переменная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

11;

(2) антитела, где переменная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, а переменная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

5 15;

(3) антитела, где переменная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, а переменная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

10 19;

(4) антитела, где переменная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, а переменная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

15 19;

(5) антитела, где переменная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, а переменная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

20 19;

(6) антитела, являющегося вариантом антитела согласно любому из подпунктов (1) - (5) и обладающего такой же или аналогичной активностью, как и антитело согласно любому из подпунктов (1) - (5).

25

Во втором аспекте настоящего изобретения предложено антитело, распознающее ту же антигенную детерминанту, что и антитело согласно первому аспекту настоящего изобретения.

В третьем аспекте настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая антитело согласно первому или второму аспекту настоящего изобретения.

30

В четвертом аспекте настоящего изобретения предложен экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту согласно третьему аспекту настоящего изобретения.

В пятом аспекте настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая экспрессирующий вектор согласно четвертому аспекту настоящего изобретения или нуклеиновую кислоту согласно третьему аспекту настоящего изобретения, встроенную в геном.

35

В шестом аспекте настоящего изобретения предложено применение антитела согласно первому или второму аспекту настоящего изобретения для получения направленного лекарственного средства, конъюгата «антитело-лекарственное средство» или многофункционального антитела, специфично нацеленное на опухолевые клетки, экспрессирующие ВСМА; или

40

для получения агента для диагностики опухоли, экспрессирующей ВСМА; или для получения иммунной клетки, модифицированной химерным рецептором антигена, причем, предпочтительно, указанная иммунная клетка включает Т-лимфоцит, НК-клетку или НКТ-лимфоцит.

45

В седьмом аспекте настоящего изобретения предложен иммуноконъюгат, содержащий:

антитело согласно первому или второму аспекту настоящего изобретения; и функциональную молекулу, связанную с ним; причем указанную функциональную молекулу выбирают из группы, состоящей из молекулы, нацеленной на поверхностный маркер опухоли, молекулы, ингибирующей опухоли, молекулы, нацеленной на поверхностный маркер иммунной клетки, и детектируемой метки.

50

В конкретном варианте реализации молекула, ингибирующая опухоли, представляет

собой противоопухолевый цитокин или противоопухолевый токсин. Цитокин предпочтительно включает: ИЛ-12, ИЛ-15, интерферон I типа, ФНО-альфа.

В конкретном варианте реализации молекула, нацеленная на поверхностный маркер иммунной клетки, представляет собой антитело или лиганд, связывающиеся с
5 поверхностным маркером иммунной клетки и, предпочтительно, поверхностный маркер иммунной клетки включает: CD3, CD16, CD28, и, более предпочтительно, антитело, связывающее поверхностный маркер иммунной клетки, представляет собой антитело против CD3.

В конкретном варианте реализации молекула, нацеленная на поверхностный маркер
10 иммунной клетки, представляет собой антитело, связывающееся с поверхностным маркером Т-клетки.

В восьмом аспекте настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая многофункциональный иммуноконъюгат согласно седьмому аспекту настоящего изобретения.

В девятом аспекте настоящего изобретения предложено применение
15 многофункционального иммуноконъюгата согласно седьмому аспекту настоящего изобретения для получения противоопухолевого лекарственного средства или для получения агента для диагностики опухоли, экспрессирующей ВСМА; или для получения иммунной клетки, модифицированной химерным рецептором антигена,
20 причем указанная иммунная клетка предпочтительно включает: Т-лимфоциты, НК-клетки или НКТ-лимфоциты.

В десятом аспекте настоящего изобретения предложен химерный рецептор антигена, содержащий внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный
25 сигнальный домен, причем внеклеточный домен содержит антитело согласно первому или второму аспекту настоящего изобретения, и указанное антитело предпочтительно представляет собой одноцепочечное антитело или доменное антитело.

В конкретном варианте реализации внутриклеточный домен содержит один или более из костимулирующих сигнальных доменов и/или первичных сигнальных доменов.

В конкретном варианте реализации химерный рецептор антигена дополнительно
30 содержит шарнирный домен.

В конкретном варианте реализации трансмембранный домен выбран из группы, состоящей из альфа-, бета-, дзета-цепи TCR, трансмембранных областей CD3ε, CD3ζ,
CD4, CD5, CD8α, CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86,
CD134, CD137, CD152, CD154 и PD1; и/или

35 костимулирующий сигнальный домен выбран из группы, состоящей из внутриклеточных сигнальных областей CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54, CD83, OX40, CD137, CD134, CD150, CD152, CD223, CD270, PD-L2, PD-L1, CD278, DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, FcεRIγ, MyD88 и 41BBL; и/или

первичный сигнальный домен выбран из группы, состоящей из TCR ξ, FcR γ, FcR β,
40 CD3 γ, CD3δ, CD3ε, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также называемого «ICOS»), CD66d и CD3ζ,

предпочтительно,

трансмембранный домен выбран из группы, состоящей из трансмембранных доменов CD8α, CD4, CD45, PD1, CD154 и CD28; и/или

45 костимулирующий сигнальный домен выбран из группы, состоящей из CD137, CD134, CD28 и OX40; и/или

первичный сигнальный домен выбран из CD3Cζ,

наиболее предпочтительно, трансмембранный домен выбран из CD8α или CD28,

костимулирующий сигнальный домен выбран из внутриклеточного сигнального домена CD137 или CD28, а первичный сигнальный домен выбран из CD3 ζ .

В конкретном варианте реализации химерный рецептор антигена содержит следующие последовательно связанные антитело, трансмембранную область и внутриклеточную

5 сигнальную область:

антитело согласно первому или второму аспекту настоящего изобретения, трансмембранную область CD8 и CD3 ζ ;

антитело согласно первому или второму аспекту настоящего изобретения, трансмембранную область CD8, внутриклеточную сигнальную область CD137 и CD3 ζ ;

10 антитело согласно первому или второму аспекту настоящего изобретения, трансмембранную область CD28, внутриклеточную сигнальную область CD28 и CD3 ζ ;

или

антитело согласно первому или второму аспекту настоящего изобретения, трансмембранную область CD28, внутриклеточную сигнальную область CD28, CD137

15 и CD3 ζ .

В одиннадцатом аспекте настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота, кодирующая химерный рецептор антигена согласно десятому аспекту настоящего изобретения.

В двенадцатом аспекте настоящего изобретения предложен экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту согласно одиннадцатому аспекту настоящего изобретения.

В тринадцатом аспекте настоящего изобретения предложен вирус, содержащий вектор согласно двенадцатому аспекту настоящего изобретения.

В предпочтительном варианте реализации указанный вирус является лентивирусом.

25 В четырнадцатом аспекте настоящего изобретения предложено применение химерного рецептора антигена согласно десятому аспекту настоящего изобретения или нуклеиновой кислоты согласно одиннадцатому аспекту настоящего изобретения или экспрессирующего вектора согласно двенадцатому аспекту настоящего изобретения или вируса согласно тринадцатому аспекту настоящего изобретения для получения

30 генетически модифицированных иммунных клеток, нацеленных на опухолевую клетка, экспрессирующая ВСМА.

В предпочтительном варианте реализации опухоль, экспрессирующая ВСМА, представляет собой множественную миелому.

В пятнадцатом аспекте настоящего изобретения предложена генетически модифицированная иммунная клетка, трансдуцированная нуклеиновой кислотой согласно одиннадцатому аспекту настоящего изобретения или экспрессирующим вектором согласно двенадцатому аспекту настоящего изобретения или вирусом согласно тринадцатому аспекту настоящего изобретения, или экспрессирующая химерный рецептор антигена согласно десятому аспекту настоящего изобретения.

40 Иммунные клетки предпочтительно выбраны из Т-лимфоцитов, НК-клеток или НКТ-клеток.

В конкретном варианте реализации генетически модифицированная иммунная клетка дополнительно экспрессирует последовательность, не являющуюся химерным рецептором антигена согласно десятому аспекту настоящего изобретения, и указанная

45 другая последовательность содержит цитокин или еще один химерный рецептор антигена или рецептор хемокина или миРНК, снижающую экспрессию PD-1, или белок, блокирующий PD-L1, или TCR, или «предохранительный переключатель» (safety switch);

Цитокин предпочтительно включает ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-21 или интерферон I типа;

Рецептор хемокина предпочтительно включает CCR2, CCR5, CXCR2 или CXCR4; «Предохранительный переключатель» (safety switch) предпочтительно включает индуцибельную каспазу-9, укороченный EGFR или RQR8.

5 В шестнадцатом аспекте настоящего изобретения предложено применение генетически модифицированной иммунной клетки согласно пятнадцатому аспекту настоящего изобретения для получения лекарственного средства, подавляющего опухоль, причем указанная опухоль представляет собой опухоль, экспрессирующую ВСМА.

В предпочтительном варианте реализации опухоль, экспрессирующая ВСМА, представляет собой множественную миелому.

10 В семнадцатом аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая:

антитело согласно первому или второму аспекту настоящего изобретения или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанное антитело; или

15 иммуноконъюгат согласно седьмому аспекту настоящего изобретения или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный иммуноконъюгат; или

химерный рецептор антигена согласно десятому аспекту настоящего изобретения или нуклеиновую кислоту, кодирующую указанный химерный рецептор антигена; или генетически модифицированную иммунную клетку согласно пятнадцатому аспекту настоящего изобретения.

20 Следует понимать, что различные вышеупомянутые технические признаки настоящего изобретения и различные технические признаки, конкретно описанные ниже (как в разделе «Примеры»), можно объединить друг с другом в рамках объема настоящего изобретения, получая новое или предпочтительное техническое решение, которое не будет последовательно воспроизведено в настоящем документе.

25 Описание чертежей

На фиг. 1 показаны ДСН-электрофореграммы ВСМА_huFc и ВСМА_muFc (восстановительные условия).

На фигуре 2 показана экспрессия ВСМА в стабильной линии клеток K562-BCMA, обнаруженная посредством FACs.

30 На фигуре 3 показаны результаты твердофазного ИФА антител 7A12, 7G2 и 23F10.

На фигуре 4 показано связывание антител 7A12, 7G2 и 23F10 с K562-BCMA и K562, обнаруженное посредством FACs.

На фигуре 5 показан анализ очищенного scFv_Fc-антитела против ВСМА посредством электрофореза в ДСН-ПААГ (восстановительные условия).

35 На фигуре 6 показано связывание разбавленного в градиенте очищенного scFv_Fc с K562-BCMA, определяемое посредством FACs-анализа.

На фигуре 7 показано сродство антител 7A12, 7G2 и 23F10 к ВСМА, определяемое с помощью Biacore.

40 На фигуре 8 показано связывание антител 7A12, 7G2 и 23F10 с клетками линии RPMI8226, определяемое посредством FACs.

На фигуре 9 показано конкурентное связывание антител и APRIL с ВСМА, определяемое посредством твердофазного ИФА.

На фигуре 10 показан положительный показатель Т-лимфоцитов, инфицированных ВСМА-CAR Т-вирусом, обнаруженный посредством FACS.

45 На фигуре 11А показаны результаты анализа токсичности *in vitro* ВСМА-CAR Т по отношению к ВСМА-экспрессирующим положительным и отрицательным клеткам, а на фигуре 11В показаны результаты экспериментов *in vivo* с ВСМА-CAR Т у мышей.

На фигуре 12 показаны аминокислотные последовательности тяжелых цепей клонов

25C2, 25D2 и 23F10.

На фиг. 13А показана агрегация антитела 25C2, на фигуре 13В показана агрегация антитела 25D2, а на фигуре 13С показана агрегация антител 23F10 и 7А12.

На фигуре 14А показано связывание 25C2 и 25D2 с клетками K562-BCMA и K562, а на фигуре 14В показана специфичность антител 23F10, 25C2 и 25D2, определяемая посредством твердофазного ИФА.

На фигуре 15 показаны результаты экспериментов по уничтожению клеток 25C2-BBZ, 25D2-BBZ, 7A12-BBZ, C11D5.3-BBZ и sPD-1-7A12-BBZ.

На фигуре 16 показаны результаты подкожной ксенотрансплантации 25C2-BBZ, 25D2-BBZ, C11D5.3-BBZ, 7A12-BBZ.

Способы выполнения изобретения

В результате обширных и интенсивных исследований авторы изобретения неожиданно обнаружили антитела, специфически связывающиеся с BCMA, которые можно применять для получения различных таргетных противоопухолевых лекарственных средств и лекарственных средств для диагностики опухолей. Настоящее изобретение выполнено на основе вышеуказанных результатов.

Технические термины, используемые в настоящем документе, имеют общепринятые для специалистов или аналогичные значения. Некоторые термины определены ниже для понимания настоящего изобретения.

Термин «BCMA» в настоящем документе относится к антигену созревания В-клеток, представляющему собой трансмембранный белок III типа, состоящий из 184 аминокислотных остатков (эталонная последовательность в NCBI: NP_001183.2), причем указанная аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID No: 37. В конкретном варианте реализации BCMA относится к BCMA человека.

Термин «APRIL» в настоящем документе относится к лиганду А, индуцирующему пролиферацию, представляющему собой лиганд, индуцирующий пролиферацию, состоящий из 184 аминокислотных остатков (эталонная последовательность в NCBI: NP_003799.1), и принадлежащему к надсемейству ФНО.

Термин «антитело» в настоящем документе относится к антиген-связывающему иммунному белку. Термин «антитело» в настоящем документе включает интактное полноразмерное антитело, содержащее антиген-связывающую область, и любые фрагменты такого антитела, сохраняющие «антиген-связывающий фрагмент» или «антиген-связывающую область», или его одиночную цепь, например, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). Нативное антитело относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи или их антиген-связывающие фрагменты, связанные друг с другом дисульфидными связями. Термин «антитело» также включает все рекомбинантные формы антител, в частности, антитела, описанные в настоящем документе, например, антитела, экспрессируемые в прокариотических клетках, негликозилированные антитела и фрагменты антител, связывающиеся с антигенами и их производными, указанные здесь и далее. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем документе как VH) и константной области тяжелой цепи. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем документе как VL) и константной области легкой цепи. Области VH и VL можно далее разделить на гиперпеременные области, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, выстроенных от N-конца к С-концу в следующем порядке: FR1,

CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающие домены, взаимодействующие с антигеном. Константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами, включая различные иммунные клетки (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Фрагменты антител включают (i) Fab-фрагменты, состоящие из VL-, VH-, CL- и CH1-доменов, в том числе Fab'- и Fab'-SH-фрагменты, (ii) Fd-фрагменты, состоящие из VH- и CH1-доменов, (iii) Fv-фрагмент, состоящий из VL- и VH-доменов одиночного антитела; (iv) dAb-фрагмент, состоящий из одиночной вариабельной области (Ward et al., 1989, Nature 341: 544-546); (v) P(ab')₂-фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два связанных Fab-фрагмента; (vi) антиген-связывающий сайт одноцепочечной молекулы Fv (Bird et al, 1988, Science 242: 423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883); (vii) биспецифический димер одноцепочечного Fv (PCT/US92/09965); (viii) «диатело» или «триатело», поливалентные или полиспецифические фрагменты, сконструированные путем объединения генов (Tomlinson et al, 2000, Methods Enzymol. 326: 461-479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448); и (ix) scFv, генетически объединенный с идентичными или отличающимися антителами (Coloma & Morrison, 1997, Nature Biotechnology 15, 159-163), но не ограничиваются указанными.

Термин «Fc» или «Fc-область» в настоящем документе включает полипептид, содержащий константную область антитела, не являющуюся первым иммуноглобулиновым доменом константной области. Таким образом, Fc относится к двум последним иммуноглобулиновым доменам константной области IgA, IgD и IgG и трем последним иммуноглобулиновым доменам константной области IgE и IgM, а также гибким шарнирам на N-конце этих доменов. Для IgA и IgM Fc может содержать J-цепь. Для IgG Fc содержит шарниры между иммуноглобулиновыми доменами C γ 2 и C γ 3, а также C γ 1 и C γ 2. Границы Fc-области могут варьировать, однако Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно определяют как область, содержащую остатки C226 и P230 на C-конце, причем нумерация остатков основана на ЕС-индексе по Kabat. Для IgG1 человека в настоящем документе Fc определяют как область, содержащую остаток P232 на C-конце, причем нумерация остатков основана на ЕС-индексе по Kabat. Fc может относиться к выделенной области или области в окружении Fc-полипептида, например, антитела. «Шарнир», как указано выше, содержит гибкий полипептид, содержащий аминокислоты между первым и вторым константными доменами антитела. Структурно CH1-домен IgG заканчивается в положении EU220, а CH2-домен IgG начинается с остатка EU237. Таким образом, для IgG1 в настоящем документе шарнир антитела определяют как область, содержащую остатки с 221 (D221 IgG1) до 231 (A231 IgG1), причем нумерация основана на ЕС-индексе по Kabat.

Термин «исходное антитело» или «исходный иммуноглобулин» в настоящем документе включает немодифицированное антитело, подлежащее модификации с получением вариантов. Исходное антитело может представлять собой природное антитело или вариант или модифицированную версию природного антитела. Термин «исходное антитело» может относиться к самому антителу, композиции, содержащей исходное антитело, или нуклеотидной последовательности, кодирующей антитело.

Термин «исходное антитело» или «исходный иммуноглобулин» в настоящем документе включает антитело мыши или химерное антитело, подлежащее модификации с получением гуманизированного антитела.

Термин «вариантное антитело» или «вариант антитела» в настоящем документе

включает последовательность антитела, отличающуюся от последовательности исходного антитела по меньшей мере на одну аминокислотную модификацию по сравнению с исходным антителом. Последовательность вариантного антитела в настоящем документе обладает по меньшей мере приблизительно 80%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к последовательности исходного антитела. Термин «вариант антитела» может относиться к самому антителу, композиции, содержащей исходное антитело, или нуклеотидной последовательности, кодирующей антитело.

Термин «вариант» в настоящем документе включает последовательность антитела, отличающуюся от последовательности исходного антитела по меньшей мере на одну аминокислотную модификацию по сравнению с исходным антителом. В конкретном варианте реализации последовательность вариантного антитела в настоящем документе обладает по меньшей мере приблизительно 80%), предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 97%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 98%, наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к последовательности исходного антитела. Термин «вариант антитела» может относиться к самому антителу, композиции, содержащей исходное антитело, или нуклеотидной последовательности, кодирующей антитело. Термин «аминокислотная модификация» включает аминокислотную замену, добавление или делецию аминокислоты, и «аминокислотная замена» относится к замещению аминокислоты в конкретном положении последовательности исходного полипептида другой аминокислотой. Например, замена R94K означает, что аргинин в положении 94 замещен лизином, а «инсерция аминокислоты» в настоящем документе относится к добавлению аминокислоты в конкретном положении последовательности исходного полипептида. В настоящем документе «деления аминокислоты» или «делеция» относится к удалению аминокислоты в конкретном положении последовательности исходного полипептида.

Термин «консервативная модификация» или «консервативная модификация последовательности» в настоящем документе относится к аминокислотной модификации, которая не оказывает существенного влияния или не изменяет характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают аминокислотные замены, инсерции и делеции. Модификации можно внедрить в антитела согласно настоящему изобретению стандартными способами, известными в данной области техники, например, посредством сайт-специфического мутагенеза и ПЦР-опосредованного мутагенеза. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, при которых аминокислотные остатки заменяют аминокислотными остатками, содержащими аналогичные боковые цепи. В данной области техники существуют определения семейств аминокислотных остатков, содержащих аналогичные боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), β -разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один

или более из аминокислотных остатков в областях CDR или каркасных областях антитела согласно настоящему изобретению можно заменить аминокислотными остатками других семейств с идентичной боковую цепью и протестировать функцию, сохранившуюся в модифицированном (вариантном) антителе.

5 Все положения в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, обсуждаемые в настоящем изобретении, нумеруют на основе ЕС-индекса по Kabat (Kabat et al., 1991, sequences of proteins of immunological interest, 5th edition, United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda; данная работа полностью включена в настоящий документ посредством ссылки). «ЕС-индекс по Kabat» относится к нумерации остатков
10 ЕС IgG1-антитела человека, описанной в Edelman et al., 1969, Biochemistry 63: 78-85.

«Антигенная детерминанта» в настоящем документе, также называемая антигенным эпитопом, может состоять из непрерывной последовательности белка ВСМА или прерывистой трехмерной структуры последовательности белка ВСМА.

15 Термин «химерный рецептор антигена» или «CAR» в настоящем документе относится к полипептиду, содержащему внеклеточный домен, способный связывать антиген, трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен (т.е. внеклеточный сигнальный домен), причем внутриклеточный сигнальный домен относится к белку, передающему сигналы в клетку, продуцируя вторичный мессенджер посредством
20 заданного сигнального пути, и тем самым регулируя клеточную активность, или к белку, соответствующему такому мессенджеру и действующему в качестве эффектора, включая первичный сигнальный домен и функциональный сигнальный домен (т.е. костимулирующий сигнальный домен), происходящий от стимулирующей молекулы, определение которой приведено ниже. Внутриклеточный сигнальный домен генерирует
25 сигнал, стимулирующий иммунную эффекторную функцию клеток, несущих CAR (например, CAR Т-клеток), причем примеры иммунных эффекторных функций, например, у CART-клеток, включают литическую активность клеток и хелперную активность, включая секрецию цитокинов.

Термин «первичный сигнальный домен» относится к модуляции начальной активации TCR-комплекса раздражающим образом. В одном аспекте первичный сигнальный
30 домен активируют, например, связыванием TCR/CD3-комплекса с молекулой МНС со связанным пептидом, тем самым опосредуя Т-клеточный ответ (включая пролиферацию, активацию, дифференцировку, и т.д., но не ограничиваясь указанными). Первичный сигнальный домен, который функционирует стимулирующим образом, может содержать
35 иммунорецепторный мотив активации тирозина или сигнальный мотив ITAM. Примеры первичных сигнальных доменов, содержащих ITAM, которые в особенности полезны для настоящего изобретения, включают последовательность, происходящую от TCR ξ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также называемого «ICOS») и CD66d, но не ограничиваются указанными. В типичном CAR согласно
40 настоящему изобретению, в любом одном или более из CAR согласно настоящему изобретению внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточную сигнальную последовательность, например, первичный сигнальный домен CD3 ξ .

Термин «костимулирующий сигнальный домен» относится к «костимулирующей молекуле», которая является партнером по связыванию Т-клеткой, которая специфически
45 связывается с костимулирующим лигандом, тем самым опосредуя костимулирующий ответ Т-клетки, например, пролиферацию, но не ограничиваясь ей. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности или их лиганды, необходимые для эффективного иммунного ответа, и неантигенные рецепторы. Костимулирующие молекулы включают молекулы МНС I класса, рецепторы лигандов

BTLA и Toll, а также OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) и 4-1BB (CD137), но не ограничиваются указанными.

В одном аспекте настоящего изобретения CAR содержит химерный гибридный белок, содержащий внеклеточный антиген-распознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, а внутриклеточный сигнальный домен содержит функциональный сигнальный домен, происходящий от стимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR содержит химерный гибридный белок, содержащий внеклеточный антиген-распознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, а внутриклеточный сигнальный домен содержит функциональный сигнальный домен, происходящий от костимулирующей молекулы, и функциональный сигнальный домен, происходящий от стимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR содержит химерный гибридный белок, содержащий внеклеточный антиген-распознающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, а внутриклеточный сигнальный домен содержит по меньшей мере два функциональных сигнальных домена, происходящих от одной или более из костимулирующих молекул, и функциональный сигнальный домен, происходящий от стимулирующей молекулы. В одном аспекте CAR включает необязательную лидерную последовательность, присоединенную к аминокислоте (ND-концевой) гибридного белка CAR. В одном аспекте CAR дополнительно содержит лидерную последовательность по N-концу внеклеточного антиген-распознающего домена, причем указанная лидерная последовательность необязательно отщепляется от антиген-распознающего домена (например, scFv) во время процессинга и локализации CAR в клеточной мембране.

