

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро

(43) Дата международной публикации
04 июля 2019 (04.07.2019)



(10) Номер международной публикации
WO 2019/132738 A1

(51) Международная патентная классификация:

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) A61P 1/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2018/050168

(22) Дата международной подачи:
25 декабря 2018 (25.12.2018)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(30) Данные о приоритете:
2017145662 25 декабря 2017 (25.12.2017) RU

(71) Заявитель: ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕ-
СТВО "БИОКАД" (JOINT STOCK COMPANY
"BIOCAD") [RU/RU]; ул. Связи, литер А, д. 34,
п. Стрельна, Петродворцовый район, Санкт-Петербург,
198515, St.Petersburg (RU).

(72) Изобретатели: БРИТАНОВА, Ольга Владимиров-
на (BRITANOVA, Olga Vladimirovna); ул. Свободы,
д.42, кв.34 Москва, 125362, Moscow (RU). ИЗРАЕЛЬ-
СОН, Марк Александрович (IZRAELSON, Mark
Aleksandrovic); ул. Затонная, д.12, к.2, кв.268 Москва,
115142, Moscow (RU). ЛУКЬЯНОВ, Сергей Анато-
льевич (LUKYANOV, Sergey Anatolievich); ул. Юж-
нобутовская, д.91, кв.21 Москва, 117042, Moscow (RU).

(74) Агент: ПОЛУДНИЦЫНА, Галина Владимировна
(POLUDNICZYNA, Galina Vladimirovna); ул. Свя-
зи, Литер А, д. 34, п. Стрельна, Петродворцовый
район, ЗАО "БИОКАД" Санкт-Петербург, 198515,
St.Petersburg (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,

DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP,
KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Декларации в соответствии с правилом 4.17:

- касающаяся установления личности изобретателя (правило 4.17 (i))
- касающаяся права заявителя подавать заявку на патент и получать его (правило 4.17 (ii))
- касающаяся права испрашивать приоритет предшествующей заявки (правило 4.17 (iii))
- об авторстве изобретения (правило 4.17 (iv))

Опубликована:

- с отчетом о международном поиске (статья 21.3)
- до истечения срока для изменения формулы изобретения и с повторной публикацией в случае получения изменений (правило 48.2(h))
- с перечнем последовательностей в соответствии с Правилom 5.2(a)
- в черно-белом варианте; международная заявка в поданном виде содержит цвет или оттенки серого и доступна для загрузки из PATENTSCOPE.

(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES AND METHODS FOR USING SAME

(54) Название изобретения: МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Abstract: The invention relates to monoclonal antibodies which specifically bind to the TRBV9 family of human T-cell receptors. The invention also relates to a nucleic acid which codes for said antibody or for an antigen-binding fragment thereof, to an expression vector, to a method for producing the antibody, and to the use of said antibody for treating diseases or disorders associated with the family of human T-cell receptors. The invention is directed towards producing antibodies which can be used for eliminating T-cells carrying T-cell receptors of the TRBV9 family, in particular for treating ankylosing spondylitis, coeliac disease and blood cancers, in the pathogenesis of which T-cell receptors of the TRBV9 family are involved.

(57) Реферат: Изобретение относится к моноклональным антителам, которые специфически связываются с семейством TRBV9 Т-клеточных рецепторов человека. Изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей данное анти-тело или его антигенсвязывающий фрагмент, вектору экспрессии, способу получения антитела и применению антитела для лечения заболеваний или нарушений, связанных с семейством Т-клеточных рецепторов человека. Изобретение направлено на создание антител, которые могут быть использованы для элиминации Т-клеток, несущих ТКР семейства TRBV9, в частности, для терапии АС, целиакии и злокачественных заболеваний крови, в патогенез которых вовлечены ТКР семейства TRBV9.

WO 2019/132738 A1

Моноклональные антитела и способы их применения

Область техники

Изобретение относится к области биотехнологии и биомедицины, а именно к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, а также их применению. Более конкретно, настоящее изобретение относится к моноклональным антителам, которые специфически связываются с семейством Т-клеточных рецепторов человека. Изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей данное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, вектору экспрессии, способу получения антитела и применению антитела для лечения заболеваний или нарушений, связанных с семейством Т-клеточных рецепторов человека.