Термин «CD3ξ» в настоящем документе определяют как белок, представленный как последовательность с учетным номером GenBan BAG36664.1, или эквивалентные остатки, полученные из организма, не являющегося человеком, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т.п. «Домен CD3ξ» в настоящем документе определяют как аминокислотные остатки, полученные из цитоплазматического домена ξ-цепи достаточные для функциональной передачи исходного сигнала, необходимого для активации Т-клетки. В одном аспекте цитоплазматический домен ξ, содержит остатки 52-164 последовательности с учетным номером GenBan BAG36664.1, их функциональный ортолог - эквивалентные остатки, полученные из организма, не являющегося человеком, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т.д.

Термин «4-1BB» в настоящем документе относится к члену надсемейства TNFR, содержащему аминокислотную последовательность с учетным номером GenBank AAA62478.2, или эквивалентные остатки, полученные из организма, не являющегося человеком, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т.п. «Костимулирующий домен 4-1BB» определяют как аминокислотную последовательность 214-255 с учетным номером GenBank AAA62478.2, или эквивалентные остатки, полученные из неклассифицированного организма, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т.п. В одном аспекте «костимулирующий домен 4-1BB» представляет собой последовательность, предоставленную в SEQ ID NO: 35, или эквивалентные остатки, полученные из организма, не являющегося человеком, например, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т.п.

Термин «интерферон» в настоящем документе относится к полноразмерному интерферону или фрагменту интерферона (укороченному интерферону) или мутантному интерферону, в значительной степени сохраняющему биологическую активность полноразмерного интерферона дикого типа (например, сохраняющему по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей

мере 95%, 98% или 99% активности полноразмерного интерферона). Интерфероны включают интерфероны I типа (например, интерферон- α и интерферон- β) и интерфероны II типа (например, интерферон- γ).

5 Антитело согласно настоящему изобретению или его вариант можно применять для получения различных противоопухолевых таргетных лекарственных средств, а также средств для диагностики опухолей, в частности, для получения иммунных эффекторных клеток, нацеленных на ВСМА.

Антитело против ВСМА

10 В настоящем изобретении описаны антиген-связывающие белки, содержащие антиген-связывающую область на основе scFv, в том числе антитела. Рекомбинантный ВСМА использовали для отбора scFv из библиотеки фагового дисплея scFv человека. Эти молекулы демонстрируют прекрасную специфичность. Например, антитело распознает только клетки K562, стабильно экспрессирующие ВСМА, и не распознает клетки K562.

15 В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение включает антитело, содержащее последовательность scFv, присоединенную к одной или нескольким константным областям тяжелой цепи с образованием антитела, содержащего Fc-область иммуноглобулина человека и получением двухвалентного белка, что увеличивает общее сродство и стабильность антитела. Кроме того, Fc-фрагмент обеспечивает прямое конъюгирование других молекул (включая флуоресцентные красители, цитотоксины, радиоизотопы и т.д., но не ограничиваясь указанными), например, с антителами, применяемыми в исследованиях по количественному определению антигена с целью иммобилизации антител для измерения сродства, направленной доставки терапевтических средств, применения иммунных эффекторных клеток для тестирования Fc-опосредованной цитотоксичности и многих других вариантов применения.

25 Результаты, представленные в настоящем документе, подчеркивают специфичность, чувствительность и практичность антител согласно настоящему изобретению при направленном воздействии на ВСМА.

Молекулы согласно настоящему изобретению основаны на одноцепочечных 30 переменных фрагментах (scFv), выявленных и отобранных посредством фагового дисплея, аминокислотных последовательностях, придающих специфичность к ВСМА, и формируют основу всех антиген-связывающих белков согласно настоящему изобретению. Таким образом, scFv можно применять для проектирования различных молекул «антител», включая, например, полноразмерные антитела, их фрагменты, например, Fab и F(ab')₂-фрагменты, гибридные белки (включая scFv_Fc), поливалентные 35 антитела, т.е. антитело, обладающее более чем одной специфичностью по отношению к тому же или другим антигенам, например, биспецифическое антитело, связывающее Т-клетки (BiTE), три-антитело и т.д. (Cuesta et al, Multivalent antibodies: when design surpasses evolution, Trends in Biotechnology 28: 355-362, 2010).

40 В одном варианте реализации, где антиген-связывающий белок представляет собой полноразмерное антитело, тяжелые и легкие цепи антител согласно настоящему изобретению могут быть полноразмерными цепями (например, антитело может содержать по меньшей мере одну, предпочтительно две интактные тяжелые цепи, и по меньшей мере одну, предпочтительно две интактные легкие цепи), и, в качестве альтернативы, может содержать антиген-связывающую группу (Fab, F(ab')₂, Fv или scFv). В других 45 вариантах реализации константную область тяжелой цепи антитела выбрана, например, из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE. Выбор типа антитела зависит от иммунной эффекторной функции, которую должно стимулировать сконструированное антитело. Подходящие аминокислотные последовательности константных областей

различных изотипов иммуноглобулинов и способы получения широкого спектра антител известны специалистам в области конструирования рекомбинантных иммуноглобулинов.

В первом аспекте настоящего изобретения предложены антитело или его фрагмент, связывающийся с ВСМА, содержащие CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 1, 60, 62, и/или CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 2, 61, 63, и/или CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 3, 4, 5. В еще одном аспекте настоящего изобретения предложены антитело или его фрагмент, связывающийся с ВСМА, содержащие CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и/или CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и/или CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10. В еще одном аспекте настоящего изобретения предложены антитело или его фрагмент, связывающийся с ВСМА, содержащие CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 1, 60, 62, и/или CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности согласно любой из SEQ ID NO: 2, 61, 63, и/или CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 3, 4, 5, и/или CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и/или CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и/или CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10. ВСМА-связывающее антитело или его фрагмент предпочтительно содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 1, 60, 62, и CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 2, 61, 63, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 3, 4, 5, и/или CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6, и CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10. ВСМА-связывающее антитело или его фрагмент более предпочтительно содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 1, 60, 62, и CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 2, 61, 63, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 2, 61, 63, и CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 6, и CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7, и CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложены антитело или его фрагмент, связывающийся с ВСМА, содержащие последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 17, 21, 56 и 58.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложены антитело или его фрагмент, связывающийся с ВСМА, содержащие последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 15 и 19.

Каждая из последовательностей вариабельной области тяжелой и легкой цепи может связываться с ВСМА, поэтому последовательности вариабельной области тяжелой и

легкой цепи можно «смешать и сопоставить» для получения молекул, связывающих ВСМА, согласно настоящему изобретению.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложены варианты антитела или его фрагмента, связывающегося с ВСМА. Соответственно, в настоящем изобретении предложено антитело или его фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи и/или легкой цепи, по меньшей мере на 80% идентичную последовательности вариабельной области тяжелой или легкой цепи. Идентичность аминокислотной последовательности вариабельных областей тяжелой и/или легкой цепи предпочтительно составляет по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно 96%, более предпочтительно 97%, еще предпочтительнее 98%, наиболее предпочтительно 99%, включая, например, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и 100%. Вариант можно получить из антитела, описанного в настоящей заявке в качестве исходного антитела, путем скрининга дрожжевой библиотеки, скрининга фаговой библиотеки, точечной мутации и т.п. Как и в способе, использованном в примере 10 настоящей заявки, антитело 23F10 использовали в качестве исходного антитела, а способ скрининга фаговой библиотеки использовали для модификации мутаций.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено антитело, распознающее ту же антигенную детерминанту, что и антитело против ВСМА, описанное выше.

Свойства антитела против ВСМА

В данной области техники известны стандартные анализы для оценки связывающей способности антитела, например, антитела против ВСМА, в том числе, например, твердофазный ИФА, вестерн-блоттинг и проточно-цитометрический анализ.

Подходящие способы анализа подробно описаны в примерах.

Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева

В настоящем изобретении также предложены выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, связывающееся с ВСМА и его фрагментом, вектор и клетка-хозяин, содержащая указанную нуклеиновую кислоту или вектор. Нуклеиновая кислота может присутствовать в интактной клетке, в клеточном лизате или в частично очищенном или практически чистом виде.

Нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению можно получить с использованием стандартных молекулярно-биологических методик, например, стандартных методик ПЦР-амплификации или клонирования кДНК, тем самым получая кДНК, кодирующую легкую и тяжелую цепи антитела или кодирующую VH- и VL- сегменты. Для антител, полученных из библиотек генов иммуноглобулинов (например, с использованием технологии фагового дисплея), из библиотеки можно получить одну или более из нуклеиновых кислот, кодирующих антитела. Способы введения чужеродных нуклеиновых кислот в клетки-хозяева в целом известны в данной области техники и могут варьироваться в зависимости от используемой клетки-хозяина.

Предпочтительные молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению представляют собой молекулы, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 16 и 20, кодирующих вариабельную область легкой цепи, и/или молекулы, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 18, 22, 57 и 59, кодирующих вариабельную область тяжелой цепи. Более предпочтительная молекула нуклеиновых кислот содержит последовательность SEQ ID NO: 14, кодирующую тяжелую цепь, и последовательность SEQ ID NO: 12, кодирующую легкую цепь, или содержит последовательность SEQ ID NO: 18, кодирующую тяжелую цепь, и последовательность SEQ ID NO: 16, кодирующую

легкую цепь, или содержит последовательность SEQ ID NO: 22, кодирующую тяжелую цепь, и последовательность SEQ ID NO: 20, кодирующую легкую цепь, или содержит последовательность SEQ ID NO: 57, кодирующую тяжелую цепь, и последовательность SEQ ID NO: 20, кодирующую легкую цепь, или содержит последовательность SEQ ID NO: 59, кодирующую тяжелую цепь, и последовательность SEQ ID NO: 20, кодирующую легкую цепь.

Для экспрессии белка нуклеиновая кислота, кодирующая антитело согласно настоящему изобретению, может быть встроена в экспрессирующий вектор. Существуют разнообразные экспрессирующие векторы для экспрессии белка. Экспрессирующие векторы могут включать самореплицирующиеся внехромосомные векторы или векторы, встроенные в геном хозяина. Экспрессирующие векторы, используемые в настоящем изобретении, включают векторы, обеспечивающие экспрессию белка в клетках млекопитающих, бактерий, насекомых, дрожжей и системах *in vitro*, но не ограничиваются указанными. Как известно в данной области техники, для экспрессии антител в настоящем изобретении можно использовать различные экспрессирующие векторы, доступные для приобретения или иным образом.

Иммуноконъюгат

Кроме того, в настоящем изобретении предложен многофункциональный иммуноконъюгат, содержащий антитела, описанные в настоящем документе, и дополнительно содержащий по меньшей мере одну функциональную молекулу другого типа. Функциональную молекулу выбирают из молекулы, нацеленной на поверхностный маркер опухоли, молекулы, ингибирующей опухоль, молекулы, нацеленной на поверхностный маркер иммунной клетки, и детектируемой метки, но не ограничиваются указанными. Антитело и функциональная молекула могут образовывать конъюгат путем ковалентного присоединения, связывания, присоединения, перекрестного сшивания и т.п.

В предпочтительном варианте иммуноконъюгат может содержать антитело согласно настоящему изобретению и по меньшей мере одну молекулу, нацеленную на поверхностный маркер опухоли или молекулу, ингибирующую опухоль. Молекула, ингибирующая опухоль, может представлять собой противоопухолевые цитокины или противоопухолевые токсины. Цитокины предпочтительно включают ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-15, ИФН I типа, ФНО-альфа, но не ограничиваются указанными. В конкретном варианте реализации молекула, нацеленная на поверхностный маркер опухоли, представляет собой молекулу, нацеленную на тот же поверхностный маркер опухоли, что и для антитела согласно настоящему изобретению. Например, молекула, нацеленная на поверхностный маркер опухоли, может представлять собой антитело или лиганд, связывающиеся с поверхностным маркером опухоли и, например, способные действовать синергически с антителами согласно настоящему изобретению, обеспечивая более точное направленное воздействие на опухолевые клетки.

В предпочтительном варианте иммуноконъюгат может содержать антитело в соответствии с настоящим изобретением и детектируемую метку. Такие обнаруживаемые метки включают флуоресцентные метки, хромогенные метки, например, ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, биолюминесцентные материалы, радиоактивные материалы, позитрон-излучающие металлы и ионы нерадиоактивных парамагнитных металлов, но не ограничиваются указанными. Можно задействовать более чем один маркер. Метка, используемая для мечения антитела с целью обнаружения и/или анализа и/или диагностики, зависит от используемого конкретного способа и/или методики обнаружения/анализа/диагностики,

например, иммуногистохимического окрашивания образцов (ткани), проточной цитометрии и т.п. Подходящие метки для способов и/или методик обнаружения/анализа/диагностики, известных в данной области техники, хорошо известны специалистам в данной области техники.

5 В предпочтительном варианте иммуноконъюгат может содержать: антитело согласно настоящему изобретению и молекулу, нацеленную на поверхностный маркер иммунной клетки. Молекула, нацеленная на поверхностный маркер иммунной клетки, может представлять собой антитело или лиганд, связывающийся с поверхностным маркером иммунной клетки, способный распознавать иммунную клетку и переносить антитело
10 согласно настоящему изобретению к иммунной клетке. Антитело по настоящему изобретению может направлять иммунную клетку на опухолевые клетки, тем самым индуцируя иммунную клетку с целью специфического уничтожения опухолей. Поверхностный маркер иммунной клетки может быть выбран из группы, состоящей из CD3, CD16, CD28, и, предпочтительно, антитело, связывающееся с поверхностным
15 маркером иммунной клетки, представляет собой антитело против CD3. Иммунные клетки могут быть выбраны из группы, состоящей из Т-клеток, НК-клеток или НКТ-клеток.

В качестве средства химического получения иммуноконъюгата путем конъюгирования, непосредственного или косвенного (например, посредством линкера),
20 иммуноконъюгат можно получить в виде гибридного белка, содержащего антитело согласно настоящему изобретению и другие подходящие белки. Гибридный белок можно продуцировать способом, известным в данной области техники, например, рекомбинантно продуцировать путем конструирования и последующей экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность,
25 кодирующую антитело, в одной рамке считывания с нуклеотидной последовательностью, кодирующей подходящую метку.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая по меньшей мере одно антитело согласно настоящему изобретению, его функциональный вариант или иммуноконъюгат. После получения
30 соответствующей последовательности можно использовать способ рекомбинации для получения соответствующей последовательности в больших количествах. Обычно это делают путем его клонирования в вектор, переноса вектора в клетку, а затем выделения соответствующей последовательности из пролиферирующих клеток-хозяев обычными способами.

35 Настоящее изобретение также относится к векторам, содержащим соответствующие последовательности ДНК, описанные выше, а также соответствующим промоторам или контрольным последовательностям. Эти векторы можно использовать для трансформации подходящей клетки-хозяина с целью обеспечения возможности экспрессии белка. Клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку,
40 например, бактериальную клетку; или клетку низших эукариот, например, дрожжевую клетку; или клетку высших эукариот, например, клетку млекопитающего.

Химерный рецептор антигена, содержащий антитело против ВСМА

В настоящем изобретении предложено множество химерных рецепторов антигенов (CAR), содержащих антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению.
45 CAR Т-клетка обладает противоопухолевыми свойствами. В некоторых вариантах реализации клетки (например, Т-клетки) трансдуцируют вирусным вектором, кодирующим CAR. В некоторых вариантах реализации вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор. В некоторых вариантах реализации клетки могут

стабильно экспрессировать CAR.

В предпочтительном варианте реализации ВСМА-связывающий фрагмент CAR представляет собой scFv-фрагмент антитела, сохраняющий эквивалентную связывающую активность, например, он связывается с тем же антигеном с сопоставимой эффективностью по сравнению с IgG-антителом, из которого он получен. Фрагмент антитела является функциональным и поэтому обеспечивает биохимическую реакцию, которая может включать активацию иммунного ответа, ингибирование инициации сигнального пути, активируемого антигеном-мишенью, ингибирование киназной активности и т.п., но не ограничивается указанными. Соответственно, в настоящем изобретении предложена ВСМА-CAR, содержащий домен связывания WT1 и встроенный в Т-клетку, и способ его применения в адоптивной иммунотерапии.

В одном аспекте антиген-связывающий домен CAR против ВСМА представляет собой scFv-фрагмент антитела, гуманизированный по сравнению с последовательностью scFv мыши, от которой он происходит.

В одном аспекте CAR согласно настоящему изобретению объединяет антиген-связывающий домен конкретного антитела с внутриклеточной сигнальной молекулой. Например, в некоторых аспектах внутриклеточные сигнальные молекулы включают CD3 ξ -цепь, сигнальные модули 4-1BB и CD28 и их комбинации, но не ограничиваются указанными.

В одном аспекте ВСМА-CAR содержит по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный домен, выбранный из сигнального домена CD137 (4-1BB), сигнального домена CD28, сигнального домена CD3 ξ или любой их комбинации. В одном аспекте ВСМА-CAR содержит по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный домен, происходящий от одной или более из костимулирующих молекул, не являющихся CD137 (4-1BB) или CD28.

В типичном случае последовательность ВСМА-CAR может представлять собой 7A12-BBZ (SEQ ID NO: 75), 25C2-BBZ (SEQ ID NO: 76), 25D2-BBZ (SEQ ID NO: 77), 7G2-BBZ (SEQ ID NO: 78), 7A12-28Z (SEQ ID NO: 79), 7A12-28BBZ (SEQ ID NO: 80), 7G2-28Z (SEQ ID NO: 81), 7G2-28BBZ (SEQ ID NO: 82), 25C2-28Z (SEQ ID NO: 83), 25C2-28BBZ (SEQ ID NO: 84), 25D2-28Z (SEQ ID NO: 85), 25D2-28BBZ (SEQ ID NO: 86). Специалист в данной области техники может выбрать обычный трансмембранный домен и внутриклеточный домен для замены трансмембранного домена и внутриклеточного домена вышеуказанной SEQ ID NO: 75-86, что входит в рамки настоящего изобретения.

Т-клетка, модифицированная химерным рецептором антигена

В настоящем изобретении также предложена иммунная клетка, содержащая химерный рецептор антигена согласно настоящему изобретению.

В еще одном аспекте Т-клетка, модифицированная химерным рецептором антигена, предложена в настоящем изобретении, дополнительно несет кодирующую последовательность чужеродного цитокина; указанный цитокин предпочтительно включает: ИЛ-12, ИЛ-15 или ИЛ-21. Иммунные клетки предпочтительно выбраны из Т-лимфоцитов, NK-клеток или NKT-клеток.

В еще одном аспекте Т-клетка, модифицированная химерным рецептором антигена, предложенная в настоящем изобретении, дополнительно содержит блокатор PD-L1 или белок, блокирующий PD-L1, например, нативный PD-1 или мутантный PD-1, способный связываться с PD-L1, или фрагмент нативного или мутантного PD-1, способного связываться с PD-L1, или антитело против PD-L1. В типичном случае блокатор PD-L1 может содержать аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 70.

Фармацевтическая композиция

Антитела, иммуноконъюгаты, содержащие антитела, и генетически модифицированные иммунные клетки согласно настоящему изобретению можно применять при изготовлении фармацевтической композиции или диагностического реагента. В дополнение к эффективному количеству антитела, иммунологического конъюгата или иммунной клетки композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Термин «фармацевтически приемлемый» означает, что при надлежащем введении молекулярных структур и композиций животным или людям они не вызывают нежелательных, аллергических или других неблагоприятных реакций.

Конкретными примерами некоторых веществ, которые можно применять в качестве фармацевтически приемлемых носителей или их компонентов, являются углеводы, например, лактоза, декстроза и сахароза; производные крахмала, например, кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза и ее производные, например, карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и метилцеллюлоза; трагакантовая камедь; солод; желатин; тальк; твердые смазывающие вещества, например, стеариновая кислота и стеарат магния; сульфат кальция; растительные масла, например, арахисовое масло, хлопковое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и масло какао; многоатомные спирты, например, пропиленгликоль, глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; альгиновая кислота; эмульгаторы, например, Tween®; увлажнители, например, лаурилсульфат натрия; красители; вкусоароматические добавки; таблетки, стабилизаторы; антиоксиданты; консерванты; апирогенная вода; изотонические растворы хлорида натрия; и фосфатные буферы и т.п.

Композицию согласно настоящему изобретению при необходимости можно изготовить в виде различных лекарственных форм, а дозировку для пациента может определить врач в соответствии с такими факторами, как тип, возраст, масса тела и общее состояние заболевания у пациента, способ введения и т.п. Например, можно использовать инъекцию или другой вариант лечения.

Преимущества изобретения:

1. В настоящем изобретении предложены специфические антитела против ВСМА;
2. В настоящем изобретении предложены эффекторные иммунные клетки, нацеленные на ВСМА; и
3. Антитело согласно настоящему изобретению способно эффективно связываться с опухолевыми клетками, экспрессирующими ВСМА, а эффекторные иммунные клетки согласно настоящему изобретению проявляют выраженную способность уничтожать опухолевые клетки, экспрессирующие ВСМА, и, следовательно, указанное антитело и эффекторные и иммунные клетки согласно настоящему изобретению можно эффективно и безопасно применять для лечения множественной миеломы, в связи с чем они являются материальной основой для лечения множественной миеломы.

Настоящее изобретение в настоящем документе дополнительно проиллюстрировано специфическими примерами. Следует понимать, что эти примеры не предназначены для ограничения рамок изобретения. Экспериментальные способы в следующих примерах, где не указаны специфические условия, обычно выполняют в соответствии с общепринятыми условиями, например, описанными в J. Sambrook et al., *Molecular Cloning Experimental Guide, Third Edition*, Science Press, 2002, или в соответствии с условиями, рекомендованными изготовителем.

Пример 1. Получение рекомбинантного белка ВСМА

- a. Конструирование экспрессирующей плазмиды ВСМА_huFc, ВСМА_muFc

Ген (SEQ ID NO: 39) внеклеточного сегмента ВСМА человека, Met1-Ala54 (SEQ ID NO: 38), синтезировали *in vitro*, вставляли в эукариотическую экспрессирующую плазмиду, содержащую Fc-фрагмент Asp104-Lys330 константной области тяжелой цепи IgG1 человека и связанную с «GS» для получения гибридного экспрессируемого белка ВСМА_huFc (SEQ ID NO: 40), и последовательность соответствующего гена показана в SEQ ID NO: 41.

Ген (SEQ ID NO: 39) внеклеточного сегмента ВСМА человека вставляли в эукариотическую экспрессирующую плазмиду, содержащую Fc-фрагмент Arg100-Lys324 константной области тяжелой цепи IgG1 мыши и связанную с «GS» для получения гибридного экспрессируемого белка ВСМА_muFc (SEQ ID NO: 42), и последовательность соответствующего гена показана в SEQ ID NO: 43.

б. Экспрессия ВСМА_huFc, ВСМА_muFc посредством временной трансфекции

1) Через день после трансфекции $6-7 \times 10^5$ клеток 293F/мл инокулировали в 125-мл культуральные колбы;

2) В день трансфекции 3×10^7 клеток доводили до объема 28 мл средой для экспрессии FreeStyle™ 293;

3) Комплекс «липид-ДНК» получали последствием следующих поэтапных действий: 30 мкг ДНК разбавляли Opti-MEM I до конечного объема 1 мл и тщательно перемешивали;

60 мкл 293fectin™ разбавляли Opti-MEM I до конечного объема 1 мл и тщательно перемешивали;

смесь инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре;

4) разбавленную ДНК разбавляли 293fectin™ и инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре;

5) 2 мл комплекса «ДНК-293fectin» добавляли к 28 мл клеток, культивировали при 37°C в атмосфере 8% CO₂, при 125 об/мин в течение 3-4 дней и собирали надосадочную жидкость.

с. Очистка ВСМА_huFc, ВСМА_muFc

1) Надосадочную жидкость центрифугировали при 13000 об/мин в течение 15 мин;

2) Для аффинной очистки использовали фильтр с белком А, причем поэтапные действия перечислены ниже:

Уравновешивание: 10 объемов колонки буфера для уравновешивания использовали для фильтра с белком А.

Загрузка: загружали образец, обработанный с помощью 0,45-мкм фильтра.

Промывка: 20 объемов колонки буфера для уравновешивания использовали для удаления примесей до прекращения непрерывного потока.

Элюирование: 10 объемов колонки буфера для элюирования добавляли для элюирования исследуемого белка (в пробирку для сбора заранее добавляли 6% нейтрализующего буфера).