Предшествующий уровень техники

В терапии аутоиммунных заболеваний человека в последнее время широкое распространение находит применение препаратов на основе антител против основных медиаторов воспалительного процесса, таких как TNFalpha, IL1, IL6, IL17, IL23 (van der Heijde D et al., Ann Rheum Dis. 2011 Jun;70(6):905-8, Baeten D, et al, N Engl J Med. 2015 Dec 24;373(26):2534-48). На стадии клинических исследований для лечения аутоиммунных заболеваний находятся обладающие иммуномодулирующими свойствами моноклональные антитела к рецепторным комплексам CD3 и CD4, (Kuhn C. and Weiner L., Immunotherapy 2016 Jul;8(8):889-906; Helling B. et al., Immunology and Cell Biology 2015 Apr;93(4):396-405; Konig M. et al., Front Immunol 2016 Jan 25;7:11). Однако, показано, что применение таких препаратов хотя и приводит к снижению воспаления, но не останавливает развитие заболевания и не влияет непосредственно на причину заболевания - аутореактивные Т лимфоциты (Haroon N et al., Arthritis Rheum. 2013 Oct;65(10):2645-54., Duarte

J. et al., PloS One 2010 May 10;5(5):e10558; König M. et al., Front Immunol 2016 Jan 25;7:11).

Несмотря на успехи в симптоматической терапии анкилозирующего спондилита (АС, болезнь Бехтерева) с использованием моноклональных антител, до сих пор не получено эффективного препарата, позволяющего избирательно и долговременно подавить аутоиммунный ответ и остановить прогрессию АС. Таким образом, актуальной задачей является создание антител, позволяющих удалить из организма больных АС аутореактивные клоны Т-лимфоцитов, с появлением которых связано развитие заболевания.

Известно, что важнейшую роль в появлении аутореактивных клонов Т-лимфоцитов играет взаимодействие антигенраспознающего Т-клеточного рецептора (ТКР) с белками главного комплекса гистосовместимости (МНС, HLA), которые представляют на своей поверхности процессированные пептиды внутриклеточных белков или белков патогенных организмов. Ряд аутоиммунных заболеваний ассоциирован с наличием у человека определенного варианта гена HLA. Так, аллель HLA-B27 ассоциирован с АС, реактивным артритом и болезнью Крона. Риск развития аутоиммунных заболеваний у носителей определенных аллельных вариантов HLA может объясняться предпочтительной презентацией этими аллелями определенных пептидов, являющихся аутоантигенами, иммунный ответ против которых инициирует развитие аутоиммунного заболевания. Одним из возможных механизмов возникновения аутоиммунной реакции является презентация молекулами комплекса гистосовместимости пептидов из белков бактериального или вирусного происхождения, гомологичных собственным пептидам организма, что может приводить к возникновению иммунного ответа против собственных антигенов за счет кросс-реактивности.

Из уровня техники известно, что маркером, позволяющим идентифицировать клон Т-лимфоцитов, вовлеченный в патогенез аутоиммунного заболевания, является последовательность Т клеточного

рецептора (ТКР). Субъединицы Т-клеточных рецепторов структурно относятся к суперсемейству иммуноглобулинов и формируются из нескольких генных сегментов. Вариабельные участки ТКР образуют антигенсвязывающий центр ТКР. Это означает, что они клоноспецифичны, т.е. отличаются у Т-лимфоцитов, реагирующих на разные антигены.

По аминокислотной гомологии вариабельных (V) генных сегментов, входящих в состав вариабельного домена ТКР, Т-клеточные рецепторы подразделяют на различные семейства. Согласно номенклатуре IMGT для бета цепи выделяют 26 различных семейств, а для альфа цепи – 41 семейство (Turner SJ et al., *Nature Reviews Immunology* 2006, V.6, 883–894). Для определения семейства цепи ТКР используют множественное выравнивание тестируемой аминокислотной последовательности с известными последовательностями цепей ТКР, информация о которых суммирована в базе данных IMGT («The international ImMunoGeneTics information system», Lefranc M-P., *Nucl Acids Res* 2001; 29:207-209), доступной в сети Интернет по адресу <http://www.imgt.org>. Множественное выравнивание и определение семейства цепи ТКР может быть осуществлено с помощью пакета программ IgBlast.