Составление раствора:

Буфер для уравновешивания: PBS pH 7,4

Буфер для элюирования: 0,1 М глицин, pH 2,6

Нейтрализующий буфер: 1 М трис

3) Элюат фильтровали через 0,22-мкм мембрану, концентрировали в пробирке Millipore для ультрафильтрации с пороговой молекулярной массой 10 кДа до объема 1 мл и обессоливали с использованием обессоливающей колонки PD-Midi. Собирали 1,5 мл образца. Концентрацию белка измеряли по OD280/1,47.

2 мкг забирали для электрофореза в ДСН-ПААГ, результаты показаны на фигуре 1.

Пример 2. Конструирование стабильной линии клеток K562-BCMA

1. Конструирование плазмиды для упаковки рWPT-BCMA

Полноразмерный ген (SEQ ID NO: 37) BCMA человека синтезировали *in vitro*, вводили сайты расщепления MluI, SalI (SEQ ID NO: 44) вставляемые в плазмиду рWPT для упаковки лентивируса путем двойного гидролиза.

2. Упаковка лентивирусов

а) Lenti-x 293T гидролизовали, высевали на 10-см чашки 10 из расчета 8×10^6 клеток и культивировали при 37°C.

б) На следующее утро: получали смесь плазмид/ПЭИ

рWPT-BCMA, 5 мкг

psPAX.2, 7,5 мкг

рMD2.G, 2,5 мкг

добавляли к 800 мкл DMEM и инкубировали. Соответствующий объем ПЭИ составлял 45 мкл, инкубирование выполняли в течение 5 мин в 800 мкл DMEM.

с) смесь плазмид добавляли по каплям в раствор ПЭИ для инкубирования, аккуратно перемешивали и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре.

д) полученную смесь плазмид/ПЭИ по каплям добавляли к клеткам и перемешивали.

Раствор меняли через 5 часов.

е) надосадочную жидкость вируса собирали через 72 ч, фильтровали через 0,45-мкм фильтр и временно хранили при 4°C.

3. Клетки K562, инфицированные BCMA-вирусом

а) Середина 1 дня: хорошо выращенные клетки K562 высевали из расчета 1×10^5 клеток на 6-см чашку.

б) Середина 2 дня: надосадочную жидкость клеток K562 выбрасывали, добавляли 3 мл свежей полной среды и добавляли 1 мл базового раствора вируса до конечной концентрации 6 мкг/мл полибрена.

с) Утро 3 дня: надосадочную жидкость выбрасывали и добавляли 5 мл свежей полной среды.

д) Утро 6 дня: некоторое количество клеток отбирали для обнаружения в потоке.

4. Выявление смешанного клона K562-BCMA

а) Смешанные клоны K562-BCMA и отрицательные клетки K562 дважды промывали 1% NCS (PBS, содержащего 1% сыворотки теленка), а затем инкубировали с первичным антителом: антителом huBCMA (abcam, #17323) разбавленным 1% NCS в соотношении 1:1000 (по 50 мкл) и инкубировали в течение 50 мин при 4°C.

б) Клетки дважды промывали 1% NCS, а затем инкубировали с вторичным антителом: DyLight488-меченым антителом козы против IgG крысы (abcam, #ab98420), разбавленным 1% NCS в соотношении 1:200 (по 50 мкл) и инкубировали в течение 45 мин при 4°C.

с) Клетки трижды промывали 1% NCS, ресуспендировали в 1% NCS и обнаруживали с помощью прибора Guava easyCyte™ HT System. Результаты показаны на фигуре 2А.

5. Посев одиночных клонов K562-BCMA

а) Клетки смешанного клона K562-BCMA подсчитывали и высевали одиночные клоны посредством предельного разведения.

б) Через неделю наблюдали рост клонов, среду заменяли.

с) Через две недели отбирали клетки в лунках моноклонального роста и размножали их путем культивирования.

6. Выявление одиночного клона K562-BCMA

Способ обнаружения был таким же, как при выявлении смешанного клона, результаты эксперимента показаны на фиг. 2В. 4 из этих одиночных клонов являлись ВСМА-положительными клонами.

5 Пример 3. Скрининг на предмет ВСМА-специфичного scFv с использованием полной библиотеки фагового дисплея человека

Библиотека фагового дисплея, использованная в настоящем изобретении, представляла собой полную фаговую библиотеку природных scFv человека, сконструированную данной компанией и обладающей емкостью хранения 1E + 11. scFv-фрагменты, обладающие высокой специфичностью по отношению к ВСМА, 10 получали с помощью способов скрининга, известных специалисту. Вкратце, 10 мкг/мл антигена ВСМА_huFc и Fc-фрагмента человека иммобилизовали в иммунологических пробирках, соответственно. Для снижения влияния Fc-фрагмента фаговую библиотеку добавляли в иммунологические пробирки с иммобилизованным Fc-фрагментом человека на 1 ч. Надосадочную жидкость отбирали и добавляли в иммунологические пробирки 15 с иммобилизованным ВСМА_huFc на 1,5 часа, затем неспецифический фаг отмывали, а связанный фаг элюировали и использовали для инфицирования E. coli TG1 в логарифмической фазе роста. Элюированный фаг размножали, размноженную фаговую библиотеку очищали осаждением в ПЭГ/NaCl на следующем цикле скрининга. Пэннинг выполняли в течение 3-4 циклов с целью обогащения клонов фагов с scFv, специфически 20 связывавшихся с ВСМА. Положительные клоны определяли стандартными способами твердофазного ИФА ВСМА_huFc. Fc-фрагмент человека использовали в качестве неспецифического антигена для твердофазного ИФА с целью проверки специфичности антитела. В общей сложности выполнили скрининг 2470 клонов, причем 160 из них специфически связывались с ВСМА_huFc, но не связывались с Fc-фрагментом человека 25 при твердофазном ИФА. 76 клонов с высокими значениями сигнала выбрали для секвенирования и получили 23 одиночных последовательности. Эти 23 клон очистили и экспрессировали, получив три клон, специфически связывавшиеся с клетками K562-ВСМА (фиг. 4), и этим клонам дали названия 7G2, 7A12 и 23F10. Секвенирование позволило установить, что переменная область тяжелой цепи 7A12 представляла 30 собой аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 13, переменная область легкой цепи представляла собой аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 11; переменная область тяжелой цепи 7G2 представляла собой аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 17, переменная область легкой цепи представляла собой аминокислотную последовательность, 35 показанную в SEQ ID NO: 15; и переменная область тяжелой цепи 23F10 представляла собой аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 21, переменная область легкой цепи представляла собой аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 19.

40 Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи 7A12 (SEQ ID NO: 13):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS**WVRQAPGKGLEWV**
SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARY
PYLAFDYWGQGLVTVSS (последовательности CDR выделены
 45 полужирным подчеркнутым шрифтом)

Нуклеотидная последовательность переменной области тяжелой цепи 7A12 (SEQ ID NO: 14):

GAGGTGCAATTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGG
 GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATG
 CCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTC
 5 AGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
 GCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAG
 ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTA CTGTGCGCGTTA
 10 CCCATACCTGGCATTCTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCT
 CGAGT

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи 7A12 (SEQ ID NO: 11)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY
 15 GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQOYGYPPSYTFGQG
 TKVEIK (последовательности CDR выделены полужирным подчеркнутым шрифтом)

Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи 7A12 (SEQ ID NO: 12):

GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG
 GGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCT
 ACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC
 25 TATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCA
 GTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA
 GATTTTGCAGTGTATTA CTGTCAGCAGTACGGTTACCCACCATCTTACACG
 30 TTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи 7G2 (SEQ ID NO: 17):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV
 35 SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKL
SGDAAMDYWGQGLVTVSS (последовательности CDR выделены полужирным подчеркнутым шрифтом)

Нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи 7G2 (SEQ ID NO: 17):

40

45

GAGGTGCAATTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGG
 GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATG
 CCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTC
 5 AGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
 GCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAG
 ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAC
 TGTCTGGTGATGCAGCAATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACC
 10 GTCTCGAGT

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 7G2 (SEQ ID NO: 15):

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY
 15 GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPPRYTFGQ
 GTKVEIK (последовательности CDR выделены полужирным подчеркнутым шрифтом)

Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи 7G2 (SEQ ID NO: 16):

GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG
 GGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCT
 ACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC
 25 TATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCA
 GTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA
 GATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTACGGTTACCCACCAAGATACAC
 GTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA

30 Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 23F10 (SEQ ID NO: 21):

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV
SAISGSGGSTYYADSVKGRFRTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKV
 35 RPFWGTFDYWGQGLVTVSS (последовательности CDR выделены полужирным подчеркнутым шрифтом)

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 23F10 (SEQ ID NO: 22):

40

45

GAGGTGCAATTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGG
 GGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATG
 CCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTC
 5 AGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG
 GCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAG
 ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAG
 TTCGTCCATTCTGGGGTACTTTCGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTC
 10 ACCGTCTCGAGT

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи 23F10 (SEQ ID NO: 19):

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY
 15 GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYFNPPEYTFGQG
 TKVEIK (последовательности CDR выделены полужирным подчеркнутым шрифтом)

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи 23F10 (SEQ ID NO: 20):

GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG
 GGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCT
 АСТTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC
 25 TATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCA
 GTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA
 GATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTACTTCAACCCACCAGAATACAC
 GTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAATCAAA

30 Пример 4. Конструирование гибридного scFv_Fc-антитела против ВСМА и его временная экспрессия, очистка и выявление активности в эукариотических клетках
 Праймеры конструировали для VH- и VL-фрагментов 7G2, 7A12, 23F10, соответственно, и внедряли гибкий линкер, состоящий из 15 аминокислот (GGGGSGGGSGGGGS) для получения scFv; сайт расщепления NheI и защитные
 35 основания внедряли выше VH, а сайт расщепления BamHI и защитные основания внедряли после VL. Продукт ПЦР анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле, очищали и выделяли. После гидролиза его лигировали в эукариотический экспрессирующий вектор V152 (приобретенный в Shanghai Ruijin Biotechnology Co., Ltd.).
 40 Клетки 293F в логарифмической фазе роста временно трансфицировали с использованием реагента для трансфекции 293fectin™ (Invitrogen, 12347-019) или полиэтиленimina (ПЭИ) (Sigma-Aldrich, 408727). На 5-7 день после трансфекции собирали надосадочную жидкость и подвергали ее аффинной очистке с белком А. Полученные антитела количественно и качественно анализировали электрофорезом в ДСН-ПААГ (фиг. 5).

45 Связывание антитела с K562, стабильно экспрессирующими ВСМА, проверяли проточной цитометрией. Способ FACs-обнаружения осуществляли следующим образом: клетки собирали, однократно промывали ростовой средой и ресуспендировали в PBS. Концентрацию клеток доводили до 4E+5 клеток/мл. Гибридные scFv_Fc-антитела,

разбавленные в градиенте, инкубировали с клетками на льду в течение 30 минут, начальная концентрация антитела составляла 500 нМ, что представляло собой 5-кратное разбавление в общей сложности в 7 градиентах. Затем антитело инкубировали с FITC-меченым вторичным антителом против IgG мыши и после двукратной промывки обнаруживали с использованием Guava easyCyte™ HT System. На фигуре 6 показано связывание гибридных форм scFv_Fc антител 7A12, 7G2 и 23F10 с K562-BCMA. Все три антитела характеризовались связыванием в зависимости от концентрации, значения EC50 составляли 3,13 нМ, 3,42 нМ и 5,61 нМ, соответственно.

Пример 5. Определение сродства антитела с использованием поверхностного плазмонного резонанса (ППР)

Сродство различных антител к BCMA определяли с помощью biacore T200. Использовали следующий способ:

BCMA_huFc иммобилизовали на чипе CM5 путем присоединения по аминокислотной группе до приблизительно 500 ЕО и через канал с иммобилизованным антигеном в качестве подвижной фазы пропускали антитело, разбавленное градиентом, со скоростью потока 30 мкл/мин. Подвижный буфер представлял собой HBS-N, температура составляла 25°C. Экспериментальные данные анализировали в BIAevaluation 3.2, кинетические кривые аппроксимировали моделью Лэнгмюра 1:1. KD 7A12 (scFv_Fc) составила 663 пМ, KD 7G2 (scFv_Fc) - 499 пМ, а KD 23F10 (scFv_Fc) - 667 пМ (см. фигуру 7). Параметры представлены в следующей таблице:

Клон	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)
7G2	7,52E+04	3,75E-05	4,99E-10
7A12	9,84E+04	6,53E-05	6,63E-10
23F10	6,64E+04	4,43E-05	6,67E-10

Пример 6. Определение сродства антител к опухолевым линиям клеток посредством FACS

RPMI8226 представляет собой В-лимфоциты периферической крови множественной миеломы человека. Способ FACS-обнаружения осуществляли следующим образом: клетки собирали, однократно промывали ростовой средой и ресуспендировали в PBS. Концентрацию клеток доводили до 4E+5 клеток/мл. Гибридные scFv_Fc-антитела, разбавленные в градиенте, инкубировали с клетками на льду в течение 30 минут, начальная концентрация антитела составляла 500 нМ и в общей сложности 5-кратное разбавление в 7 градиентах. Затем антитело инкубировали с а FITC-меченым вторичным антителом против IgG мыши и после двукратной промывки обнаруживали посредством Guava easyCyte™ HT System. На фигуре 8 показано связывание гибридных форм scFv_Fc антител 7A12, 7G2 и 23F10 в зависимости от концентрации с клетками линии RPMI8226.

Пример 7. Анализ конкурентного связывания антитела против BCMA с лигандом BCMA APRIL

1. Экспрессия очищенного рекомбинантного белка APRIL

Гибридный белок, состоящий из His115-Leu250 APRIL человека и Fc-фрагмента Asp104-Lys330 константной области тяжелой цепи IgG1 человека, соединенных «GS», подвергали рекомбинантной экспрессии. Гибридный белок APRIL_huFc (SEQ ID NO: 45), последовательность соответствующего гена представляла собой SEQ ID NO: 46. Временную трансфекцию, экспрессию и очистку выполняли, как описано в примере 1.

2. Конкурентный твердофазный ИФА

На планшете для ИФА иммобилизовали 50 нг/мл 100 мкл/пустого BCMA_muFc при 4°C в течение ночи. На следующий день планшет трижды промывали PBS, добавляли PBS, содержащий 2% сухое обезжиренное молоко и блокировали при комнатной

температуре в течение 1 часа. Одновременно добавляли 40 нг/мл APRIL_huFc и антитело 7A12, 7G2 или 23F10, разбавленное градиентом (начальная концентрация 200 нМ, 3-кратное разбавление, 7 градиентов). Полученную смесь инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, трижды промывали PBST и трижды - PBS. Добавляли разведение 1:1000 ПХ-меченого антитела против Fc человека, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, трижды промывали PBST и трижды - PBS. Для развития окрашивания добавляли ТМВ и считывали на микропланшетном ридере.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 9. Все антитела - 7A12, 7G2 и 23F10 - могли в значительной степени ингибировать связывание APRIL с ВСМА, что демонстрировало способность антител согласно настоящему изобретению ингибировать связывание ВСМА с его естественным лигандом.

Пример 8. Конструирование плазмиды химерного рецептора антигена против ВСМА (CAR)

а Конструирование плазмиды химерного рецептора антигена на основе антитела 7A12 против ВСМА

Лентивирусные плазмиды, экспрессирующие химерные рецепторы антигенов на основе антитела 7A12 второго и третьего поколений конструировали с использованием PRRLSIN-cPPT.EF-1 α в качестве вектора, включая PRRLSIN-cPPT.EF-1 α -7A12-28Z, PRRLSFN-cPPT.EF-1 α -7A12-BBZ и PRRLSFN-cPPT.EF-1 α -7A12-28BBZ.

Последовательность 7A12-28Z состоит из сигнального пептида CD8 α (SEQ ID NO: 23), scFv 7A12 (SEQ ID NO: 47), шарнира CD8 (SEQ ID NO: 25), трансмембранной области CD28 (SEQ ID NO: 27), внутриклеточного сигнального домена (SEQ ID NO: 29) и внутриклеточного сегмента CD3 ξ , (SEQ ID NO: 31) CD3; последовательность 7A12-BBZ состоит из сигнального пептида CD8 α (SEQ ID NO: 23), scFv 7A12 (SEQ ID NO: 47), шарнира CD8 (SEQ ID NO: 25), трансмембранной области (SEQ ID NO: 33), внутриклеточного сигнального домена CD137 (SEQ ID NO: 35) и CD3 ξ (SEQ ID NO: 31); последовательность 7A12-28BBZ состоит из сигнального пептида CD8 α (SEQ ID NO: 23), 7A12-scFv (SEQ ID NO: 47), шарнира CD8 (SEQ ID NO: 25), трансмембранной области CD28 (SEQ ID NO: 27), внутриклеточного сегмента (SEQ ID NO: 29), внутриклеточного сигнального домена CD137 (SEQ ID NO: 35) и CD3 ξ (SEQ ID NO: 31).

б. Конструирование плазмиды для химерного рецептора антигена на основе антитела 7G2 против ВСМА

Лентивирусные плазмиды, экспрессирующие химерные рецепторы антигенов на основе антитела 7G2 второго и третьего поколений конструировали с использованием PRRLSIN-cPPT.EF-1 α в качестве вектора, включая PRRLSFN-cPPT.EF-1 α -7G2-28Z, PRRLSIN-cPPT.EF-1 α -7G2-BBZ и PRRLSIN-cPPT.EF-1 α -7G2-28BBZ. Последовательность 7G2-28Z состоит из сигнального пептида CD8 α (SEQ ID NO: 23), scFv 7G2 (SEQ ID NO: 48), шарнира CD8 (SEQ ID NO: 25), трансмембранной области CD28 (SEQ ID NO: 27), внутриклеточного сигнального домена (SEQ ID NO: 29) и внутриклеточного сегмента CD3 ξ , (SEQ ID NO: 31) CD3; последовательность 7G2-BBZ состоит из сигнального пептида CD8 α (SEQ ID NO: 23), scFv 7G2 (SEQ ID NO: 48), шарнира CD8 (SEQ ID NO: 25), трансмембранной области (SEQ ID NO: 33), внутриклеточного сигнального домена CD137 (SEQ ID NO: 35) и CD3 ξ , (SEQ ID NO: 31); последовательность 7G2-28BBZ состоит из сигнального пептида CD8 α (SEQ ID NO: 23), 7G2-scFv (SEQ ID NO: 48), шарнира CD8 (SEQ ID NO: 25), трансмембранной области CD28 (SEQ ID NO: 27), внутриклеточного сегмента (SEQ ID NO: 29), внутриклеточного сигнального домена CD137 (SEQ ID NO: 35) и CD3 ξ (SEQ ID NO: 31).

Пример 9. Получение CAR Т-клеток

1. Упаковка лентивируса, концентрация вируса и определение титра лентивирусного вектора CAR, нацеленного на ВСМА

а. Упаковка лентивируса

1) Клетки 293Т инокулировали в 10-см культуральной чашке и культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂ для трансфекции; среда представляла собой DMEM, содержащую 10% фетальную телячью сыворотку (Gibico);

2) 5,4 мкг плазмиды с геном-мишенью PRRLSIN-cPPT.EF-1 α -EGFP (имитация) или плазмиды с родственным CAR и 6,2 мкг плазмиды для упаковки pRsv-REV, 6,2 мкг RRE-RMDLg, 2,4 мкг Vsvg растворяли в 800 мкл холостой среды DMEM и смешивали;

3) 60 мкг ПЭИ растворяли в 800 мкл бессывороточной среды DMEM, аккуратно перемешивали (или встряхивали на вортексе при 1000 об/мин в течение 5 секунд) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре;

4) Формирование комплекса для трансфекции: смесь плазмид добавляли к смеси ПЭИ, непосредственно после добавления смесь встряхивали на вортексе или аккуратно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин;

5) 1,6 мл комплекса для трансфекции добавляли в 10-см культуральную чашку, содержащую 11 мл среды DMEM (менять среду не нужно); через 4-5 часов меняли среду трансфицированных клеток 293Т на среду DMEM, содержащую 10% FBS, инкубировали в течение 72 ч при 37°C и собирали надосадочную жидкость вирусов.

б. Концентрация лентивирусов

1) Получение 5X ПЭГ8000 NaCl: 8,766 г NaCl и 50 г ПЭГ8000 взвешивали и растворяли в 200 мл чистой воды Milli-Q; стерилизовали при 121°C в течение 30 мин; и хранили при 4°C;

2) Надосадочную жидкость лентивирусов фильтровали через 0,45-мкм фильтр; 7,5 мл базового раствора 5X ПЭГ-8000 NaCl добавляли к 30 мл фильтрованного исходного раствора вируса; 3-5 раз перемешивали раз в 20-30 минут; помещали при температуре 4°C на ночь; и центрифугировали при 4°C, 4000 g в течение 20 мин;

3) Надосадочную жидкость аспирировали и выбрасывали, пробирку помещали на 1-2 минуты, остаточную жидкость аспирировали и выбрасывали; добавляли соответствующее количество раствора лентивируса для растворения осадка лентивируса; распределяли и хранили при -80°C.

с. Определение титра лентивируса

1) клетки 293Т инокулировали в 6-луночных культуральных планшетах из расчета 2 \times 10⁵ клеток, 1 мл/лунку; добавляли 10 мкг/мкл (начальная концентрация) раствор полибрена в 0,6 мкл/мл до конечной концентрации 6 мкг/мл; культивировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 1 часа; среда представляла собой DMEM, содержащую 10% фетальную телячью сыворотку;

2) концентрат вируса добавляли из расчета 10 мкл/лунку, при 5-кратном разбавлении в 3 градиентах, и культивировали при 37°C, 5% CO₂;

3) через 72 часа после инфицирования использовали трипсин для гидролиза (30 с) клеток 293Т, добавляли 1 мл DMEM (10% FBS) для прекращения гидролиза, суспензию клеток переносили в 2-мл центрифужную пробирку (две аликвоты), центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин, надосадочную жидкость выбрасывали; клетки дважды промывали PBS (2% NBS);

4) к клеткам в контрольной группе добавляли 50 мкл PE-SA (разбавление 1:200), инкубировали на льду в течение 45 мин, дважды промывали PBS (2% NBS) и ресуспендировали в качестве контроля;

5) 50 мкл разбавленного в соотношении 1:50 E(ab')₂-антитела козы против IgG человека, меченого биотином, добавляли к клеткам в группе тестируемых клеток, инкубировали на льду в течение 45 мин и дважды промывали PBS (2% NBS); добавляли

5 50 мкл антитела PE-SA (разбавление 1:200) и инкубировали на льду в течение 45 мин; б) для ресуспендирования клеток добавляли 2 мл PBS (2% NBS) и центрифугировали при 4°C, 5000 об/мин в течение 5 минут; надосадочную жидкость выбрасывали; эту процедуру повторяли дважды;

7) добавляли 500 мкл PBS (2% NBS) и переносили в проточную трубку. Обнаружение на канале PE выполняли посредством проточной цитометрии, количество клеток с положительным показателем 5-20% было соответствующим. Рассчитывали титр (БОЕ/мл) = количество клеток × положительный показатель / объем вируса.

2. Т-лимфоцит, трансдуцированный лентивирусом ----- Получение CAR-положительных Т-лимфоцитов

1) Активация Т-лимфоцита: лимфоциты добавляли в среду для культивирования 15 лимфоцитов из расчета плотности приблизительно 1×10^6 /мл, одновременно добавляли магнитные гранулы (Invitrogen) с иммобилизованными антителами против CD3 и CD28 при соотношении магнитные гранулы:клетки 2:1 и рекомбинантный ИЛ-2 человека (Shanghai Huaxin Biotech Co., Ltd.) в конечной концентрации 500 ед/мл и инкубировали в течение 48 ч;

2) Через день после инфицирования на 24-луночной планшете иммобилизовали Retronectin в конечной концентрации 5 мкг/мл и инкубировали в течение ночи при 4°C;

3) раствор Retronectin (PBS) в 24-луночной планшете выбрасывали, планшет дважды промывали 1 мл PBS;

4) К МПК-клеткам добавляли концентрированный лентивирус при MOI = 10, центрифугировали при 1000 g в течение 40 мин и переносили в клеточный инкубатор;

5) Амплификация: Инфицированные клетки пересеивали через день из расчета плотности 5×10^5 /мл, добавляя рекомбинантный ИЛ-2 человека в конечной концентрации 500 ед/мл к раствору для культивирования лимфоцитов.