Описан консенсусный вариант аутоиммунных ТКР при АС, показано, что он представлен у больных АС в синовиальной жидкости и периферической крови и отсутствует при той же глубине анализа у здоровых доноров независимо от статуса по аллелю HLA*B27 (Faham M. et al., *Arthritis Rheumatol.* 2017;69(4):774-784; Komech E et al. 12th EJI-EFIS Tatra Immunology Conference; 2016 Sep 3-7; Strbske Pleso, Slovakia. Abstract book p. 39). Указанные ТКР относятся к TRBV9 семейству (согласно номенклатуре IMGT).

Показано, что Т клеточные рецепторы, несущие бета цепи семейства TRBV9, вовлечены также в развитие такого аутоиммунного заболевания как целикия (Petersen J et al., *J Immunol.* 2015; 194(12): 6112-22). Также они обнаруживаются на поверхности Т клеток, подверженных маглинизации в

случае Т-клеточных лимфом и Т-клеточных лейкозов, в том числе Т-клеточной лимфомы, вызванной вирусом Эпштейн-Барр (EBV) (Toyabe S et al., Clin Exp Immunol. 2003; 134(1): 92–97).

Наиболее близкими аналогами настоящего изобретения являются моноклональные антитела W112 и 2D1 к участкам бета цепи переменных доменов Т-рецептора человека, относящихся к семействам TRBV5-3 TRBV8-1, которые были описаны в патентной заявке (WO9006758) в качестве инструмента для диагностики и терапии ревматоидного артрита. Данные моноклональные антитела узнают соответственно 0.3-5% периферических Т-лимфоцитов, несущих TRBV5-3 и 0.5-13% периферических Т-лимфоцитов, несущих TRBV8-1. Основанием для использования моноклональных антител специфичных к участкам бета цепей Т-рецепторов послужили результаты многих исследований, демонстрирующие вовлеченность Т-лимфоцитов в патогенез ревматоидного артрита. В частности, данные статьи F.M. Brennan et al., Clin Exp Immunol. 1988 Sep; 73(3): 417–423, где было продемонстрировано увеличение процентного содержания Т-лимфоцитов, несущих TRBV5 TRBV8 в синовиальных образцах пациентов, страдающих ревматоидным артритом по сравнению со здоровыми донорами.

Так же для диагностики и терапии ревматоидного артрита описаны моноклональные антитела, взаимодействующие с эпитопом переменной области VB3.1 Т-клеточного рецептора человека (WO9405801), которые взаимодействуют с подсемейством ТКР V(бета)3.1.

Основным недостатком описанных в патентах WO9405801 и WO9006758 подходов лечения ревматоидного артрита является отсутствие убедительных доказательств связи между патогенезом и конкретным семейством переменного сегмента бета цепи.

Так же описаны моноклональные антитела, специфично узнающие бета-цепь 13-го семейства ТКР крысы. На модельных животных показано, что с помощью этих антител возможно превентивное удаление небольшой

популяции Т клеток, Т-рецептор которых содержит бета цепь VB13 (VB13+ Т клетки), и показано, что такая процедура защищает от развития диабета I типа у крыс предрасположенной к этому заболеванию линии, а также значительно снижает риск развития вирус-индуцированного диабета (Zhiyun Liu et al., Diabetes. 2012 May; 61(5): 1160–1168.). В то же время, деплеция Т клеток, Т-рецептор которых содержит другое семейство бета цепи (VB16), не отличается по результату от контрольных групп. Важно отметить, что уже первое введение моноклонального антитела против VB13 приводит к 60% снижению количества VB13+ Т клеток в селезенке крыс.