3. Экспрессия химерного рецептора антигена Т-лимфоцита

1) На 7 день культивирования в центрифужную пробирку отбирали 1×10^6 Т-лимфоцитов, инфицированных лентивирусом;

2) Т-клетки центрифугировали при 4°C, 5000 об/мин в течение 5 мин, надосадочную жидкость выбрасывали, осадок дважды промывали PBS;

3) К тестируемым клеткам добавляли 50 мкл P(ab')₂-антитела козы против IgG человека, меченого биотином (разбавление 1:50), инкубировали на льду в течение 45 мин; дважды промывали PBS (2% NBS); и добавляли 50 мкл антитела PE-SA (разбавление 1:200) и инкубировали на льду в течение 45 мин;

4) Для ресуспендирования клеток добавляли 2 мл PBS (2% NBS) и центрифугировали 40 при 4°C, 5000 об/мин в течение 5 минут, надосадочную жидкость выбрасывали; эту процедуру повторяли дважды;

5) Добавляли 500 мкл PBS (2% NBS) и переносили в проточную трубку. Обнаружение на канале PE выполняли посредством проточной цитометрии, определяя долю CAR-положительных Т-клеток.

45 Положительные показатели инфекции имитационных клеток, 7A12-28Z, 7A12-BBZ, 7A12-28BBZ, 7G2-28Z, 7G2-BBZ и 7G2-28BBZ Т-клетки в эксперименте по определению цитотоксичности in vitro показаны на фигуре 10 и составляли 72,8%, 60,8%, 48,7%, 57,4%, 67,5%, 68,8%, 63,6%, соответственно.

4. Анализ цитотоксичности CAR T-клеток, нацеленных на ВСМА

Набор для анализа цитотоксичности без использования радиоактивных материалов CytoTox 96 (Promega) использовали в соответствии с инструкциями к набору для анализа цитотоксичности без использования радиоактивных материалов CytoTox 96.

5 Клетки-мишени: $75 \text{ мкл } 2 \times 10^5 / \text{мл}$ клеток K562, K562-ВСМА и RPMI-8226 инокулировали в 96-луночные планшеты, соответственно. Эффекторные клетки: Имитационные T-клетки и CAR T-клетки, экспрессирующие различные химерные рецепторы антигенов, добавляли в соотношении «эффекторные клетки: мишени»,
10 равно 3:1, 1:1 или 1:3. Для каждой группы задали лунки в четырех повторностях и использовали среднее значение по 4 повторным лункам. Время обнаружения соответствовало 18 часу инкубирования клеток. Каждая экспериментальная группа и каждая контрольная группа представляли собой:

Каждая экспериментальная группа: каждая клетка-мишень + CAR T-клетки, экспрессирующие различные химерные рецепторы антигенов;

15 Контрольная группа 1: максимальное высвобождение ЛДГ из клеток-мишеней;

Контрольная группа 2: спонтанное высвобождение ЛДГ из клеток-мишеней;

Контрольная группа 3: спонтанное высвобождение ЛДГ из эффекторных клеток;

20 Формула расчета цитотоксичности представляла собой: цитотоксичность % = [(экспериментальная группа - контроль эффекторных клеток - контроль клеток-мишеней) / (максимум для клеток-мишеней - контроль клеток-мишеней)] $\times 100\%$.

Результаты показали, что каждая из CAR T-клеток, экспрессирующих различные химерные рецепторы антигенов, обладали значительной цитотоксической активностью *in vitro* против ВСМА-положительных клеток K562-ВСМА и RPMI-8226, особенно
25 против клеток RPMI-8226, эндогенно экспрессирующих ВСМА, при почти полном отсутствии цитотоксического действия по отношению к ВСМА-отрицательным клеткам K562 (фиг. 11А).

5. Обработка NOD/ТКИН-мышей после введения В-лимфоцитов периферической крови RPMI-8226 множественной миеломы

30 Клетки RPMI-8226 инокулировали 40 NOD/ТКИН-мышам из расчета $8 \times 10^6 / \text{мышь}$, соответственно. На 12 день после подкожной инокуляции опухолевых клеток средний объем опухоли составлял 75 мм^3 , мышей случайным образом разделили на 4 группы и вводили 1×10^7 CAR T-клеток в хвостовую вену. Перед инъекцией внутривенно вводили циклофосфамид в дозировке 100 мг/кг для предварительного уничтожения
35 остаточных T-клеток у мышей. На 17 день после инъекции CAR T-клеток мышей умерщвляли посредством смещения шейных позвонков.

Анализировали размер опухоли у мышей. Результаты показаны на фиг. 11В. По сравнению с группой UTD, в экспериментальных группах 7A12-28Z, 7A12-BBZ и 7A12-28BBZ отмечен значимый противоопухолевый эффект, и на 17 день после инъекции
40 CAR T-клеток имел место 1 случай регресса опухоли у 7 мышей в экспериментальной группе 7A12-28Z, 2 случая регресса опухоли у 7 мышей в экспериментальной группе 7A12-BBZ и 7 случаев регресса опухоли у 7 мышей в экспериментальной группе 7A12-28BBZ. Частота ингибирования опухолей составляла 84,6% (7A12-28Z), 65,4% (7A12-BBZ) и 100% (7A12-28BBZ), соответственно.

45 Пример 10. Модификация антитела 23F10

В данном примере 23F10 использовали в качестве исходного антитела и модифицировали его посредством фагового дисплея. Фаговую библиотеку сконструировали на основе 23F10 с сохраненными CDR3-областями легкой и тяжелой

цепи, и две фаговые библиотеки сконструировали путем случайного изменения CDR1 и CDR2 легкой цепи или CDR1 и CDR2 тяжелой цепи с использованием вырожденных праймеров, соответственно. Информация о праймерах приведена ниже:

SEQ ID NO	название	Последовательность
49	Праймер LMF	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC
50	Праймер BH1R	TGAGACCCACTCCAGCCCCTTCCCTGGAGCCTGGCGGACCCAMN NMNNMNNMNNMNNMNNMNNAAAGGTGAATCCGGAGGCTG
51	Праймер BH2F	GGCTGGAGTGGGTCTCANNKATTTNNKNNKNNKNNKGGTNNKAC ANNKTACGCAGACTCCCGTGAAGGG
52	Праймер FdR	GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG
53	Праймер BL1R	GATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCTGCTGGTACCAM NNTAAMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNCTGACTGGCCCTGCAAGA G
54	Праймер BL2F	CCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCENNKNNKNNKNNKNNKAGGGCC ACTGGCATCCCAGAC

2.1 Конструирование мутанта 23F10

Матричную плазмиду вначале сконструировали на основе антитела 23F10 (scFv) (SEQ ID NO: 55). Для получения фаговых библиотек случайным образом измененных CDR1 и CDR2 легкой цепи использовали праймеры LMF и BL1R для ПЦР-амплификации фрагмента 1; праймеры BL2F и FdR использовали для ПЦР-амплификации фрагмента 2; затем фрагмент 1 и фрагмент 2 лигировали посредством мостиковой ПЦР, получая полноразмерный scFv, содержащий рандомизированную последовательность, а затем полноразмерный фрагмент гидролизовали с использованием NcoI и NotI и лигировали в идентично гидролизованную матричную плазмиду лигазой T4. Плазмиду трансдуцировали в TG1-компетентные клетки электропорацией, емкость хранения составляла $1,50E+9$. Для получения фаговых библиотек случайным образом измененных CDR1 и CDR2 тяжелой цепи использовали праймеры LMF и BH1R для ПЦР-амплификации фрагмента 3; праймеры BH2F и FdR использовали для ПЦР-амплификации фрагмента 4; затем фрагмент 3 и фрагмент 4 лигировали посредством мостиковой ПЦР, получая полноразмерный scFv, содержащий рандомизированную последовательность, а затем полноразмерный фрагмент гидролизовали с использованием NcoI и NotI и лигировали в идентично гидролизованную матричную плазмиду лигазой T4. Плазмиду трансдуцировали в TG1-компетентные клетки электропорацией, емкость хранения составляла $2,2E+9$.

Скрининг фаговых библиотек. В отношении способа, описанного в примере 3, начальная концентрация антигена BCMA_huFc составляла 20 нМ, и для следующего цикла скрининга выполняли 5-кратное разбавление градиентом. Пэннинг выполняли в течение 2-3 циклов с целью обогащения клонов фагов с scFv, специфически связывавшихся с BCMA_huFc. Положительные клоны определяли стандартными способами твердофазного ИФА BCMA_huFc. Fc-фрагмент человека использовали в качестве неспецифического антигена для твердофазного ИФА с целью проверки специфичности антитела. В общей сложности отобрали 80 клонов, положительных при твердофазном ИФА, константу диссоциации K_d в надосадочной жидкости определяли с использованием *biacore* после повторной индукции. Среди этих клонов было два клона 25C2 и 25D2, K_d которых было в 10 раз ниже, чем у исходного клона 23F10, как показано в следующей таблице:

Клон	Константа диссоциации (K_d, S^{-1})
23F10	3,43E-03
25C2	3,64E-04
25D2	3,74E-04

Легкие цепи клонов 25C2 и 25D2 секвенировали и обнаружили, что они были идентичны 23F10. На фигуре 12 показано сравнение аминокислотных последовательностей тяжелой цепи клонов 25C2, 25D2 и 23F10, причем по сравнению с исходным антителом 23F10 тяжелая цепь клона 25C2 содержала 5 точечных мутаций (SEQ ID NO: 56, 57 представляют собой аминокислотную последовательность и нуклеотидную последовательность вариабельной области тяжелой цепи 25C2, соответственно), CDR1 содержала 2 точечные мутации - замену серина на глицин по 31 положению и тирозина на аспарагин по 32 положению; CDR2 содержала 2 точечные мутации - замену серина на аспарагинил по 54 положению и тирозина на фенилаланин по 59 положению, а каркасная область содержала 1 точечную мутацию - замену серина на глицин по 30 положению. По сравнению с исходным антителом 23F10 тяжелая цепь клона 25D2 содержала 4 точечные мутации (SEQ ID NO: 58, 59 представляют собой аминокислотную последовательность и нуклеотидную последовательность вариабельной области тяжелой цепи 25D2, соответственно), причем область CDR2 содержала 3 точечных мутации - замену серина на глицин по 54 положению, серина на аспарагин по 57 положению и тирозина на фенилаланин по 59 положению, а каркасная область содержала 1 точечную мутацию - замену серина на аргинин по 30 положению.

Последовательность HCDR1 25C2 приведена в SEQ ID NO: 60, а последовательность HCDR2 25C2 приведена в SEQ ID NO: 61. Последовательность HCDR1 25D2 приведена в SEQ ID NO: 62, а последовательность HCDR2 25D2 приведена в SEQ ID NO: 63. Нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность scFv 25C2 приведены в SEQ ID NO: 64, 65, соответственно, а нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность scFv 25D2 приведены в SEQ ID NO: 66, 67, соответственно.

2.2 Экспрессия и очистка клона 25C2, 25D2 (scFv_Fc)

В соответствии с примером 4, соответствующие сайты расщепления и защитные основания внедряли выше VH, и соответствующие сайты расщепления и защитные основания внедряли ниже VL. Продукт ПЦР анализировали электрофорезом в 1% агарозном геле, очищали и выделяли. После гидролиза его лигировали в эукариотический экспрессирующий вектор V152, содержащий Fc-фрагмент человека (приобретенный в Shanghai Ruijin Biotechnology Co., Ltd.), временно трансфицировали в клетки 293F с использованием 293Fectin и экспрессировали.

Агрегацию 25C2 и 25D2 анализировали посредством SEC. Как показано на фиг. 13A и 13B, доля антитела в мономерной форме составляла 91% и 97%, соответственно. По сравнению с исходным антителом 23F10 (30% частота мономеров) частота мономеров увеличилась на 61% и 67%), соответственно, а агрегация значительно снизилась. После концентрирования ультрафильтрацией полученные антитела количественно и качественно анализировали посредством электрофореза в ДСН-ПААГ. Выход составил 80 мкг/мл и 60 мкг/мл, соответственно (выход = масса конечного продукта/объем трансфекции).

2.3 Характеристики связывания клонов 25C2, 25D2

Использовали клетки K562 и K562 (K562-BCMA), стабильно экспрессирующие BCMA

человека, которые собирали, промывали полной ростовой средой и высевали в титрационные микропланшеты с U-образным дном из расчета приблизительно $1-5 \times 10^5$ клеток/лунку. Гибридное антитело scFv_Fc, разбавленное градиентом, инкубировали с K562-BCMA/K562 в течение 30 минут на льду, а затем инкубировали с FITC-меченым антителом против Fc человека в качестве вторичного антитела. После двухэтапной промывки выполняли анализ с использованием Guava easyCyte™ HT System, экспериментальные данные обрабатывали с использованием GraphPad Prism, получая EC50. На фигуре 14 показано связывание 25C2, 25D2 с клетками K562-BCMA и K562. Результаты показали, что EC50 двух клонов, 25C2, 25D2 с улучшенной стабильностью и пониженной агрегацией при связывании с K562-BCMA составляли 2,594 нМ и 1,891 нМ, соответственно, что по сравнению с 23F10 увеличилось в 3-4 раза.

2.5 Определение специфичности клонов 25C2, 25D2

Специфичность антител 23F10, 25C2 и 25D2 анализировали посредством твердофазного ИФА.

2 мкг/мл рекомбинантного BCMA_Fc человека, BCMA_Fc мыши, TACI_huFc (R&D, #174TC), BAFF R (R&D, #1162-BR) иммобилизовали на иммунологических планшетах при 4°C в течение ночи. На следующий день добавляли 300 мкл/лунку 2% MPBS на 2 часа, затем добавляли 200 нМ очищенного антитела (в формате scFv) и инкубировали при 37°C в течение 1 часа, трижды промывали PBST (PBS, содержащим 0,05% твин-20) и трижды промывали PBS. Затем добавляли разбавленное в соотношении 1:4000 ПХ-меченого антитела против маркера Flag (sigma, #A8592-1MG), инкубировали в течение 1 ч при 37°C, трижды промывали PBST (PBS, содержащим 0,05%) твин-20) и трижды промывали PBS. Добавляли 100 мкл/лунку субстрата TMBS; окрашивание развивалось в течение 10-15 минут. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2 М серной кислоты.

Результаты показаны на фиг. 14В, причем антитела 7A12, 23F10, 25C2, 25D2 специфически связывались с BCMA человека и не связывали TACI человека и BAFF R человека. Среди них связывание антител 25C2, 25D2 с BCMA мыши было более слабым.

Пример 11. Получение 25C2, 25D2 CAR Т-клеток

В соответствии с процедурой, описанной в примере 8, сконструировали плазмиды химерного рецептора антигена на основе 25C2, 25D2, соответственно.

а. Конструирование плазмиды для химерного рецептора антигена на основе 25C2

Лентивирусную плазмиду PRRLSFN-cPPT.EF-1 α -25C2-BBZ, экспрессирующую химерный рецептор антигена второго поколения на основе антитела 25C2, сконструировали с использованием PRRLSIN-cPPT.EF-1 α в качестве вектора.

Лентивирусную плазмиду PRRLSFN-cPPT.EF-1 α -25D2-BBZ, экспрессирующую химерный рецептор антигена второго поколения на основе антитела 25D2, сконструировали с использованием PRRLSIN-cPPT.EF-1 α в качестве вектора.

Последовательность 25C2-BBZ состоит из сигнального пептида CD8 α (SEQ ID NO: 23), scFv 25C2 (SEQ ID NO: 64), шарнира CD8 (SEQ ID NO: 25), трансмембранной области (SEQ ID NO: 33), внутриклеточного сигнального домена CD137 (SEQ ID NO: 35) и CD3 ξ (SEQ ID NO: 31).

Последовательность 25D2-BBZ состоит из сигнального пептида CD8 α (SEQ ID NO: 23), scFv 25D2 (SEQ ID NO: 66), шарнира CD8 (SEQ ID NO: 25), трансмембранной области (SEQ ID NO: 33), внутриклеточного сигнального домена CD137 (SEQ ID NO: 35) и CD3 ξ (SEQ ID NO: 31).

В соответствии с процедурой, описанной в примере 9, плазмиды PRRLSIN-cPPT.EF-1 α -25C2-BBZ, PRRLSIN-cPPT.EF-1 α -25D2-BBZ подвергали упаковке лентивируса, инфекции Т-клеток и амплификации, соответственно, получая Т-клетки 25C2-BBZ и

25D2-BBZ, модифицированные химерным рецептором антигена.

Пример 12. Получение CAR Т-клеток, экспрессирующих растворимый PD1

В данном примере получали CAR-Т-клетки, экспрессирующие растворимый PD1, с использованием scFv антитела 7A12. Способ получения описан ниже:

1. Последовательность сигнального пептида PD-1 (SEQ ID NO: 68), последовательность внеклеточного сегмента PD-1 (SEQ ID NO: 69) и последовательность CH3 (SEQ ID NO: 70) синтезировали и клонировали в Т-вектор, получая плазмиду Т-sPD1-Fc.

Используя плазмиду Т-sPD1-Fc в качестве матрицы, верхний праймер 5'-acgcgtcctagcgtaccggctgccaccatgcagatccacagggcggc-3' (SEQ ID NO: 71) и нижний праймер 5'-ctctcggggctgccaccatacaccagggtttggactggc-3' (SEQ ID NO: 72) использовали для ПЦР-амплификации, получая последовательность sPD1; а верхний праймер 5'-tatggtgggcagcccgagagccacag-3' (SEQ ID NO: 73) и нижний праймер 5'-aaaattcaaaagtctgtttcactttaccggagacagggag-3' (SEQ ID NO: 74) использовали при амплификации, получая sPD1-CH3-фрагмент.

sPD1-CH3-фрагмент и фрагмент 7A12-BBZ (SEQ ID NO: 75) подвергали ПЦР-сплайсингу и амплифицировали, получая sPD1-CH3-7A12-BBZ, причем последовательность 7A12-BBZ состояла из сигнального пептида CD8 α (SEQ ID NO: 23), scFv 7A12 (SEQ ID NO: 47), шарнира CD8 (SEQ ID NO: 25), трансмембранной области (SEQ ID NO: 33), внутриклеточного сигнального домена CD137 (SEQ ID NO: 35) и CD3 ξ (SEQ ID NO: 31).

Вышеупомянутый сконструированный фрагмент sPD1-CH3-7A12-BBZ содержал сайт расщепления MluI на 5'-конце и сайт расщепления SalI на 3'-конце, которые дважды гидролизовали MluI и SalI и лигировали в идентично дважды гидролизованный вектор PRRLSIN-cPPT.EF-1 α , получая плазмиду, экспрессирующую белок sPD-1-CH3 и химерный рецептор антигена, нацеленного на BCMA.

В соответствии с процедурой, описанной в примере 9, получили Т-клетки SPD-1-7A12-BBZ, экспрессирующие sPD1 и 7A12-BBZ.

Пример 13. Эксперимент по уничтожению клеток *in vitro*

Эксперименты по уничтожению клеток *in vitro* выполняли с использованием Т-клеток 25C2-BBZ, Т-клеток 25D2-BBZ, Т-клеток 7A12-BBZ, Т-клеток C11D5.3-BBZ и Т-клеток sPD-1-7A12-BBZ в качестве эффекторных клеток, среди которых C11D5.3-BBZ (SEQ ID NO: 87) содержали CAR второго поколения, полученный с использованием антитела C11D5.3 мыши против BCMA (см. CN 201580073309.6). Клетки-мишени представляли собой клетки миеломы человека NCI-H929 и В лимфоциты периферической крови множественной миеломы RPMI-8226.

Набор для анализа цитотоксичности без использования радиоактивных материалов CytoTox 96 (Promega) использовали в соответствии с инструкциями к набору для анализа цитотоксичности без использования радиоактивных материалов CytoTox 96.

Эффекторные клетки инокулировали в 96-луночные планшеты в соотношении «эффекторные клетки: клетки-мишени» 3:1, 1:1 или 1:3, и в соответствующие 96-луночные планшеты инокулировали 50 мкл 2 \times 10⁵/мл клеток NCI-H929 и RPMI-8226.

Для каждой группы задали лунки в пяти повторностях, планшеты инкубировали в инкубаторе в течение 18 ч.

Экспериментальные группы и контрольные группы задали следующим образом: экспериментальная группа: каждая клетка-мишень + Т-лимфоциты, экспрессирующие различные химерные рецепторы антигенов; контрольная группа 1: максимальное высвобождение ЛДГ из клеток-мишеней; контрольная группа 2: спонтанное

высвобождение ЛДГ из клеток-мишеней; контрольная группа 3: спонтанное высвобождение ЛДГ из эффекторных клеток. Формула для расчета представляла собой:

$$\% \text{ цитотоксичности} = \frac{[\text{экспериментальная группа} - \text{группа спонтанного высвобождения из эффекторных клеток} - \text{группа спонтанного высвобождения из клеток-мишеней}]}{(\text{максимум для клеток-мишеней} - \text{спонтанное высвобождение из клеток-мишеней})} * 100.$$

Результаты эксперимента по уничтожению клеток показаны на фигуре 15.

Пример 14. Эксперимент по уничтожению клеток *in vivo* у мышей

8×10^6 клеток RPMI-8226 подкожно инокулировали в область правого гребня подвздошной кости мышей B-NDG, и на 18 день средний объем опухоли составлял приблизительно 243 мм^3 ; таким образом, получили модель подкожного ксенотрансплантата у мышей B-NDG с B-лимфоцитами периферической крови множественной миеломы RPMI-8226.

Мышей с модельными подкожными ксенотрансплантатами разделили на 3 группы (по 4 в каждой группе) и вводили им 25C2-BBZ, 25D2-BBZ и нетрансфицированные Т-клетки (UTD) в дозе 5×10^6 , соответственно. Результаты показаны в следующей таблице. На 32 день и 36 день после инокуляции опухолевых клеток у всех 4 мышей в экспериментальных группах 25C2-BBZ и 25D2-BBZ наблюдали регресс опухолей.

Доза CAR T: 5×10^6	Без рака					
	Дней после инокуляции опухолевых клеток					
	День 25	День 29	День 32	День 36	День 39	День 42
UTD	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
25C2-BBZ	1/4	2/4	4/4	4/4	4/4	4/4
25D2-BBZ	0/4	1/4	3/4	4/4	4/4	4/4

Мышей с модельными подкожными ксенотрансплантатами разделили на 3 группы (по 4 в каждой группе) и вводили им 25C2-BBZ, 25D2-BBZ, C11D5.3-BBZ, 7A12-BBZ и нетрансфицированные Т-клетки (UTD) в дозе 1×10^6 CAR T-клеток на инъекцию. Регресс опухоли показан в следующей таблице и на фигуре 16.

Доза CAR T: 1×10^6	Без рака						
	Дней после инокуляции опухолевых клеток						
	День 29	День 32	День 36	День 39	День 42	День 45	День 49
UTD	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
25C2-BBZ	1/4	2/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4
25D2-BBZ	0/4	0/4	1/4	1/4	1/4	1/4	2/4
C11D5.3-BBZ	0/4	1/4	1/4	2/4	3/4	3/4	3/4
7A12-BBZ	0/4	0/4	0/4	1/4	2/4	2/4	2/4

Все документы, упомянутые в настоящей заявке, полностью включены в настоящий документ посредством ссылок, как если бы каждый документ был отдельно упомянут в качестве ссылки. Кроме того, следует понимать, что специалист в данной области техники после прочтения вышеуказанной информации о настоящем изобретении может внести различные модификации и изменения, и эти эквивалентные формы также будут входить в рамки настоящего изобретения, заданные прилагаемой формулой изобретения.

Список последовательностей

SEQ ID NO	название	Последовательность
1	HCDR1 7A12, 7G2, 23F10	SYAMS
2	HCDR2 7A12, 7G2, 23F10	AISGSGGSTYYADSVKG
3	HCDR3 7A12	YPYLAFDY
4	HCDR3 7G2	LSGDAAMDY
5	HCDR3 23F10	VRPFWGTFDY
6	LCDR1 7A12, 7G2, 23F10	RASQSVSSSYLA
7	LCDR2 7A12, 7G2, 23F10	GASSRAT
8	LCDR3 7A12	QQYGYPPSY
9	LCDR3 7G2	QQYGYPPRY
10	LCDR3 23F10	QQYFNPPEY
11	Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 7A12	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPPSYTFGGGTKVEIK
12	Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи 7A12	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTACGGTTACCCACCATCTTACACGTTCCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA
13	Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 7A12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARYPYLAFDYWGQGLTVTVSS
14	Нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 7A12	GAGGTGCAATTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAA TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGCGTTACCCATACCTGGCATTGACTACTGGGGCCAAGGAAC CCTGGTCAACCGTCTCGAGT
15	Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 7G2	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGYPPRYTFGGGTKVEIK
16	Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи 7G2	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTACGGTTACCCACCAAGATACACGTTCCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA

5

10

15

20

25

30

35

40

45

17	Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 7G2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGS TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLSGDAAMDYWGQGL VTVSS
18	Нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 7G2	GAGGTGCAATTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTC CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTG GTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAA TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC GTATATTACTGTGCGAAACTGTCTGGTGTATGCAGCAATGGACTACTGGGGCCAAG GAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT
19	Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 23F10	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYFPPEYTFGQGTKVEIK
20	Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи 23F10	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCGTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGC CACCCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACC AGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGC CACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACTCTC ACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTACTT CAACCCACCAGAATACACGTTCCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA
21	Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 23F10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGS TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVRPFWGTFDYWGQGL LTVSS
22	Нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 23F10	GAGGTGCAATTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTC CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTG GTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAA TTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC GTATATTACTGTGCGAAAGTTCGTCCATTCTGGGGTACTTTCGACTACTGGGGCCA AGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT
23	Аминокислотная последовательность сигнального пептида CD8 α	Malpvtlllpalllhaarp
24	Нуклеотидная последовательность сигнального пептида CD8 α	atggccttaccagtgaccgctgtcctcgcgctggccttgcctccacgcccagggccg
25	Аминокислотная последовательность шарнира CD8	Ttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacd
26	Нуклеотидная последовательность шарнира CD8	Acccagcgcagcgcgaccaccaacacccggcggccaccatcgctcgagcccctgtccctcgcccagaggcgtgcc ggccagcggcgggggcgagtgacacagggggcctggacttcctgtgat

5

10

15

20

25

30

35

40

45

27	Аминокислотная последовательность трансмембранной области CD28	Fwvlvvvgvlacysllvtvafiifwv
28	Нуклеотидная последовательность трансмембранной области CD28	tttgggtgctgggtgggtgggtggagtcctggctgctatagctgctagtaacagtgcccttatttctgggtg
29	Аминокислотная последовательность внутриклеточной области CD28	Rskrsrllhsdymnmtprrpgptrkhyqpyapprdfaayrs
30	Нуклеотидная последовательность внутриклеточной области CD28	Aggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgcccccgggccaaccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgactcgcagcctatcgctcc
31	Аминокислотная последовательность домена CD3Z	Rvkfsrsadapayqqgnqlynelnlgrreeydvldkrrrdpemmkgkprknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr
32	Нуклеотидная последовательность домена CD3Z	AgagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaaccagcaggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtagatgtttGgacaagagacgtggccgggacctgagatgggggaaagccgcagagaaggagaaccctcaggaagcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcGgaggcctacagtgagaltgggatgaaagccgagcgggagggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacagcccttcacatgaggccctgcccctcgc
33	Аминокислотная последовательность трансмембранной области CD8	Iyiwaplagtegvllslvit
34	Нуклеотидная последовательность трансмембранной области CD8	Atctacatctggcgcccttgccgggacttggggtccttctctgtcactggttacc
35	Аминокислотная последовательность внутриклеточной области CD137	Krgrkklliyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfeeeeggcel
36	Нуклеотидная последовательность внутриклеточной области CD137	Aaacggggcagaagaactcctgtatatattcaaacaccattatgagaccagtacaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgattccagaagaagaaggaggatgtgaactg

5
10
15
20
25
30
35
40
45

37	Аминокислотная последовательность ВСМА	MLQMA GQCSQNEYFDSLHLHACIPCLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGTNAILW TCLGLSLIISLAVFVLMFLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLEKSRGTGDEIILPR GLE YTVVEECTCEDCIKSKPKVDSHCFPLPAMEEGATILVTTKNDYCKSLPAALSAT EIEKSISAR
38	Внеклеточный сегмент Met1-Ala54 ВСМА человека	Mlqmagqcsqneyfdsllhacipclrcssntppltcqrycnasvtnsvkgtna
39	Нуклеотидная последовательность внеклеточного сегмента Met1-Ala54 ВСМА человека	Atgctgcagatggccggccagtgcagccagaacgagtagctcgacagcctgctgcacgctgcatccctgccagctgcggtgca gcagcaaccacccccctgacctgccagcggtagctgcaaacgccagcgtgaccaaacgctgaaggccaccaaccgc
40	ВСМА_huFc	Mlqmagqcsqneyfdsllhacipclrcssntppltcqrycnasvtnsvkgtnagsdkthtppcpapellggpsvflfppkpk dtlmiisrtpevtcvvvdvshEdpevkfnwyvdyvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalp apiektiskakgqprepqvylppsrdeltnqvsllwclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgfflyskltvdk srwqqnfvscsmhealhnhytqkslslspgk
41	Нуклеотидная последовательность ВСМА_huFc	Atgctgcagatggccggccagtgcagccagaacgagtagctcgacagcctgctgcacgctgcatccctgccagctgcggtgca gcagcaaccacccccctGacctgccagcggtagctgcaaacgccagcgtgaccaaacagcgtgaaggccaccaaccgctgac gcaaaaactcacacatgccaccgctgccagcactgaaCtctgggggggacgctgactctctctcccccacaaacccaagg acaccctcatgatctccggaccctcaggctcactcgtggtggtggacgtagaccagaAgacctgaggtcaagtcaactg gtacgtggacggcgtggaggtgcalaafgccaagaacagccgggaggagcagtaacaacagcacgtaccgtggtcagCg tctcaccgctcctgaccaggactggctgaatggcaaggagtagcaaggtctccaaacaaagcctccagccccatcga gaaaacctctcaaacgcaAaggggcagccccgagaaccacaggtgacacccctgcccctccgggtagctgaccaaga accaggtcagcctgtgctgctgctcaaaagcttctatccagCgacatcgcctggagtgaggagagcaatggcagccggaga acaactacaagaccagcctcccgctgctggactccgacggctcctctctctatagcaagctcaCctgggacaagagcaggtgg cagcaggggagcgtctctcctcctcctgtagcagggctctgcacaaccactacagcagaagagcctcctcctgctccgggt aaa
42	ВСМА_muFс	Mlqmagqcsqneyfdsllhacipclrcssntppltcqrycnasvtnsvkgtnagsrdcgkpcictvpevsvfifppkpkdv ltitltpkvtcvvvdiskddpevQfswfvddvevhtaqtqpreeqfnstfrsvselpimhqdwlngkfekrvnsaafpapiekt isktkgrpkapqvvtippkqemakdkvsltcmidffpeditvewqwnqpaenykntqpimdtgdsyfyvsklnvqksn weagntftcsvlhelghnhhtekslshspgk
43	Нуклеотидная последовательность ВСМА_muFс	Atgctgcagatggccggccagtgcagccagaacgagtagctcgacagcctgctgcacgctgcatccctgccagctgcggtgca gcagcaaccacccccCacctgacctgccagcggtagctgcaaacgccagcgtgaccaaacagcgtgaaggccaccaaccgctgac agggattgtggtgtaagcctgcatatgtacAgtcccagaagtagctctctctctctcccccacaaagccaaggatgctcacc cattactctgactcctaaggtcagctgctgctgtagacatcagaagGatgatcccgaggtccagttcagctgctttagatgatg tggaggtgcacacagctcagacgcaaccggggaggagcagttcaacagcacttccgctcagTcagtgactlccatcatgca ccaggactggctcaafggcaaggagttcaaalgcagggtcaacagtcagcttccctgccccatcgagaaaacactctccAaaa ccaaaggcagaccgaaggtccacaggtgtagaccattccacctccaaaggagcagatggccaagataaagttagctgacctg catgataacagacTtctccctgaagacattactgtagtgtagctggaatgggagccagcggagagaactcaagaacactcag ccccatcatgacacagatgctcttactcgtctAcagcaagctcaatgtcagaagagcaactgggagagcaggaataacttacc tgcctgctgctacatgaggccctgcacaaccaccatactgagaaggcctcctccactctcctgtaaa
44	Нуклеотидная последовательность ВСМА человека с внедренными сайтами рестрикции MluI, SalI	Acgctgctcagcctaccggtccaccatggtgtagatggctggcagctgctcccaaatgaaatattgacagttgtgcatgctt gcatacctgtcaactctgAtgttcttataactcctcctcaacatgtagcgtattgtaatgcaagtgtagcaaatcagtgaaagg aacgaatgcattctcggaccctgttgggactgagcttAataatftcttggcagtttctgctaatgcttctgtaaggagataaact ctgaaccaltaaaggacaggttlaaaaaacacaggatcaggctcctgggcatgctaaCattgacctggaaaagagcaggaactggt gatgaaattattctccagaggcctcagatgacagctgggaaagatgcacctgtgaaagctcactcaagagcaaacgAaggtcg actctgaccaltgcttccaactccagctalggaggagggcgaaccattctgacaccagaaaacgaatgactattgcaagagcct gccagctgctttagtgtagcagggatagagaatcaattctgtaggtaagtgcac
45	APRIL_huFc	Hsvlhlpinatksdsvtevmwqpalrrgrlqaqgyvriqdaqvyllysvlfqdvftimgqvsvregqqrqetlfrirs mpshpdraynscysagVfhlhqgdilsviipraraklnlshphtflgfvklgsdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlm isrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdyvevhnAktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapie ktiskakgqprepqvylppsrdeltnqvsllwclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgfflyskltvdk srwqqnfvscsmhealhnhytqkslslspgk
46	Нуклеотидная последовательность APRIL_huFc	Cacagcgtgctgcacctgggccatcaacgccaccagcaaggacgacagcagcgtgaccgaggtgatggcagcccgcct gcggcggggccgggacctgcagcccagggctacggcgtgaggatccagagaccggcgtgactgctgacagccaggtg ctgttcaggacgtgacctaccatggccaggtggtgagccggaggggccaggccggcaggagacctgttccggtgcatc cggagcaltccagccaccccgaggcctacaacagctgctacagcggcggctgctccactgcaaccgggacagactcgtg agcgtgatcatcccggggccgggccaagctgaacctgagccccacggcacttctgggctctgtaagctgggatccgaca aaactcacacatgccaccgtgccagcactgaaactcctggggggacccgtcagctctcctctcccccaaaacccaaggaccc ctcatgatctccggaccctgaggtcactgctggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactgtagct ggacggcgtggaggtgataafgccaagacaagccggggaggagcagtagcaaacagcactcctgctggtgtagcgtcctac cgtcctgaccaggactggctgaatggcaaggatgacaagtgcaaggtctcaacaagaacccctccagccccatcgagaaaac atctccaaagccaaggcagccccagaaaccaaggtgtagccctgccccatccgggtagctgacccaagaacaggctc agcctgtggtgctgctgcaaaagcttctatccagcagatcgccgtggagtgaggagagcaatgggagcgggagaaacactaca agaccaagcctccgctgctggactccagcagctcctctctctatagcaagctcaccctggacaagagcaggtggcagcaggg gaacgtctctcatgctcctgtagcagaggctctgcacaaccctacagcagaagagcctcctcctgctcgggtgaaa

47	scFv 7A12	EvqllesggglvqpqgsrlrLscaasgflfssyamswvrqapgkglewvsaisgggstyyadsvkgrftisrdnsknlylqmnslraedtavyyaryplafDywgqgtlvtvssgggsgggsggggseiVltqspgtlslspgeratlscrasqsvsyylawyqqkpgqaprlliyassratgipdrfsgsgsgtdfltlisrlepedfavyycqqyynpptytfggqtkveikr
48	scFv 7G2	EvqllesggglvqpqgsrlrLscaasgflfssyamswvrqapgkglewvsaisgggstyyadsvkgrftisrdnsknlylqmnslraedtavyyaklsgdaAmydwqgtlvtvssgggsgggsggggseiVltqspgtlslspgeratlscrasqsvsyylawyqqkpgqaprlliyassratgipdrfsgsgsgtdfltlisrlepedfavyycqqyynpptytfggqtkveikr
49	Праймер LMF	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC
50	Праймер ВН1R	TGAGACCCACTCCAGCCCCCTCCCTGGAGCCTGGCGGACCCAMNNMNNMNNMNNMNNMNNAAAGGTGAATCCGGAGGCTG
51	Праймер ВН2F	GGCTGGAGTGGGTCTCANNKATNNKNNKNNKNNKGGTNNKACANNKTACGCAGACTCCGTGAAGGG
52	Праймер FdR	GACGTTAGTAAATGAATTTCTGTATGAGG
53	Праймер BL1R	GATGAGGAGCCTGGGAGCCTGGCCAGGTTTCTGCTGGTACCAMNNATAAMNNMNNMNNMNNMNNMNNCTGACTGGCCCAGAG
54	Праймер BL2F	CCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCNNKNNKNNKNNKAGGGCCACTGGCATCCCA GAC
55	scFv 23F10	EvqllesggglvqpqgsrlrLscaasgflfssyamswvrqapgkglewvsaisgggstyyadsvkgrftisrdnsknlylqmnslraedtavyyakvrpfwgtdywgqgtlvtvssgggsgggsggggseiVltqspgtlslspgeratlscrasqsvsyylawyqqkpgqaprlliyassratgipdrfsgsgsgtdfltlisrlepedfavyycqqyynpptytfggqtkveikr
56	VH(AK) 25C2	evqllesggglvqpqgsrlrLscaasgflfgnamswvrqapgkglewvsaisgggstyyadsvkgrftisrdnsknlylqmnslraedtavyyakvrpfwgtdywgqgtlvtvss
57	VH 25C2	gaggtgcaattgctggagctctggggaggcttggtacagcctggggggtccctgagactctctgtgcagcctccggattcaccttggcggtaatgccatgtcctgggtccgaggtccaggaaagggctggagtggtctcagcaattagggtaatgggtgttagtacctacgcagactcctgaaggccggttaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtactgcagatgaacagcctgag agccgaggacacggccgtatattactgtcgaaagtctccattctgggtactttcactactggggccaaggaacctggtcac cgtctcgagt
58	VH(AK) 25D2	evqllesggglvqpqgsrlrLscaasgflfssyamswvrqapgkglewvsaisgggstyyadsvkgrftisrdnsknlylqmnslraedtavyyakvrpfwgtdywgqgtlvtvss
59	VH 25D2	gaggtgcaattgctggagctctggggaggcttggtacagcctggggggtccctgagactctctgtgcagcctccggattcacctt aggagctatgccatgagctgggtccgaggtcctcaggaaagggctggagtggtctcagctattaggccggtgggtgaaca cattctacgcagactccgtgaaggccggttaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtactgcagatgaacagcctga gagccgaggacacggccgtatattactgtcgaaagtctccattctgggtactttcactactggggccaaggaacctggtca cctctcgagt
60	HCDR1 25C2	gnams
61	HCDR2 25C2	aisnggstfyadsvkg
62	HCDR1 25D2	syams
63	HCDR2 25D2	aisgggntfyadsvkg
64	scFv 25C2	gaggtgcaattgctggagctctggggaggcttggtacagcctggggggtccctgagactctctgtgcagcctccggattcacctt ggcggtaatgccatgtcctgggtccgaggtccaggaaagggctggagtggtctcagcaattagggtaatgggtgttagtacctacgcagactcctgaaggccggttaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtactgcagatgaacagcctgag agccgaggacacggccgtatattactgtcgaaagtctccattctgggtactttcactactggggccaaggaacctggtcac cgtctcgagtggtggaggcggttaccagggaggtggtctggcggtggcagctcggaaatcgtgtaacacagctctccaggacc cgtctttgtcctcaggggaagagccacctcttgcaggccagtcagagtgtagcagcagctactttagcctgtaccagcag aaacctggccaggtcctccaggtctctcattgagcattccagcaggccactggcatccagacaggttcagtgagctggatc cgggacagacttactctaccatcagcagactggagctgaaagatlttgcagtgatattactgtcagcagacttcaaccaccagaa tacacttcggccagggaccaaagtggaatcaaacgt
65	scFv 25C2 (AK)	evqllesggglvqpqgsrlrLscaasgflfgnamswvrqapgkglewvsaisgggstyyadsvkgrftisrdnsknlylqmnslraedtavyyakvrpfwgtdywgqgtlvtvssgggsgggsggggseiVltqspgtlslspgeratlscrasqsvsyylawyqqkpgqaprlliyassratgipdrfsgsgsgtdfltlisrlepedfavyycqqyynpptytfggqtkveikr
66	scFv 25D2	gaggtgcaattgctggagctctggggaggcttggtacagcctggggggtccctgagactctctgtgcagcctccggattcacctt aggagctatgccatgagctgggtccgaggtcctcaggaaagggctggagtggtctcagctattaggccggtgggtgaaca cattctacgcagactcctgaaggccggttaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtactgcagatgaacagcctga gagccgaggacacggccgtatattactgtcgaaagtctccattctgggtactttcactactggggccaaggaacctggtca cctctcagtggtggaggcggttaccagggaggtggtctggcggtggcagctcggaaatcgtgtaacacagctcctcaggcac cgtctttgtcctcaggggaagagccacctcttgcaggccagtcagagtgtagcagcagctactttagcctgtaccagcag gaaacctggccaggtcctccaggtctctcattgagcattccagcaggccactggcatccagacaggttcagtgagctgga lccgggacagacttactctaccatcagcagactggagcctgaagatlttgcagtgatattactgtcagcagacttcaaccaccag aatacacttcggccagggaccaaagtggaaatcaaacgt
67	scFv 25D2 (AK)	evqllesggglvqpqgsrlrLscaasgflfssyamswvrqapgkglewvsaisgggstyyadsvkgrftisrdnsknlylqmnslraedtavyyakvrpfwgtdywgqgtlvtvssgggsgggsggggseiVltqspgtlslspgeratlscrasqsvsyylawyqqkpgqaprlliyassratgipdrfsgsgsgtdfltlisrlepedfavyycqqyynpptytfggqtkveikr
68	Последовательность сигнального пептида PD-1	ATGCAGATCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCCTGGGCGGTGCTACAACCTGGGCTGGCGG

5	69	Последовательность внкслточно го сегмента PD -1	CCAGGATGGTCTTAGACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCACCTTCTCCCC AGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAAACGCCACCTTACCTGCAGCTTCTCCA ACACATCGGAGAGCTTCTGTGCTAAACTGGTACCGCATGAGCCCCAGCAACCGAGC GGACAAGCTGGCCGCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCGGCCAGGACTGCCGC TTCCGTGTACACAACCTGCCAACCGGGCGTGACTIONTCCACATGAGCGTGGTACAGG CCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCAA GGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGC AGAAGTGCCACAGCCACCCAGCCCCACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAA ACCTGGTG
10	70	Последовательность ДНК домена СН3	CCCCATGCCACCATGCCAGCACCTGAGTTCTCGGGGGACCATCAGTCTTCTCT GTTCCCCCAAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGT GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCACGTTCAACTGGTACGT GGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAA CAGCACGTACCGTGTGGTACGCTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAAC GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCCTCCCGTCC
	71	праймер	acgctcctagcgtaccggctcgccaccatgcagatccccacaggcgccc
	72	Праймер	ctctcgggctcccaccatacaccagggttggaactgac
	73	Праймер	tatggggcagccccagagccacag
	74	праймер	aaaattcaagctctttcactttaccggagacagggag
15	75	7A12-BBZ	Evqllesggglvqpggsrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisggstyyadsvkgrftisrdnsntlylqmn sraedtavyyacarypylafDywgqgtlvtvssggsgggsgggsgggscivltqspgtlslsperatlsrasqsvssylaw yqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltsrlepedfavyyccqygyppsytfqgkveikrTTTPAPRPP PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAAPLGTGCVLLLSLVTLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGDHGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
20	76	25C2-BBZ	evqllesggglvqpggsrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisggstyyadsvkgrftisrdnsntlylqmn sraedtavyyacarypylafDywgqgtlvtvssggsgggsgggsgggscivltqspgtlslsperatlsrasqsvssylaw yqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltsrlepedfavyyccqygnppeytfqgkveikrTTTPAPRPP PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAAPLGTGCVLLLSLVTLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGDHGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
25	77	25D2-BBZ	evqllesggglvqpggsrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisggstyyadsvkgrftisrdnsntlylqmn sraedtavyyacarypylafDywgqgtlvtvssggsgggsgggsgggscivltqspgtlslsperatlsrasqsvssylaw yqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltsrlepedfavyyccqygnppeytfqgkveikrTTTPAPRPP PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAAPLGTGCVLLLSLVTLYC KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGDHGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
30	78	7G2-BBZ	Evqllesggglvqpggsrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisggstyyadsvkgrftisrdnsntlylqmn sraedtavyyacarypylafDywgqgtlvtvssggsgggsgggsgggscivltqspgtlslsperatlsrasqsvssyla wyqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltsrlepedfavyyccqygyppsytfqgkveikrTTTPAPRPP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAAPLGTGCVLLLSLVTLYC YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYK QQQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGDHGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
35	79	7A12-28Z	Evqllesggglvqpggsrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisggstyyadsvkgrftisrdnsntlylqmn sraedtavyyacarypylafDywgqgtlvtvssggsgggsgggsgggscivltqspgtlslsperatlsrasqsvssylaw yqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltsrlepedfavyyccqygyppsytfqgkveikrTTTPAPRPP PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLLVVGGLVACYSLLVTVAFI IFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPA YQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGDHGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
40	80	7A12-28BB Z	Evqllesggglvqpggsrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisggstyyadsvkgrftisrdnsntlylqmn sraedtavyyacarypylafDywgqgtlvtvssggsgggsgggsgggscivltqspgtlslsperatlsrasqsvssylaw yqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltsrlepedfavyyccqygyppsytfqgkveikrTTTPAPRPP PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLLVVGGLVACYSLLVTVAFI IFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGDHGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
45	81	7G2-28Z	Evqllesggglvqpggsrlscaasgftfssyamswvrqapgkglewvsaisggstyyadsvkgrftisrdnsntlylqmn sraedtavyyacarypylafDywgqgtlvtvssggsgggsgggsgggscivltqspgtlslsperatlsrasqsvssyla wyqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltsrlepedfavyyccqygyppsytfqgkveikrTTTPAPRPP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLLVVGGLVACYSLLVTVAFI AFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADA PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDHGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

Список последовательностей

- <110> CARSGEN THERAPEUTICS CO., LTD.
- <120> АНТИТЕЛО, НАЦЕЛЕННОЕ НА ВСМА, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ
- <130> P2018-0137
- <150> CN201710058581.8

<151> 23.01.2017
<150> CN201710920346.7
<151> 30.09.2017
<160> 87
5 <170> Версия PatentIn 3.5
<210> 1
<211> 5
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
10 <220>
<223> HCDR1 7A12, 7G2, 23F10
<400> 1
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5
15 <210> 2
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
20 <223> HCDR1 7A12, 7G2, 23F10
<400> 2
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
25 <210> 3
<211> 8
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
30 <223> HCDR3 7A12
<400> 3
Tyr Pro Tyr Leu Ala Phe Asp Tyr
1 5
<210> 4
35 <211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> HCDR3 7G2
40 <400> 4
Leu Ser Gly Asp Ala Ala Met Asp Tyr
1 5
<210> 5
<211> 10
45 <212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> HCDR3 23F10