Все описанные аналоги не связываются с ТКР, которые относятся к TRBV9 семейству, и не пригодны для терапии АС и других заболеваний, ассоциированных с ТКР, которые относятся к TRBV9 семейству.

Моноклональных антител, пригодных для элиминации Т-клеток, несущих ТКР семейства TRBV9, которые могут быть использованы при терапии АС и целиакии не описано.

Краткое описание изобретения

Изобретение направлено на создание антител, которые могут быть использованы для элиминации Т-клеток, несущих ТКР семейства TRBV9, в частности, для терапии АС, целиакии и злокачественных заболеваний крови, в патогенез которых вовлечены ТКР семейства TRBV9.

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам и их антиген-связывающим фрагментам, обладающим способностью специфически связываться с участком бета цепи семейства TRBV9 Т рецептора человека. Антитела согласно изобретению могут использоваться в качестве лекарственного средства для лечения аутоиммунных и онкологических заболеваний, в патогенез которых вовлечены ТКР,

относящиеся к TRBV9 семейству, например, AC, целиакии и некоторых Т-клеточных лимфом и Т-клеточных лейкозов.

Антитела и антиген-связывающие фрагменты настоящего изобретения характеризуются тем, что

1) переменный домен их тяжелой цепи (VH) содержит 3 гиперпеременных участка HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где

HCDR 1 (согласно номенклатуре Kabat) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1,

HCDR 2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2

HCDR 3 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6;

2) переменный домен их легкой цепи (VL) содержит 3 гиперпеременных участка LCDR1, LCDR2 и LCDR3, в которых:

LCDR 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7,

LCDR 2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8,

LCDR 3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

Здесь и далее при определении CDR антител используется известная номенклатура Kabat, если отдельно не оговорено иное.

Антитела согласно изобретению могут быть химерными, гуманизированными или человеческими антителами. В некоторых воплощениях антитела настоящего изобретения содержат собственные человеку константные области и структурные компоненты, но имеют переменный домен, свойственный крысе.

В некоторых воплощениях переменный домен легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No: 11, а переменный домен тяжелой цепи антитела настоящего изобретения имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID No: 13, SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 17, SEQ ID No: 19.

Так же обеспечивается антитело, аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи которого по существу сходна (например, идентична, по крайней мере, на 90%) с последовательностью, показанной в SEQ ID No: 11.

Так же обеспечивается антитело, аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи которого по существу сходна (например, идентична, по крайней мере, на 90%) с последовательностью, выбранной из группы SEQ ID No: 13, SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 17, SEQ ID No: 19.

В некоторых воплощениях антитело согласно изобретению включает легкую цепь, аминокислотная последовательность которой по существу сходна с SEQ ID NO: 29, и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность которой по существу сходна с последовательностью, выбранной из группы SEQ ID No: 21, SEQ ID No: 23, SEQ ID No: 25, SEQ ID No: 27.

В некоторых воплощениях моноклональные тела по изобретению являются полноразмерными антителами IgG человека, например, IgG1 или IgG2 или IgG3 или IgG4.

Также обеспечиваются нуклеиновые кислоты, которые кодируют переменные домены тяжелой и легкой цепи антитела согласно изобретению, нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи антител согласно изобретению и функциональные фрагменты антител.

Также обеспечиваются кассеты экспрессии и экспрессионные векторы, включающие нуклеиновую кислоту настоящего изобретения и регуляторные элементы, необходимые для экспрессии нуклеиновой кислоты в выбранной клетке-хозяине. Вектор или кассета экспрессии могут находиться в клетке-хозяине как внехромосомный элемент или интегрироваться в геном клетки в результате введения (путем трансфекции) указанной кассеты экспрессии или вектора в клетку.

Кроме того, обеспечиваются клетки и стабильные клеточные линии, включающие нуклеиновые кислоты, векторы или экспрессионные кассеты настоящего изобретения, и способы их получения.

Также обеспечивается способ получения вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, заключающийся в культивировании вышеуказанной клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, обеспечивающих продукцию указанного антитела. В некоторых воплощениях способ включает последующее выделение и очистку полученного антитела.