<400> 5
Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 6
5 <211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> LCDR1 7A12, 7G2, 23F10
10 <400> 6
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10
<210> 7
<211> 7
15 <212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> LCDR2 7A12, 7G2, 23F10
<400> 7
20 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5
<210> 8
<211> 9
<212> БЕЛОК
25 <213> Искусственная последовательность
<220>
<223> LCDR3 7A12
<400> 8
Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Ser Tyr
30 1 5
<210> 9
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
35 <220>
<223> LCDR3 7G2
<400> 9
Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro Arg Tyr
1 5
40 <210> 10
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность
<220>
45 <223> LCDR3 23F10
<400> 10
Gln Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Glu Tyr
1 5

<210> 11
 <211> 109
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 7A12
 <400> 11
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 10 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 15 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
 85 90 95
 20 Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 12
 <211> 327
 <212> ДНК
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи 7A12
 <400> 12
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 30 ctctcttgca gggccagtca gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtacggtt acccaccatc ttacacgttc 300
 ggccagggga csaagtgg aatcaaa 327
 35 <210> 13
 <211> 117
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <223> Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 7A12
 <400> 13
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 45 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 5 85 90 95
 Ala Arg Tyr Pro Tyr Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 10 <210> 14
 <211> 351
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <223> Нуклеотидная последовательность вариabельной области тяжелой цепи 7A12
 <400> 14
 gaggtgcaat tgctggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 20 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gcgttaccca 300
 tacctggcat tcgactactg gggccaagga accctggtca ccgtctcgag t 351
 <210> 15
 <211> 109
 25 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность вариabельной области легкой цепи 7G2
 <400> 15
 30 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 40 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Tyr Pro Pro
 85 90 95
 Arg Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 16
 45 <211> 327
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи 7G2
 <400> 16
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 5 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtacggtt accaccaag atacacgttc 300
 gggcagggga ccaaagtgga aatcaaaa 327
 <210> 17
 10 <211> 118
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 7G2
 15 <400> 17
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 20 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 25 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Leu Ser Gly Asp Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 30 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 18
 <211> 354
 <212> ДНК
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 7G2
 <400> 18
 gaggtgcaat tgctggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 40 tcctgtgcag cctccggatt caccttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtgtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaactgtct 300
 ggtgatgcag caatggacta ctggggccaa ggaaccctgg tcaccgtctc gagt 354
 45 <210> 19
 <211> 109
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 23F10
 <400> 19
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 5 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 10 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Phe Asn Pro Pro
 15 85 90 95
 Glu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 20
 <211> 327
 20 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи 23F10
 <400> 20
 25 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtca gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtacttca acccaccaga atacacgttc 300
 30 gggcagggga ccaaagtgga aatcaaaa 327
 <210> 21
 <211> 119
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 23F10
 <400> 21
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 40 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 45 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 115
 <210> 22
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <223> Нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 23F10
 <400> 22
 gaggtgcaat tgctggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 15 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagtctgt 300
 ccattctggg gtactttcga ctactggggc caaggaaccs tggtcaccgt ctcgagt 357
 <210> 23
 20 <211> 21
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность сигнального пептида CD8-альфа
 25 <400> 23
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro
 20
 30 <210> 24
 <211> 63
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <223> Нуклеотидная последовательность сигнального пептида CD8-альфа
 <400> 24
 atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cggccagg 60
 ccg 63
 <210> 25
 40 <211> 45
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность шарнира CD8
 45 <400> 25
 Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

20 25 30
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 35 40 45
 <210> 26
 5 <211> 135
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Нуклеотидная последовательность шарнира CD8
 10 <400> 26
 ассасгасгс сагсгссгсг ассассааса ссггсгссса ссатсгсгтс гсгсгссстг 60
 тссстгсгсс сагаггсгтг ссггссасгсг гсггггггсг сгтгсасас гagggggctg 120
 гacttcgcct gtgat 135
 <210> 27
 15 <211> 27
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность трансмембранной области CD28
 20 <400> 27
 Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
 20 25
 25 <210> 28
 <211> 81
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <223> Нуклеотидная последовательность трансмембранной области CD28
 <400> 28
 тттггггтгс тггтггтггт тггтгггггтс ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg 60
 гсctttatta тттtctgggt g 81
 <210> 29
 35 <211> 41
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность внутриклеточной области CD28
 40 <400> 29
 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
 45 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40
 <210> 30
 <211> 123

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Нуклеотидная последовательность внутриклеточной области CD28
 5 <400> 30
 aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccgccgcccc 60
 gggccaaccs gcaagcatta ccaagccctat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120
 tcc 123
 <210> 31
 10 <211> 113
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность домена CD3Z
 15 <400> 31
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 20 35 40 45
 Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 50 55 60
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 25 65 70 75 80
 Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 85 90 95
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 100 105 110
 30 Arg
 <210> 32
 <211> 339
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <223> Нуклеотидная последовательность домена CD3Z
 <400> 32
 agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 60
 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
 40 cgggaccctg agatgggggg aaagccgag agaaggaaga accctcagga aggcctgtac 180
 aatgaactgc agaaagataa gatggcggag gcctacagtg agattgggat gaaaggcgag 240
 cgcscggagg gcaaggggca cgatggcctt taccagggtc tcagtacagc caccaaggac 300
 acctacgacg cccttcacat gcaggccctg ccccctcgc 339
 <210> 33
 45 <211> 21
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> Аминокислотная последовательность трансмембранной области CD8
 <400> 33
 Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 5 Ser Leu Val Ile Thr
 20
 <210> 34
 <211> 63
 <212> ДНК
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Нуклеотидная последовательность трансмембранной области CD8
 <400> 34
 atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtgggggtcc ttctcctgtc actgggtatc 60
 15 acc 63
 <210> 35
 <211> 42
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность внутриклеточной области CD137
 <400> 35
 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1 5 10 15
 25 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 20 25 30
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 35 40
 <210> 36
 30 <211> 126
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Нуклеотидная последовательность внутриклеточной области CD137
 35 <400> 36
 aaacgggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaaac catttatgag accagtacaa 60
 actactsaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120
 gaactg 126
 <210> 37
 40 <211> 184
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Аминокислотная последовательность ВСМА
 45 <400> 37
 Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
 1 5 10 15
 Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr

20 25 30
 Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
 35 40 45
 Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu
 5 50 55 60
 Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile
 65 70 75 80
 Asn Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu
 85 90 95
 10 Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu
 100 105 110
 Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys
 115 120 125
 Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe
 15 130 135 140
 Pro Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys
 145 150 155 160
 Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu
 165 170 175
 20 Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
 180
 <210> 38
 <211> 54
 <212> БЕЛОК
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Внеклеточный сегмент Met1-Ala54 ВСМА человека
 <400> 38
 Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
 30 1 5 10 15
 Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
 20 25 30
 Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
 35 40 45
 35 Val Lys Gly Thr Asn Ala
 50
 <210> 39
 <211> 162
 <212> ДНК
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Нуклеотидная последовательность внеклеточного сегмента Met1-Ala54 ВСМА
 человека
 <400> 39
 45 atgctgcaga tggccggcca gtgcagccag aacgagtact tcgacagcct gctgcacgcc 60
 tgcattcccct gccagctgcg gtgcagcagc aacaccccc cctgacctg ccagcggtag 120
 tgcaaccgcca gcgtgaccaа cagcgtgaag ggcaccaacg cc 162
 <210> 40

<211> 283
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <223> BCMA_huFc
 <400> 40
 Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser
 1 5 10 15
 Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
 10 20 25 30
 Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
 35 40 45
 Val Lys Gly Thr Asn Ala Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 50 55 60
 15 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 65 70 75 80
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 85 90 95
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 20 100 105 110
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 115 120 125
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 130 135 140
 25 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 145 150 155 160
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 165 170 175
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 30 180 185 190
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
 195 200 205
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 210 215 220
 35 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 225 230 235 240
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 245 250 255
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 40 260 265 270
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 275 280
 <210> 41
 <211> 849
 45 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Нуклеотидная последовательность BCMA_huFc

<400> 41

atgctgcaga tggccggcca gtgcagccag aacgagtact tcgacagcct gctgcacgcc 60
 tgcattcccct gccagctgcg gtgcagcagc aacaccccccc ccttgacctg ccagcgggtac 120
 tgcaacgcca gcgtgaccaaa cagcgtgaag ggacaccaacg ccggatccga caaaactcac 180
 5 acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 240
 ccaaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtgggtggtg 300
 gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtaaac ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 360
 cataatgcca agacaaaagcc gcggggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 420
 gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 480
 10 aacaaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 540
 gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 600
 ctgtggtgcc tggtaaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 660
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 720
 ttctctata gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 780
 15 tgctccgtga tgcattgagc tctgcacaaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 840
 ccgggtaaaa 849

<210> 42

<211> 281

<212> БЕЖОК

20 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> BCMA_muFc

<400> 42

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

195 200 205
 Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn
 210 215 220
 Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val
 5 225 230 235 240
 Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr
 245 250 255
 Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu
 260 265 270
 10 Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 275 280
 <210> 43
 <211> 843
 <212> ДНК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Нуклеотидная последовательность BCMA_muFc
 <400> 43
 atgctgcaga tggccggcca gtgcagccag aacgagtact tcgacagcct gctgcacgcc 60
 20 tgcattcccct gccagctgcg gtgcagcagc aacaccccc ccctgacctg ccagcggtag 120
 tgcaacgccca gcgtgaccaaa cagcgtgaag ggcaccaacg ccggatccag ggattgtggg 180
 tgtaagcctt gcatatgtac agtcccagaa gtatcatctg tcttcatctt cccccaaaag 240
 cccaaggatg tgctcaccat tactctgact cctaaggcca cgtgtgttgg gtagacatc 300
 agcaaggatg atccccgagg ccagttcagc tggttttag atgatgtgga ggtgcacaca 360
 25 gctcagacgc aacccccgga ggagcagttc aacagcactt tccgctcagt cagtgaactt 420
 cccatcatgc accaggactg gctcaatggc aaggagttca aatgcagggt caacagtgca 480
 gctttccctg ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aaggcagacc gaaggctcca 540
 caggtgtaca ccattccacc tccaaggag cagatggcca aggataaagt cagtctgacc 600
 tgcattgataa cagacttctt ccctgaagac attactgtgg agtggcagtg gaatgggcag 660
 30 ccagcggaga actacaagaa cactcagccc atcatggaca cagatggctc ttactctgct 720
 tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac tgggaggcag gaaatacttt cacctgctct 780
 gtgttacatg agggcctgca caaccacat actgagaaga gcctctcca ctctctggg 840
 aaa 843
 <210> 44
 35 <211> 589
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Нуклеотидная последовательность BCMA человека с внедренными сайтами
 40 рестрикции MluI, SalI
 <400> 44
 acgcgtccta gcgctaccgg tcgccaccat gttgcagatg gctgggcagt gctcccaaaa 60
 tgaatatttt gacagtttgt tgcattgctt cataccttgt caacttcgat gttcttctaa 120
 tactcctcct ctaacatgtc agcgttattg taatgcaagt gtgaccaatt cagtgaaggg 180
 45 aacgaatgcg attctctgga cctgtttggg actgagctta ataatttctt tggcagtttt 240
 cgtgctaatt tttttgctaa ggaagataaa ctctgaacca ttaaaggacg agtttaaaaa 300
 cacaggatca ggtctcctgg gcatggctaa cattgacctg gaaaagagca ggactggtga 360
 tgaaattatt cttccgagag gcctcgagta cacgggtgaa gaatgcacct gtgaagactg 420

catcaagagc aaaccgaagg tcgactctga ccattgcttt ccactcccag ctatggagga 480
 aggcgcaacc attcttgtca ccacgaaaac gaatgactat tgcaagagcc tgccagctgc 540
 tttgagtgtc acggagatag agaaatcaat ttctgctagg taagtcgac 589

<210> 45

5 <211> 365

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> APRIL_huFc

10 <400> 45

His Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys Asp Asp
 1 5 10 15

Ser Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg Gly Arg
 20 25 30

15 Gly Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala Gly Val
 35 40 45

Tyr Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe Thr Met
 50 55 60

20 Gly Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr Leu Phe
 65 70 75 80

Arg Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr Asn Ser
 85 90 95

Cys Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile Leu Ser
 100 105 110

25 Val Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro His Gly
 115 120 125

Thr Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 130 135 140

30 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 145 150 155 160

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 165 170 175

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 180 185 190

35 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 195 200 205

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 210 215 220

40 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 225 230 235 240

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 245 250 255

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 260 265 270

45 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
 275 280 285

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 290 295 300

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 305 310 315 320
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 325 330 335
 5 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 340 345 350
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 355 360 365
 <210> 46
 10 <211> 1095
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Нуклеотидная последовательность APRIL_huFc
 15 <400> 46
 cacagcgtgc tgcacctggt gccatcaac gccaccagca aggacgacag cgacgtgacc 60
 gaggtgatgt ggcagccccg cctgcggcgg gcccgggcc tgcaggcca gggctacggc 120
 gtgcggatcc aggacgccgg cgtgtacctg ctgtacagcc agtgctgtt ccaggacgtg 180
 accttcacca tgggccaggt ggtgagccgg gagggccagg gccggcagga gaccctgttc 240
 20 cggatgcatt ggagcatgcc cagccacccc gaccggcctt acaacagctg ctacagcgc 300
 ggcgtgttcc acctgcacca ggcgcacatc ctgagcgtga tcatcccccg ggcccgggccc 360
 aagctgaacc tgagccccca cggcaccttc ctgggcttcg tgaagctggg atccgacaaa 420
 actcacacat gccaccctgt cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc 480
 tccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgctg 540
 25 gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 600
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 660
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 720
 gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 780
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 840
 30 gtcagcctgt ggtgcctggt caaagccttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 900
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 960
 tccttcttcc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1020
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gacgctctcc 1080
 ctgtctccgg gtaaa 1095
 35 <210> 47
 <211> 242
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <223> 47 7A12 scFv
 <400> 47
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 45 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 5 85 90 95
 Ala Arg Tyr Pro Tyr Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 10 Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 130 135 140
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 145 150 155 160
 Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 15 165 170 175
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 180 185 190
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 195 200 205
 20 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 210 215 220
 Gly Tyr Pro Pro Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 225 230 235 240
 Lys Arg
 25 <210> 48
 <211> 243
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <223> scFv 7G2
 <400> 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 35 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 40 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Leu Ser Gly Asp Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 45 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu

130 135 140
 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 145 150 155 160
 Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 5 165 170 175
 Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
 180 185 190
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 195 200 205
 10 Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 210 215 220
 Tyr Gly Tyr Pro Pro Arg Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 225 230 235 240
 Ile Lys Arg
 15 <210> 49
 <211> 26
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <223> Праймер LMF
 <400> 49
 caggaaacag ctatgaccat gattac 26
 <210> 50
 <211> 80
 25 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер ВН1R
 <220>
 30 <221> прочее
 <222> (44)..(45)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 <220>
 <221> прочее
 35 <222> (47)..(48)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 <220>
 <221> прочее
 <222> (50)..(51)
 40 <223> n представляет собой а, с, г или т
 <220>
 <221> прочее
 <222> (53)..(54)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 45 <220>
 <221> прочее
 <222> (56)..(57)
 <223> n представляет собой а, с, г или т

<220>
 <221> прочее
 <222> (59)..(60)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 5 <400> 50
 tgagaccac tccagcccct tccctggagc ctggcggacc camnnmnmn nmnnmnmnn 60
 aaaggtgaat ccggaggctg 80
 <210> 51
 <211> 67
 10 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер ВН2F
 <220>
 15 <221> прочее
 <222> (18)..(19)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 <220>
 <221> прочее
 20 <222> (24)..(25)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 <220>
 <221> прочее
 <222> (27)..(28)
 25 <223> n представляет собой а, с, г или т
 <220>
 <221> прочее
 <222> (30)..(31)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 30 <220>
 <221> прочее
 <222> (33)..(34)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 <220>
 35 <221> прочее
 <222> (39)..(40)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 <220>
 <221> прочее
 40 <222> (45)..(46)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 <400> 51
 ggctggagtg ggtctcannk attnnknnkn nknnkggtnn kacannktac gcagactccg 60
 tgaaggg 67
 45 <210> 52
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Праймер FdR
 <400> 52
 gacgtagta aatgaatttt ctgtatgagg 30
 5 <210> 53
 <211> 85
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 10 <223> Праймер VL1R
 <220>
 <221> прочее
 <222> (44)..(45)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 15 <220>
 <221> прочее
 <222> (50)..(51)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 <220>
 20 <221> прочее
 <222> (53)..(54)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 <220>
 <221> прочее
 25 <222> (56)..(57)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 <220>
 <221> прочее
 <222> (59)..(60)
 30 <223> n представляет собой а, с, г или т
 <220>
 <221> прочее
 <222> (62)..(63)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 35 <220>
 <221> прочее
 <222> (65)..(66)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 <400> 53
 40 gatgaggagc ctgggagcct ggccaggttt ctgctggtac camnntaamn nmnmnmnmnn 60
 mnmnmnctga ctggccctgc aagag 85
 <210> 54
 <211> 58
 <212> ДНК
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер VL2F
 <220>

<221> прочее
 <222> (23)..(24)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 <220>
 5 <221> прочее
 <222> (26)..(27)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 <220>
 <221> прочее
 10 <222> (29)..(30)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 <220>
 <221> прочее
 <222> (32)..(33)
 15 <223> n представляет собой а, с, г или т
 <220>
 <221> прочее
 <222> (35)..(36)
 <223> n представляет собой а, с, г или т
 20 <400> 54
 ccaggctccc aggtcctca tcnnknnknn knnknnkagg gccactggca tcccagac 58
 <210> 55
 <211> 244
 <212> БЕЛОК
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> scFv 23F10
 <400> 55
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 30 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 35 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 40 85 90 95
 Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 45 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
 130 135 140
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 145 150 155 160

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 165 170 175
 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly
 180 185 190
 5 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 195 200 205
 Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220
 Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Glu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 10 225 230 235 240
 Glu Ile Lys Arg
 <210> 56
 <211> 119
 <212> БЕЛОК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> VH(AK) 25C2
 <400> 56
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 20 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Gly Asn
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 25 Ser Ala Ile Ser Gly Asn Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 30 85 90 95
 Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 35 <210> 57
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <223> VH 25C2
 <400> 57
 gaggtgcaat tgctggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttggc ggtaatgccca tgtcctgggt cgcaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagca attagtggta atggtggtag tacattctac 180
 45 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagtctgt 300
 ccattctggg gtactttcga ctactggggc caaggaaccc tggtcaccgt ctcgagt 357
 <210> 58

<211> 119
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <223> VH(AK) 25D2
 <400> 58
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
 10 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 20 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 59
 <211> 357
 25 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> VH 25D2
 <400> 59
 30 gaggtgcaat tgctggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttagg agctatgcca tgagctgggt cgcaggct 120
 ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggcg gtggtggtaa cacattctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagttcgt 300
 35 ccattctggg gtactttcga ctactggggc caaggaacc tggtcacctg ctcgagt 357
 <210> 60
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <223> HCDR1 25C2
 <400> 60
 Gly Asn Ala Met Ser
 1 5
 45 <210> 61
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> HCDR2 25C2
 <400> 61
 Ala Ile Ser Gly Asn Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 5 1 5 10 15
 Gly
 <210> 62
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> HCDR1 25D2
 <400> 62
 Ser Tyr Ala Met Ser
 15 1 5
 <210> 63
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <223> HCDR2 25D2
 <400> 63
 Ala Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 25 Gly
 <210> 64
 <211> 732
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <223> scFv 25C2
 <400> 64
 gaggtgcaat tgctggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttggc ggtaatgcc tgcctgggt cgcagggt 120
 35 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagca attagtggta atggtggtag tacattctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagtctgt 300
 ccattctggg gtactttcga ctactggggc caaggaacc tggtcaccgt ctcgagtgg 360
 ggaggcgggt caggcggagg tggttctggc ggtggcggat cggaaatcgt gttaacgcag 420
 40 tctccaggca ccctgtcttt gtctccaggg gaaagagcca ccctctcttg cagggccagt 480
 cagagtgtta gcagcagcta cttagcctgg taccagcaga aacctggcca ggctcccagg 540
 ctctcatct atggagcatc cagcagggcc actggcatcc cagacagggt cagtggcagt 600
 ggatccggga cagacttcac tctcaccatc agcagactgg agcctgaaga ttttgcagt 660
 tattactgtc agcagtactt caaccaccca gaatacacgt tcggccaggg gaccaaagt 720
 45 gaaatcaaac gt 732
 <210> 65
 <211> 244
 <212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> scFv 25C2 (AK)

<400> 65

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

<210> 66

<211> 732

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> scFv 25D2

<400> 66

gaggtgcaat tgctggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttagg agctatgccca tgagctgggt cgcaggct 120
 45 ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggcg gtgggtgtaa cacattctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagttcgt 300
 ccattctggg gtactttcga ctactggggc caaggaaccc tggtcaccgt ctcgagtggg 360

ggagggcgggtt cagggcggagg tggttctggc ggtggcggat cggaaatcgt gttaacgcag 420
 tctccaggca ccctgtcttt gtctccaggg gaaagagcca ccctctcttg cagggccagt 480
 cagagtgtta gcagcagcta cttagcctgg taccagcaga aacctggcca ggctcccagg 540
 ctctcatct atggagcatc cagcagggcc actggcatcc cagacagggtt cagtggcagt 600
 5 ggatccggga cagacttcac tctcaccatc agcagactgg agcctgaaga ttttgcagtg 660
 tattactgtc agcagtactt caaccacca gaatacacgt tcggccaggg gaccaaagtg 720
 gaaatcaaac gt 732
 <210> 67
 <211> 244
 10 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> scFv 25D2 (AK)
 <400> 67
 15 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 20 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 30 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
 130 135 140
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 145 150 155 160
 35 Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 165 170 175
 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly
 180 185 190
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 40 195 200 205
 Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220
 Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Glu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 225 230 235 240
 45 Glu Ile Lys Arg
 <210> 68
 <211> 60
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Последовательность сигнального пептида PD-1
 <400> 68
 5 atgcagatcc cacagggcgcc ctggccagtc gtctgggfcg tgctacaact gggctggcgg 60
 <210> 69
 <211> 450
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <223> Последовательность внеклеточного сегмента PD-1
 <400> 69
 ccaggatggt tcttagactc cccagacagc ccctggaacc cccccacctt ctccccagcc 60
 ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 120
 15 gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 180
 gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 240
 cccaacggggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 300
 tacctctgtg gggccatctc cctggcccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgctgggca 360
 gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag ccctcacc 420
 20 aggccagccg gccagttcca aaccctggtg 450
 <210> 70
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <223> ДНК-последовательность домена CH3
 <400> 70
 cccccatgcc caccatgccc agcacctgag ttctggggg gaccatcagt ctctctgttc 60
 cccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccggacc ctgaggtcac gtgcgtgggtg 120
 30 gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 180
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtgggtc 240
 agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtaca gtgcaagggtc 300
 tccaacaag gcctcccgtc c 321
 <210> 71
 35 <211> 49
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер
 40 <400> 71
 acgcgtccta gcgctaccgg tcgccaccat gcagatccca caggcggcc 49
 <210> 72
 <211> 41
 <212> ДНК
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер
 <400> 72

ctctcggggc tgcccaccat acaccagggt ttggaactgg c 41
 <210> 73
 <211> 27
 <212> ДНК
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Праймер
 <400> 73
 tatggtgggc agccccgaga gссacag 27
 10 <210> 74
 <211> 40
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <223> Праймер
 <400> 74
 aaaattcaaa gtctgtttca ctttaccсgg agacagggag 40
 <210> 75
 <211> 465
 20 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 7A12-BBZ
 <400> 75
 25 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 30 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 35 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Pro Tyr Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 40 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 130 135 140
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 145 150 155 160
 45 Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 165 170 175
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 180 185 190

RU 2 799 655 C2

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 195 200 205
 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 210 215 220
 5 Gly Tyr Pro Pro Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 225 230 235 240
 Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
 245 250 255
 Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
 10 260 265 270
 Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile
 275 280 285
 Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser
 290 295 300
 15 Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr
 305 310 315 320
 Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu
 325 330 335
 Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu
 20 340 345 350
 Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln
 355 360 365
 Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
 370 375 380
 25 Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
 385 390 395 400
 Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 405 410 415
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 30 420 425 430
 Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 435 440 445
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 450 455 460
 35 Arg
 465
 <210> 76
 <211> 467
 <212> БЕЛОК
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 25C2-BBZ
 <400> 76
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 45 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Gly Asn
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Asn Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 5 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 10 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
 130 135 140
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 15 145 150 155 160
 Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 165 170 175
 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly
 180 185 190
 20 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 195 200 205
 Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220
 Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Glu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 25 225 230 235 240
 Glu Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
 245 250 255
 Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
 260 265 270
 30 Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
 275 280 285
 Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
 290 295 300
 Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
 35 305 310 315 320
 Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
 325 330 335
 Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
 340 345 350
 40 Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 355 360 365
 Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 370 375 380
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 45 385 390 395 400
 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 405 410 415
 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys

420 425 430
 Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
 435 440 445
 Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
 5 450 455 460
 Pro Pro Arg
 465
 <210> 77
 <211> 467
 10 <212> БЕЖОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 25D2-BBZ
 <400> 77
 15 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 20 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 30 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
 130 135 140
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 145 150 155 160
 35 Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 165 170 175
 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly
 180 185 190
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 40 195 200 205
 Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220
 Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Glu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 225 230 235 240
 45 Glu Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
 245 250 255
 Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
 260 265 270

RU 2 799 655 C2

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
 275 280 285
 Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
 290 295 300
 5 Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu
 305 310 315 320
 Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln
 325 330 335
 Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly
 10 340 345 350
 Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 355 360 365
 Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 370 375 380
 15 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 385 390 395 400
 Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu
 405 410 415
 Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys
 20 420 425 430
 Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu
 435 440 445
 Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu
 450 455 460
 25 Pro Pro Arg
 465
 <210> 78
 <211> 466
 <212> БЕЛОК
 30 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 7G2-BBZ
 <400> 78
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 35 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 40 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 45 85 90 95
 Ala Lys Leu Ser Gly Asp Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

RU 2 799 655 C2

115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
 130 135 140
 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 5 145 150 155 160
 Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 165 170 175
 Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
 180 185 190
 10 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 195 200 205
 Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 210 215 220
 Tyr Gly Tyr Pro Pro Arg Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 15 225 230 235 240
 Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
 245 250 255
 Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro
 260 265 270
 20 Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 275 280 285
 Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 290 295 300
 Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu
 25 305 310 315 320
 Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu
 325 330 335
 Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys
 340 345 350
 30 Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys
 355 360 365
 Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
 370 375 380
 Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
 35 385 390 395 400
 Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
 405 410 415
 Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
 420 425 430
 40 Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
 435 440 445
 Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
 450 455 460
 Pro Arg
 45 465
 <210> 79
 <211> 468
 <212> BEJOK

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 7A12-28Z

<400> 79

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

Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
 355 360 365
 Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
 370 375 380
 5 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
 385 390 395 400
 Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
 405 410 415
 Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
 10 420 425 430
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 435 440 445
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
 450 455 460
 15 Leu Pro Pro Arg
 465
 <210> 80
 <211> 510
 <212> БЕЖОК
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 7A12-28BBZ
 <400> 80
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 25 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 30 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35 85 90 95
 Ala Arg Tyr Pro Tyr Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 40 Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 130 135 140
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 145 150 155 160
 Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 45 165 170 175
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 180 185 190
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

195 200 205
 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 210 215 220
 Gly Tyr Pro Pro Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 5 225 230 235 240
 Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr
 245 250 255
 Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala
 260 265 270
 10 Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Phe
 275 280 285
 Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu
 290 295 300
 Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg
 15 305 310 315 320
 Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro
 325 330 335
 Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala
 340 345 350
 20 Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
 355 360 365
 Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
 370 375 380
 Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
 25 385 390 395 400
 Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
 405 410 415
 Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
 420 425 430
 30 Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg
 435 440 445
 Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
 450 455 460
 Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
 35 465 470 475 480
 Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
 485 490 495
 Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 500 505 510
 40 <210> 81
 <211> 469
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <223> 7G2-28Z
 <400> 81
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

RU 2 799 655 C2

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 5 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 10 85 90 95
 Ala Lys Leu Ser Gly Asp Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 15 Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
 130 135 140
 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 145 150 155 160
 Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 20 165 170 175
 Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
 180 185 190
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 195 200 205
 25 Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 210 215 220
 Tyr Gly Tyr Pro Pro Arg Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 225 230 235 240
 Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
 30 245 250 255
 Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro
 260 265 270
 Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 275 280 285
 35 Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 290 295 300
 Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
 305 310 315 320
 Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
 40 325 330 335
 Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
 340 345 350
 Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
 355 360 365
 45 Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
 370 375 380
 Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
 385 390 395 400

RU 2 799 655 C2

Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
 405 410 415
 Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
 420 425 430
 5 Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
 435 440 445
 Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
 450 455 460
 Ala Leu Pro Pro Arg
 10 465
 <210> 82
 <211> 511
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <223> 7G2-28BBZ
 <400> 82
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 25 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 30 Ala Lys Leu Ser Gly Asp Ala Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu
 35 130 135 140
 Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 145 150 155 160
 Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 165 170 175
 40 Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile
 180 185 190
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 195 200 205
 Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 45 210 215 220
 Tyr Gly Tyr Pro Pro Arg Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 225 230 235 240
 Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro

245 250 255
 Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro
 260 265 270
 Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 5 275 280 285
 Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
 290 295 300
 Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
 305 310 315 320
 10 Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
 325 330 335
 Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
 340 345 350
 Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
 15 355 360 365
 Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
 370 375 380
 Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
 385 390 395 400
 20 Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
 405 410 415
 Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
 420 425 430
 Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln
 25 435 440 445
 Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 450 455 460
 Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 465 470 475 480
 30 Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 485 490 495
 Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 500 505 510
 <210> 83
 35 <211> 470
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 25C2-28Z
 40 <400> 83
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 45 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

RU 2 799 655 C2

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

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 450 455 460
 Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470
 5 <210> 84
 <211> 512
 <212> БЕЖОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 10 <223> 25C2-28BBZ
 <400> 84
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 15 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 20 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 25 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
 130 135 140
 30 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 145 150 155 160
 Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 165 170 175
 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly
 35 180 185 190
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 195 200 205
 Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220
 40 Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Glu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 225 230 235 240
 Glu Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
 245 250 255
 Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
 45 260 265 270
 Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
 275 280 285
 Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser

290 295 300
 Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
 305 310 315 320
 Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
 5 325 330 335
 Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
 340 345 350
 Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 355 360 365
 10 Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 370 375 380
 Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg
 385 390 395 400
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
 15 405 410 415
 Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 420 425 430
 Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 435 440 445
 20 Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 450 455 460
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 465 470 475 480
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 25 485 490 495
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 500 505 510
 <210> 85
 <211> 470
 30 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 25D2-28Z
 <400> 85
 35 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 40 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 45 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

RU 2 799 655 C2

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
 130 135 140
 5 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
 145 150 155 160
 Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 165 170 175
 Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly
 10 180 185 190
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 195 200 205
 Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
 210 215 220
 15 Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Glu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 225 230 235 240
 Glu Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
 245 250 255
 Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
 20 260 265 270
 Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
 275 280 285
 Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
 290 295 300
 25 Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
 305 310 315 320
 Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
 325 330 335
 Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
 30 340 345 350
 Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
 355 360 365
 Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
 370 375 380
 35 Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
 385 390 395 400
 Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 405 410 415
 Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 40 420 425 430
 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 435 440 445
 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 450 455 460
 45 Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 465 470
 <210> 86
 <211> 512

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 25D2-28BBZ

5 <400> 86

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

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

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

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

15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Val Arg Pro Phe Trp Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

20 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
130 135 140

25 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
145 150 155 160

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
165 170 175

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly
180 185 190

30 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
195 200 205

Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
210 215 220

35 Gln Tyr Phe Asn Pro Pro Glu Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
225 230 235 240

Glu Ile Lys Arg Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
245 250 255

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
260 265 270

40 Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
275 280 285

Asp Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
290 295 300

45 Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
305 310 315 320

Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
325 330 335

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe

340 345 350
 Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 355 360 365
 Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 5 370 375 380
 Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg
 385 390 395 400
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
 405 410 415
 10 Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 420 425 430
 Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 435 440 445
 Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 15 450 455 460
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 465 470 475 480
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 485 490 495
 20 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 500 505 510
 <210> 87
 <211> 412
 <212> БЕЛОК
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> C11D5.3-BBZ
 <400> 87
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 30 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 35 Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 40 85 90 95
 Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 45 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ala
 130 135 140
 Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 145 150 155 160

Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 165 170 175
 Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Thr Thr Thr
 180 185 190
 5 Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
 195 200 205
 Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
 210 215 220
 His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro
 10 225 230 235 240
 Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu
 245 250 255
 Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro
 260 265 270
 15 Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys
 275 280 285
 Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe
 290 295 300
 Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu
 20 305 310 315 320
 Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
 325 330 335
 Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
 340 345 350
 25 Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
 355 360 365
 Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
 370 375 380
 Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
 30 385 390 395 400
 Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 405 410

(57) Формула изобретения

35 1. Антитело, специфически связывающееся с ВСМА, причем указанное антитело
выбрано из группы, состоящей из:

40 (1) антитела, содержащего HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2,
представленную в SEQ ID NO: 2, HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 3, и LCDR1,
представленную в SEQ ID NO: 6, LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7, и LCDR3,
представленную в SEQ ID NO: 8;

(2) антитела, содержащего HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2,
представленную в SEQ ID NO: 2, HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 4, LCDR1,
представленную в SEQ ID NO: 6, LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7, и LCDR3,
представленную в SEQ ID NO: 9;

45 (3) антитела, содержащего HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2,
представленную в SEQ ID NO: 2, HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 5, LCDR1,
представленную в SEQ ID NO: 6, LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7, и LCDR3,
представленную в SEQ ID NO: 10;

(4) антитела, содержащего HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 60, HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 61, HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 5, LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 6, LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 10;

5 (5) антитела, содержащего HCDR1, представленную в SEQ ID NO: 62, HCDR2, представленную в SEQ ID NO: 63, HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 5, LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 6, LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 7, и LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 10.

2. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что указанное антитело выбрано из группы, состоящей из:

(1) антитела, где переменная область тяжелой цепи указанного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58;

(2) антитела, где переменная область легкой цепи указанного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

20 (3) антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи антитела согласно подпункту (1) и переменную область легкой цепи антитела согласно подпункту (2).

3. Антитело по п. 2, отличающееся тем, что указанное антитело выбрано из группы, состоящей из:

(1) антитела, где переменная область тяжелой цепи указанного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, а переменная область легкой цепи указанного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11;

(2) антитела, где переменная область тяжелой цепи указанного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, а переменная область легкой цепи указанного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;

30 (3) антитела, где переменная область тяжелой цепи указанного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, а переменная область легкой цепи указанного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

(4) антитела, где переменная область тяжелой цепи указанного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56, а переменная область легкой цепи указанного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19;

(5) антитела, где переменная область тяжелой цепи указанного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, а переменная область легкой цепи указанного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

4. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп. 1-3.

40 5. Экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 4.

6. Клетка-хозяин для экспрессии антитела, которое специфически связывается с ВСМА, содержащая экспрессирующий вектор по п. 5 или нуклеиновую кислоту по п. 4, встроенную в геном.

7. Применение антитела по любому из пп. 1-3 для получения лекарственного средства нацеленного действия, которое специфически нацеливается на опухолевые клетки, экспрессирующие ВСМА.

8. Применение антитела по любому из пп. 1-3 для получения конъюгата «антитело-лекарственное средство», которое специфически нацеливается на опухолевые клетки,

экспрессирующие ВСМА.

9. Применение антитела по любому из пп. 1-3 для получения многофункционального антитела, которое специфически нацеливается на опухолевые клетки, экспрессирующие ВСМА.

5 10. Применение антитела по любому из пп. 1-3 для получения агента для диагностики опухоли, экспрессирующей ВСМА.

11. Применение антитела по любому из пп. 1-3 для получения иммунной клетки, модифицированной химерным рецептором антигена.

10 12. Применение по п. 11, отличающееся тем, что указанная иммунная клетка включает Т-лимфоцит, НК-клетку или НКТ-лимфоцит.

13. Иммуноконъюгат для распознавания ВСМА, содержащий антитело по любому из пп. 1-3; и функциональную молекулу, связанную с ним; причем указанная функциональная молекула представляет собой молекулу, нацеленную на поверхностный маркер опухоли.

15 14. Иммуноконъюгат для распознавания ВСМА, содержащий антитело по любому из пп. 1-3; и функциональную молекулу, связанную с ним; причем указанная функциональная молекула представляет собой молекулу, ингибирующую опухоли.

20 15. Иммуноконъюгат для распознавания ВСМА, содержащий антитело по любому из пп. 1-3; и функциональную молекулу, связанную с ним; причем указанная функциональная молекула представляет собой молекулу, нацеленную на поверхностный маркер иммунной клетки.

25 16. Иммуноконъюгат для распознавания ВСМА, содержащий антитело по любому из пп. 1-3; и функциональную молекулу, связанную с ним; причем указанная функциональная молекула представляет собой детектируемую метку.

30 17. Иммуноконъюгат по п. 14, отличающийся тем, что указанная молекула, ингибирующая опухоли, представляет собой противоопухолевый цитокин или противоопухолевый токсин.

18. Иммуноконъюгат по п. 17, отличающийся тем, что указанный цитокин включает: ИЛ-12, ИЛ-15, интерферон I типа, ФНО-альфа.

35 19. Иммуноконъюгат по п. 15, отличающийся тем, что молекула, нацеленная на поверхностный маркер иммунной клетки, представляет собой антитело или лиганд, связывающиеся с поверхностным маркером иммунной клетки.

20. Иммуноконъюгат по п. 19, отличающийся тем, что указанный поверхностный маркер иммунной клетки включает: CD3, CD16, CD28.

40 21. Иммуноконъюгат по п. 20, отличающийся тем, что указанное антитело, связывающее поверхностный маркер иммунной клетки, представляет собой антитело против CD3.

22. Иммуноконъюгат по п. 19, отличающийся тем, что молекула, нацеленная на поверхностный маркер иммунной клетки, представляет собой антитело, связывающееся с поверхностным маркером Т-клетки.

45 23. Применение иммуноконъюгата по любому из пп. 15-21 для получения противоопухолевого лекарственного средства против опухолей, экспрессирующих ВСМА.

24. Применение иммуноконъюгата по любому из пп. 15-21 для получения агента для диагностики опухоли, экспрессирующей ВСМА.

25. Применение иммуноконъюгата по любому из пп. 15-21 для получения иммунной клетки, модифицированной химерным рецептором антигена.

26. Применение по п. 25, отличающееся тем, что указанная иммунная клетка включает: Т-лимфоциты, НК-клетки или НКТ-лимфоциты.

5 27. Химерный рецептор антигена для распознавания ВСМА, содержащий внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внеклеточный домен содержит антитело по любому из пп. 1-3.

28. Химерный рецептор антигена по п. 27, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой одноцепочечное антитело или доменное антитело.

10 29. Химерный рецептор антигена по п. 27, отличающийся тем, что внутриклеточный сигнальный домен содержит один или более из костимулирующих сигнальных доменов и/или первичных сигнальных доменов.

30. Химерный рецептор антигена по п. 27, отличающийся тем, что указанный химерный рецептор антигена дополнительно содержит шарнирный домен.

15 31. Химерный рецептор антигена по п. 29, отличающийся тем, что трансмембранный домен выбран из группы, состоящей из альфа-, бета-, дзета-цепи TCR, трансмембранных областей CD3 ϵ , CD3 ζ , CD4, CD5, CD8 α , CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152, CD154 и PD1; и/или

костимулирующий сигнальный домен выбран из группы, состоящей из
20 внутриклеточных сигнальных областей CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54, CD83, OX40, CD137, CD134, CD150, CD152, CD223, CD270, PD-L2, PD-L1, CD278, DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, Fc ϵ RI γ , MyD88 и 41BBL; и/или

первичный сигнальный домен выбран из группы, состоящей из TCR ξ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также называемого «ICOS»),
25 CD66d и CD3 ζ .

32. Химерный рецептор антигена по п. 31, отличающийся тем, что трансмембранный домен выбран из группы, состоящей из трансмембранных доменов CD8 α , CD4, CD45, PD1, CD154 и CD28; и/или

костимулирующий сигнальный домен выбран из группы, состоящей из CD137, CD134,
30 CD28 и OX40; и/или

первичный сигнальный домен выбран из CD3 ζ .

33. Химерный рецептор антигена по п. 32, отличающийся тем, что трансмембранный домен выбран из CD8 α или CD28, костимулирующий сигнальный домен выбран из внутриклеточного сигнального домена CD137 или CD28, а первичный сигнальный
35 домен выбран из CD3 ζ .

34. Химерный рецептор антигена по п. 27, отличающийся тем, что указанный химерный рецептор антигена содержит следующие последовательно связанные антитело, трансмембранную область и внутриклеточную сигнальную область:

антитело по любому из пп. 1-3, трансмембранную область CD8 и CD3 ζ ;

40 антитело по любому из пп. 1-3, трансмембранную область CD8, внутриклеточную сигнальную область CD137 и CD3 ζ ;

антитело по любому из пп. 1-3, трансмембранную область CD28, внутриклеточную сигнальную область CD28 и CD3 ζ ; или

45 антитело по любому из пп. 1-3, трансмембранную область CD28, внутриклеточную сигнальную область CD28, CD137 и CD3 ζ .

35. Нуклеиновая кислота, кодирующая химерный рецептор антигена по любому из пп. 27-34.

36. Экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 35.

37. Вирус для доставки генетической информации, содержащий вектор по п. 36.

38. Применение химерного рецептора антигена по любому из пп. 27-34 или нуклеиновой кислоты по п. 35, или экспрессирующего вектора по п. 36, или вируса по п. 37 для получения генетически модифицированных иммунных клеток, нацеленных на опухолевую клетку, экспрессирующую ВСМА.

39. Генетически модифицированная иммунная клетка, трансдуцированная нуклеиновой кислотой по п. 35 или экспрессирующим вектором по п. 36, или вирусом по п. 37; и экспрессирующая химерный рецептор антигена по любому из пп. 27-34.

40. Генетически модифицированная иммунная клетка по п. 39, отличающаяся тем, что указанная иммунная клетка выбрана из Т-лимфоцитов, НК-клеток или НКТ-клеток.

41. Генетически модифицированная иммунная клетка по п. 39 или 40, отличающаяся тем, что она дополнительно экспрессирует последовательность, не являющуюся химерным рецептором антигена по любому из пп. 27-34, и указанная другая последовательность содержит цитокин или еще один химерный рецептор антигена или рецептор хемокина, или миРНК, снижающую экспрессию PD-1, или белок, блокирующий PD-L1, или TCR, или «предохранительный переключатель» (safety switch).

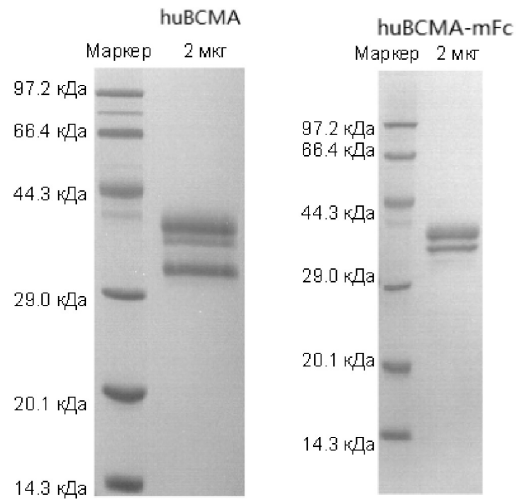
42. Генетически модифицированная иммунная клетка по п. 41, отличающаяся тем, что указанный цитокин включает ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-21 или интерферон I типа; рецептор хемокина включает CCR2, CCR5, CXCR2 или CXCR4; и

«предохранительный переключатель» включает индуцибельную каспазу-9, укороченный EGFR или RQR8.

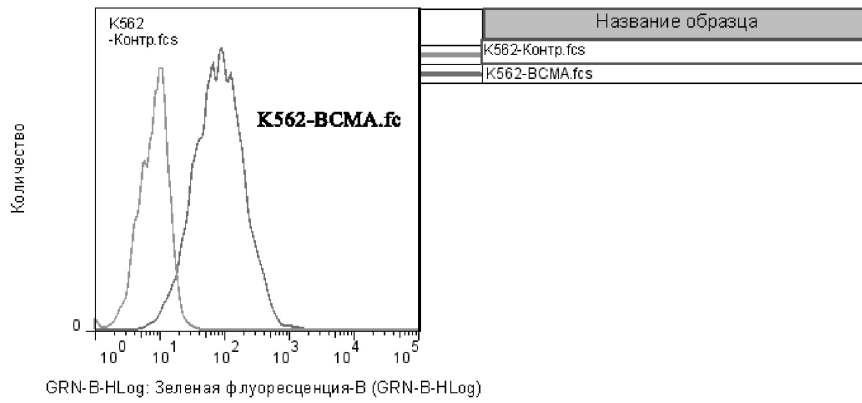
43. Применение генетически модифицированной иммунной клетки по любому из пп. 39-42 для получения лекарственного средства, подавляющего опухоль, причем указанная опухоль представляет собой опухоль, экспрессирующую ВСМА.