Также обеспечивается фармацевтическая композиция для профилактики или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого участком бета цепи семейства TRBV9 Т рецептора человека, содержащая вышеуказанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

В одном из вариантов фармацевтическая композиция предназначена для профилактики или лечения заболевания или нарушения, выбранного из группы: анкилозирующий спондилит, целиакия, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома.

Также обеспечивается фармацевтическая комбинация для профилактики или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого Т-клеточным рецептором человека, несущим бета цепь семейства TRBV9, содержащая вышеуказанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и, по меньшей мере, одно другое терапевтически активное соединение.

В одном из вариантов фармацевтическая комбинация предназначена для профилактики или лечения заболевания или нарушения, выбранного из группы: анкилозирующий спондилит, целиакия, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома.

В одном из вариантов фармацевтическая комбинация включает другое терапевтически активное соединение, которое выбирают из малой молекулы, антитела или стероидных гормонов, например, кортикостероидов.

Также обеспечивается способ ингибирования биологической активности Т-клеточного рецептора, бета цепь которого относится к семейству TRBV9, у субъекта, нуждающегося в таком ингибировании, включающий введение субъекту эффективного количества вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Также обеспечивается способ лечения заболевания или нарушения, опосредованного Т-клеточным рецептором человека, несущим бета цепь семейства TRBV9, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или вышеуказанной фармацевтической композиции, в терапевтически эффективном количестве.

В одном из вариантов способа лечения заболевания или нарушения, заболевание или нарушение выбрано из группы: анкилозирующий спондилит, целиакия, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома.

Также обеспечивается применение вышеуказанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или вышеуказанной фармацевтической композиции для лечения у субъекта, нуждающегося в таком лечении, заболевания или нарушения, опосредуемого Т-клеточным рецептором человека, несущим бета цепь семейства TRBV9.

В одном из вариантов применения, заболевание выбрано из группы: анкилозирующий спондилит, целиакия, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома.

Технический результат настоящего изобретения состоит в получении новых антител, которые специфически связываются с ТКР, бета цепь которых относится к TRBV9 семейству и могут быть использованы для терапии аутоиммунных и онкологических заболеваний, в патогенез которых вовлечены ТКР, бета цепь которых относится к TRBV9 семейству. Также технический результат состоит в повышении эффективности терапии АС и/или целиакии, которое обеспечивается получением антител, способных

воздействовать непосредственно на аутоиммунные Т-лимфоциты, и в возможности достигать продолжительной ремиссии при АС.

Краткое описание фигур

Фигуры 1–4 показывают двухпараметрические гистограммы распределения клеток моноклеарной фракции крови с использованием моноклонального антитела против CD3 (ось ординат), меченных eFluor 405, и моноклональных антител против TRBV9 (ось абсцисс), меченых FITC: анти-TRBV9-1 (Фиг.1), анти-TRBV9-2 (Фиг.2), анти-TRBV9-3 (Фиг.3), анти-TRBV9-4 (Фиг.4). Каждый вариант моноклонального антитела против TRBV9 был использован в двух концентрациях 270 нг (верхний график) или 27 нг (нижний график) на тест. Специфическая популяция CD3+TRBV9+ обозначена маленьким прямоугольником.

Фигура 5 показывает двухпараметрические гистограммы распределения клеток моноклеарной фракции крови с использованием моноклонального антитела против CD3 (ось ординат), меченных eFluor 405, и моноклональных антител против TRBV9 (ось абсцисс), меченых FITC, после цитотоксического теста: инкубация с анти-TRBV9-2 (опыт) и ремикейд (контроль).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к изолированным моноклональным антителам и их функциональным фрагментам, обладающим способностью специфически связываться с участком бета цепи семейства TRBV9 Т рецептора человека. Также обеспечиваются нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела и их фрагменты по изобретению, кассеты экспрессии и экспрессионные векторы, включающие нуклеиновую кислоту настоящего изобретения и регуляторные элементы, необходимые для экспрессии нуклеиновой кислоты в выбранной клетке-хозяине. Кроме того,

обеспечиваются клетки и стабильные клеточные линии, включающие нуклеиновые кислоты, векторы или экспрессионные кассеты настоящего изобретения. Также обеспечиваются способ получения моноклонального антитела или его функционального фрагмента, фармацевтическая композиция и фармацевтическая комбинация, содержащая в эффективном количестве антитело настоящего изобретения, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами, разбавителями или носителями и способы диагностики и терапии АС и иных заболеваний с использованием антител настоящего изобретения.