1

1 / 12

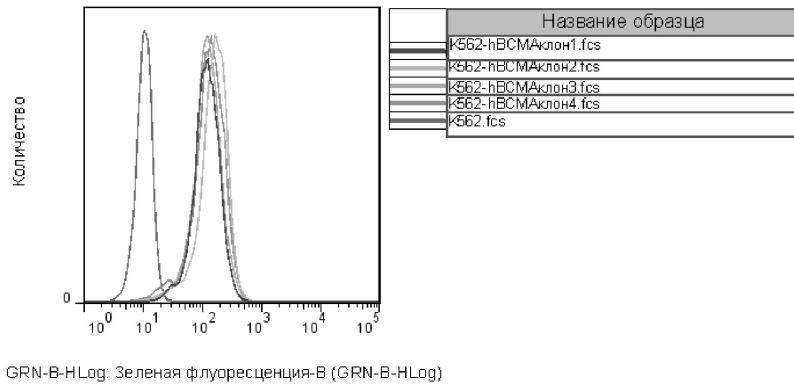


ФИГ. 1

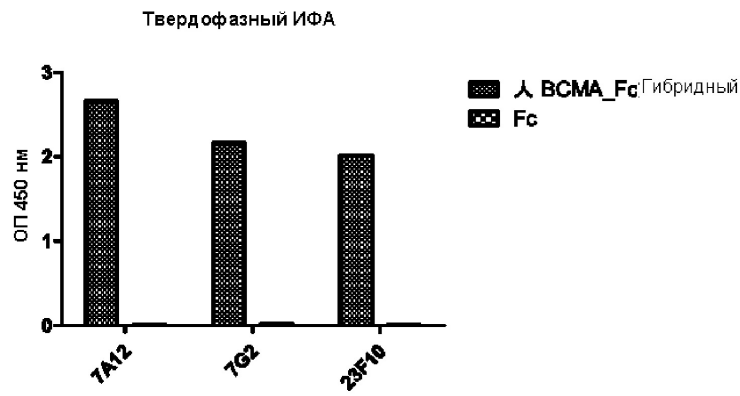


ФИГ. 2А

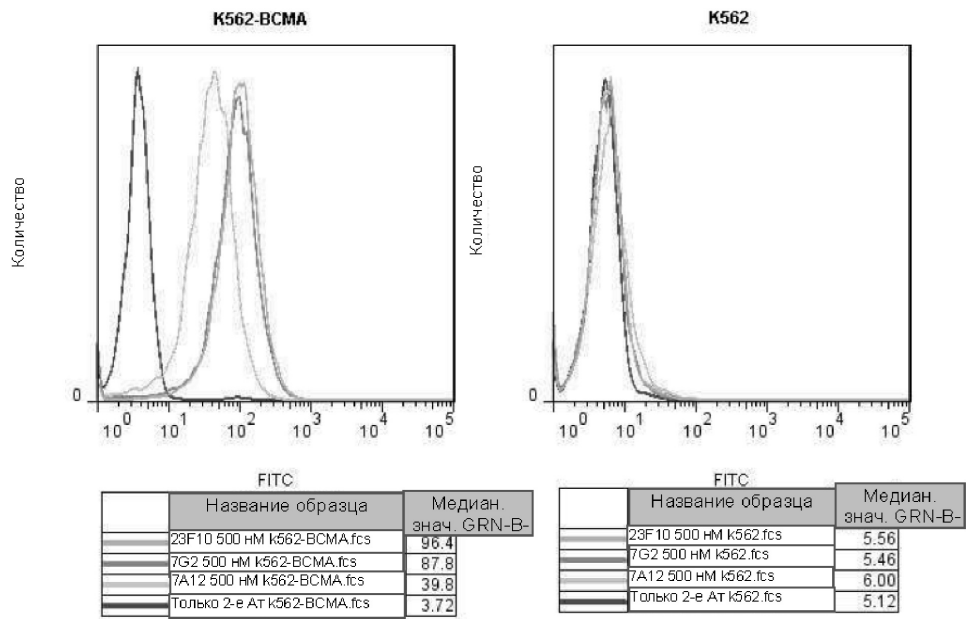
2



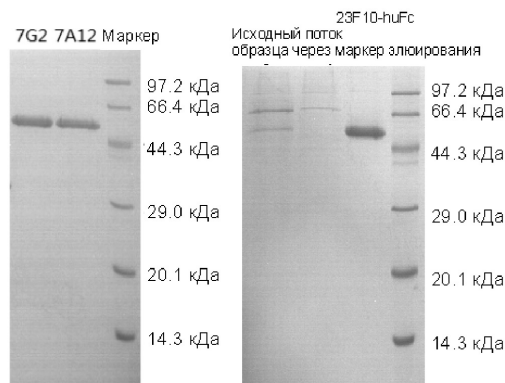
Фиг. 2В



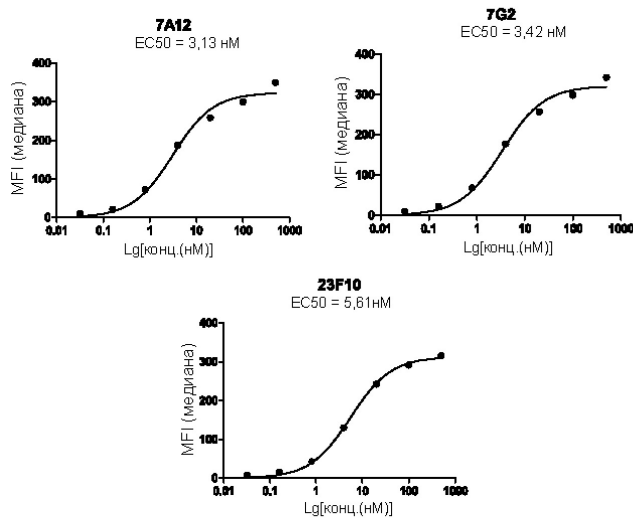
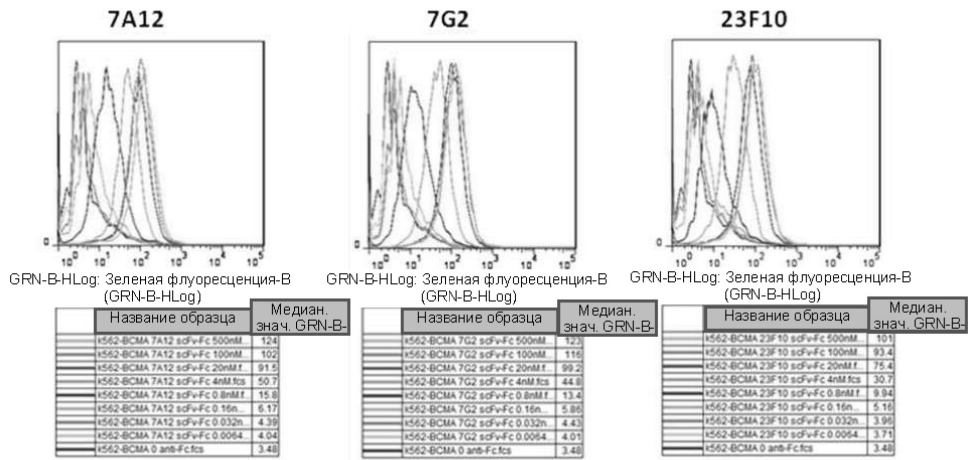
Фиг. 3



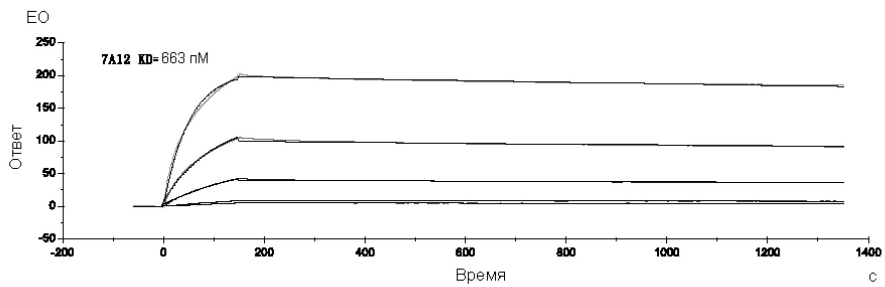
Фиг. 4



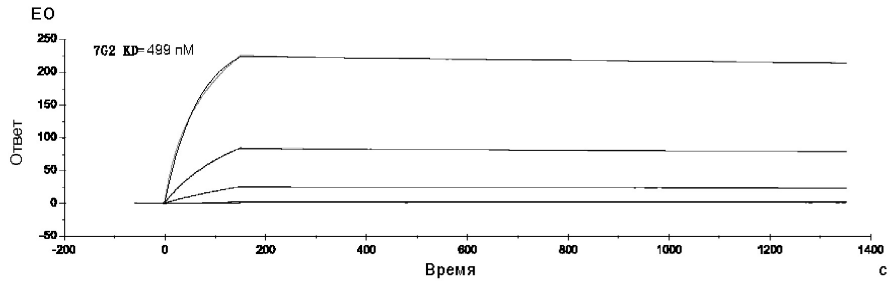
Фиг. 5



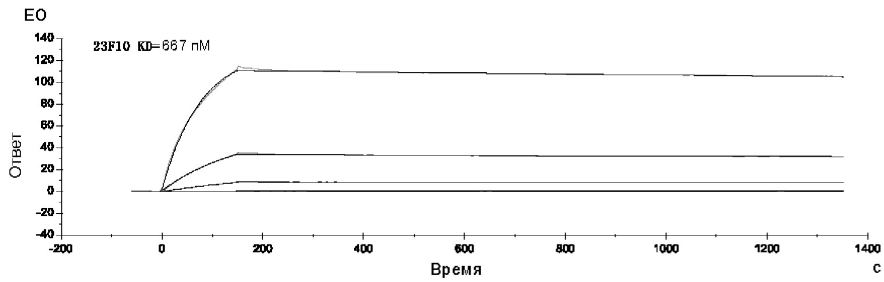
ФИГ. 6



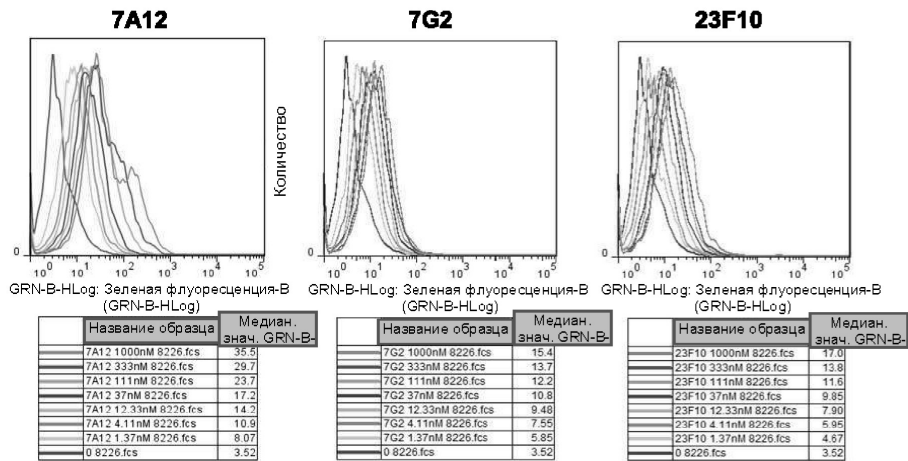
ФИГ. 7



Фиг. 7



Фиг. 7(продолжение)

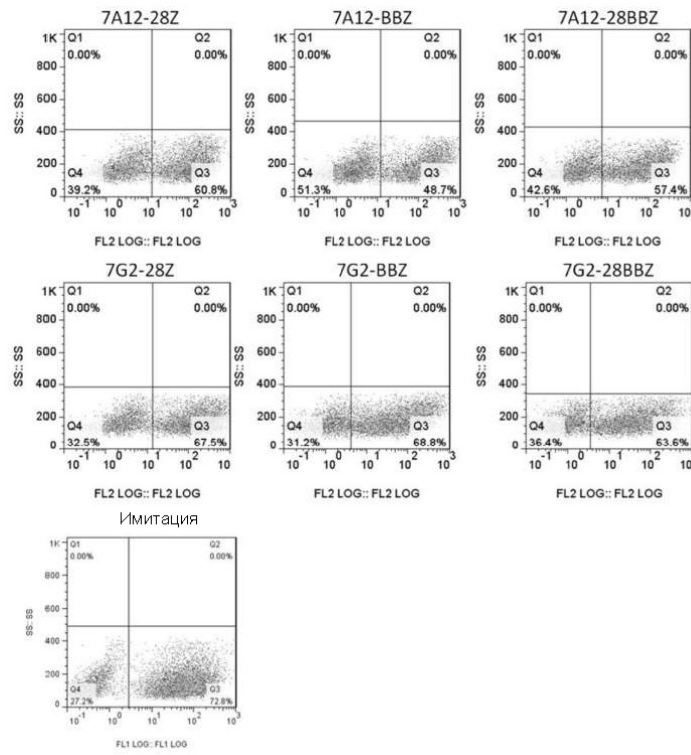


nM - nM

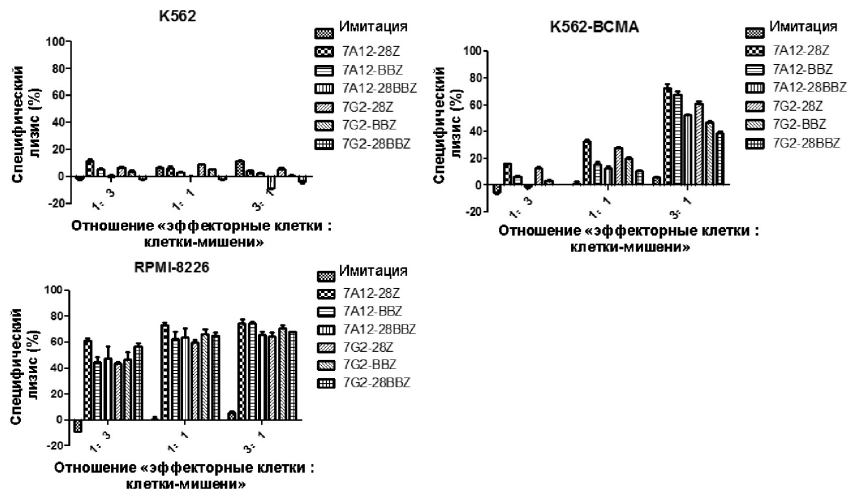
Фиг. 8



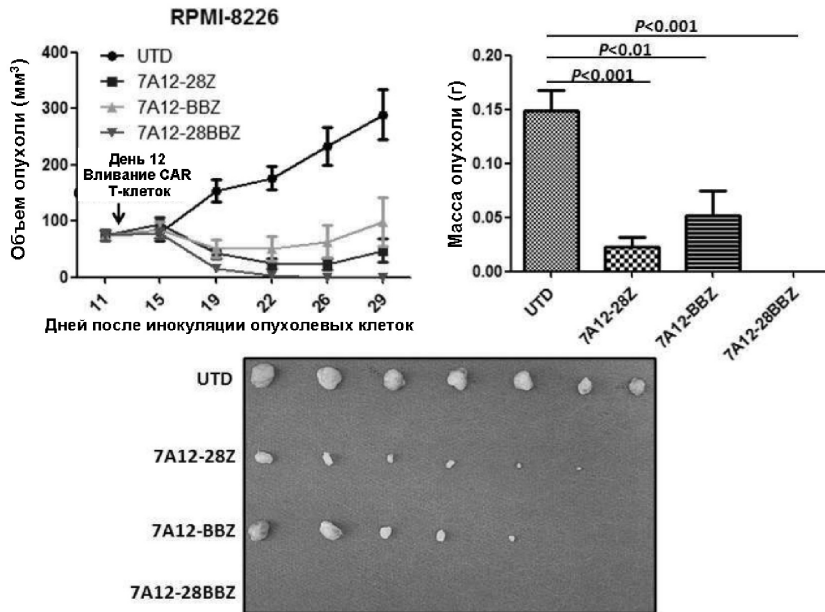
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11А



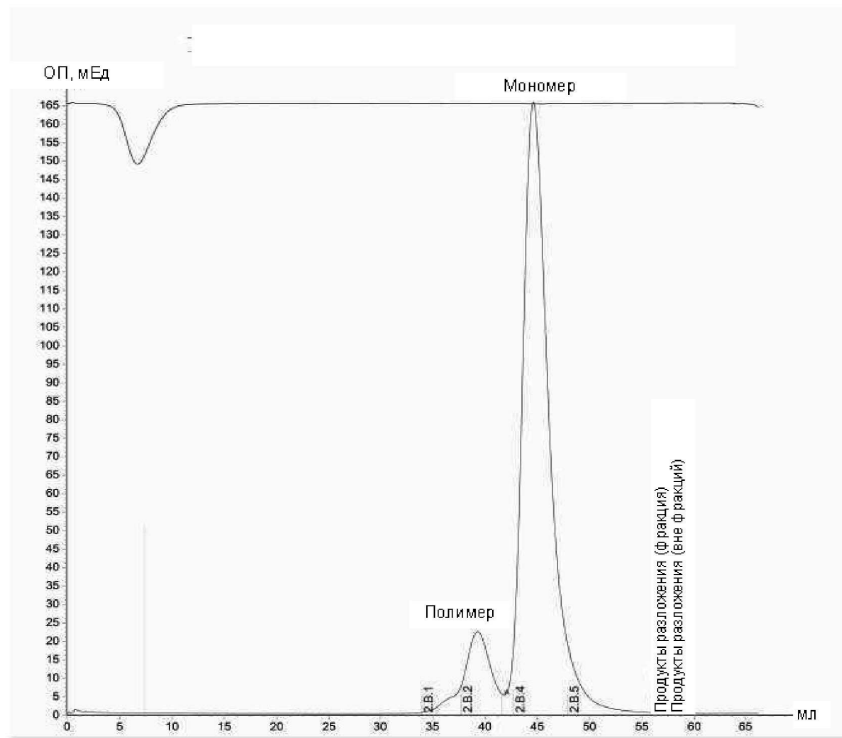
Фиг. 11В

	1	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	HCDR					36	37	38	39	40	
23F10	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A
25C2	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	F	S	G	N	A	M	S	W	V	R	Q	A
25D2	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A

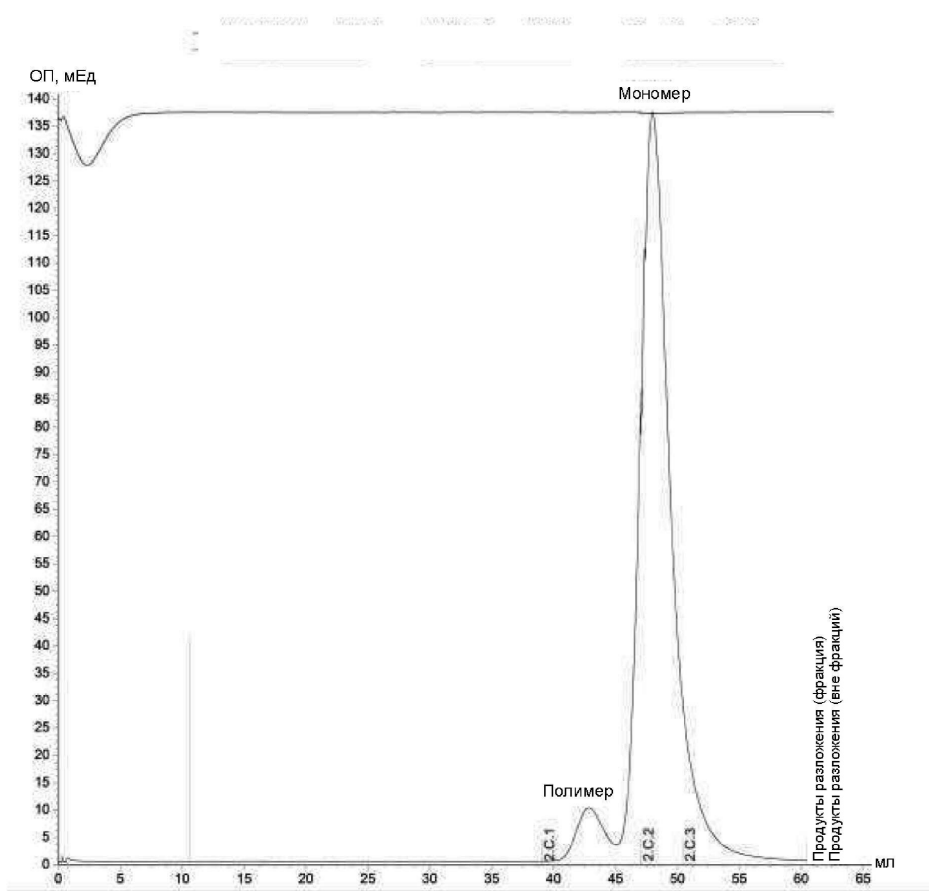
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	HCDR										57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80										
23F10	P	G	K	G	L	E	W	V	S	A	I	S	G	G	S	T	Y	Y	A	D	B	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	
25C2	P	G	K	G	L	E	W	V	S	A	I	S	G	N	G	S	T	F	Y	A	D	B	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y
25D2	P	G	K	G	L	E	W	V	S	A	I	S	G	G	G	N	T	F	Y	A	D	B	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y

	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	HCDR										106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119																														
23F10	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	V	R	P	F	W	G	T	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
25C2	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	V	R	P	F	W	G	T	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
25D2	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	V	R	P	F	W	G	T	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S

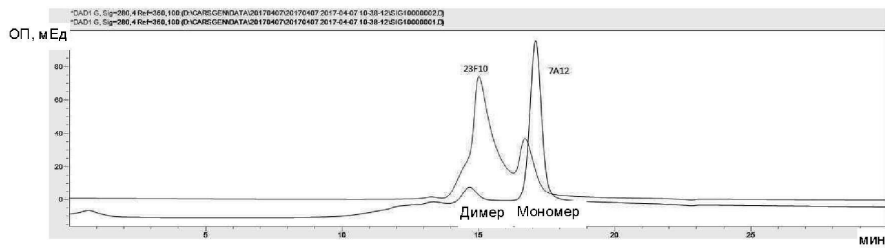
Фиг. 12



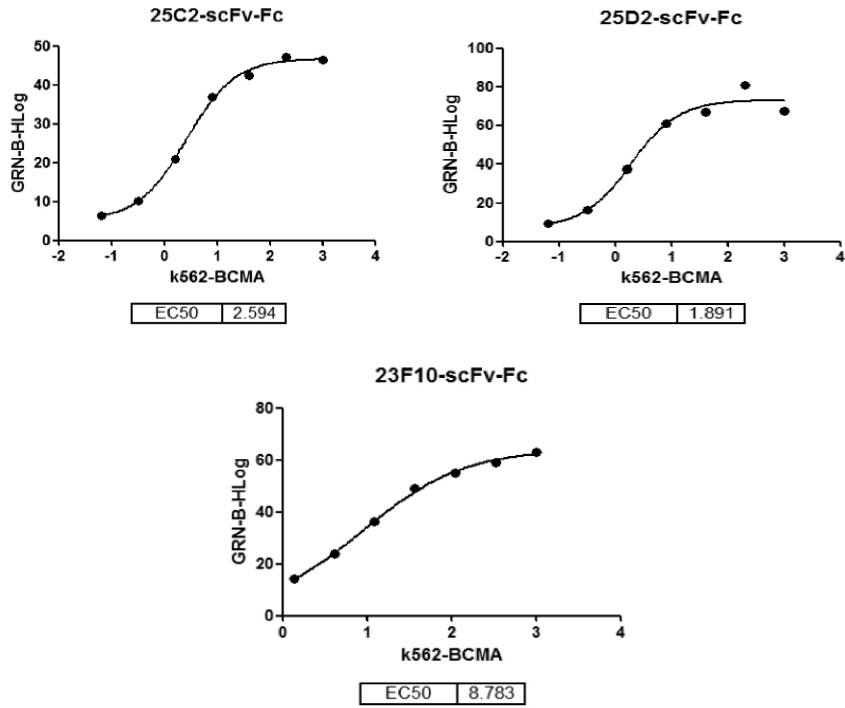
Фиг. 13А



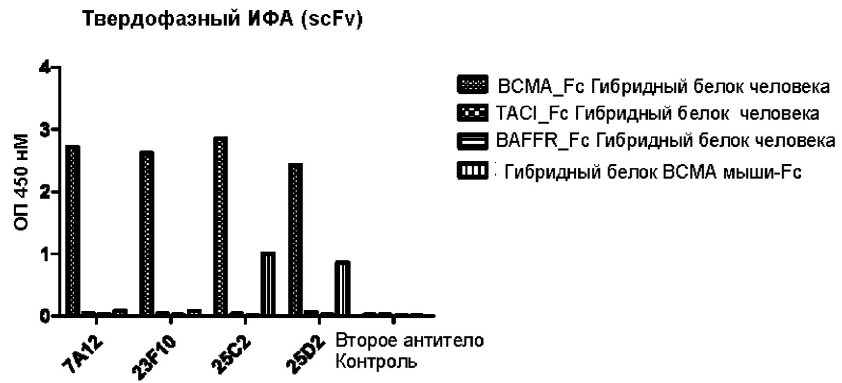
Фиг. 13В



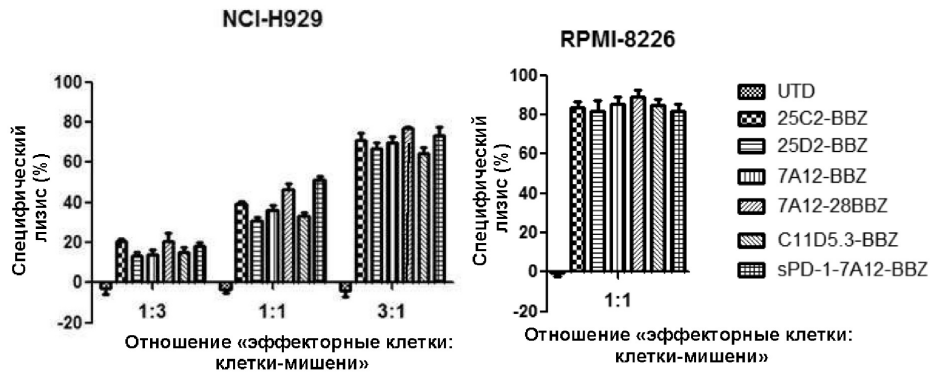
Фиг. 13С



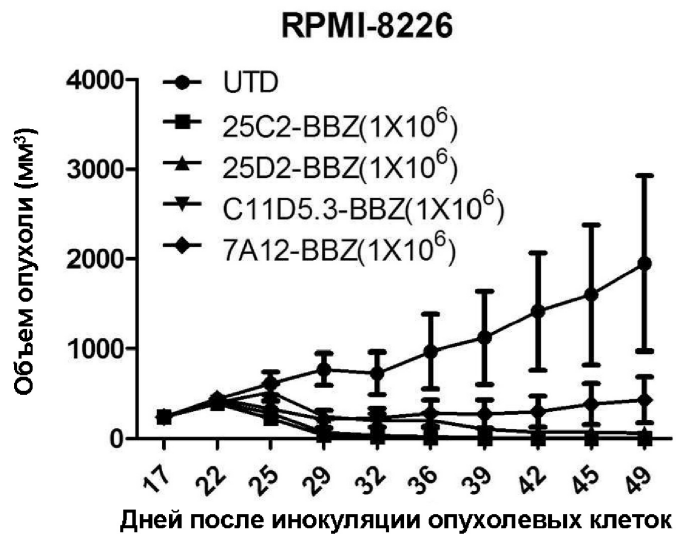
Фиг. 14А



Фиг. 14В



Фиг. 15



Фиг. 16