Определения

С целью более легкого понимания изобретения сначала определяются некоторые термины.

Следует понимать, что материалы и способы, предлагаемые в данном документе, не ограничиваются конкретными композициями или этапами способа, поскольку они могут варьироваться. Указано, что, как используется в данном описании и приложенной формуле изобретения, формы единственного числа включают и соответствующие формы во множественном числе, если контекст явно не предписывает иное.

«Т-клеточный рецептор», так же указанный как «ТРК», «Т-рецептор» или «TCR» человека представляет собой гетеродимерный белковый комплекс, расположенный на поверхности Т лимфоцита. Этот рецептор присутствует только на Т лимфоцитах. Основная функция ТКР заключается в специфическом распознавание процессированных антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (HLA).

ТКР человека состоит из двух субъединиц, α и β , либо γ и δ цепей, связанных между собой дисульфидной связью и закрепленных в клеточной мембране. Каждая из цепей ТКР имеет N-концевой вариабельный (V) домен, соединительный домен и константный (C) домен, соединенный с

трансмембранным доменом, закрепляющим рецептор в плазматической мембране Т-лимфоцита. Протяженность константного домена альфа и бета цепей составляет 91 и 129 аминокислотных остатков, соответственно. Длина соединительного и трансмембранного домена альфа цепи – 30 и 17 аминокислотных остатков (а.о.), а у бета цепи – 21 и 22 а.о. Протяженность переменных доменов Т-рецепторов варьирует от 104 до 125 а.о.

Небольшая фракция Т-лимфоцитов располагает рецепторами типа γ/δ . По своему устройству они аналогичны α/β рецепторам, но отличаются по первичной структуре и имеют ряд функциональных особенностей. Их вариабельность гораздо ниже (ограниченная клоноспецифичность), они распознают антигены в комплексе с «неклассическими» (не МНС) антигенпредставляющими молекулами или даже свободные антигены.

Т-рецептор взаимодействует с комплексом МНС-антиген шестью участками, определяющими его комплементарность (CDR): три участка альфа цепи и три бета цепи. Эти CDR представляют собой гипервариабельные участки, петли переменных доменов Т-клеточного рецептора – Vальфа и Vбета.

Термины «TRBV9» или «семейство TRBV9» относятся к девятому семейству бета-цепей Т-клеточных рецепторов, выделяемому согласно номенклатуре IMGT, которое характеризуется тем, что аминокислотная последовательность их переменного домена включает уникальные мотивы CDR1 (последовательность аминокислот – S-G-D-L-S) и CDR2 (последовательность аминокислот – Y-Y-N-G-E-E). Термин «ТКР семейства TRBV9» обозначает Т-клеточный рецептор, бета-цепь которого относится к TRBV9 семейству.

Термин «патологический» по отношению к Т-лимфоцитам или ТКР означает, что данное ТКР или Т-лимфоцит, его несущий, ассоциированы с заболеванием или патологией и/или являются причиной заболевания и/или способствуют развитию заболевания.

Термин «аутоиммунный» по отношению к ТКР означает, что данное ТКР вовлечено в развитие аутоиммунного заболевания.

Термин «антитело», используемый здесь, предназначен для определения молекулы иммуноглобулина, состоящей из четырех полипептидных цепей (две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи), связанных дисульфидными связями. Легкие цепи классифицируют как каппа или лямбда. Тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, и они определяют изотип антитела, такой как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно, и несколько из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Каждый тип тяжелой цепи характеризуется конкретным константным участком.

Каждая тяжелая цепь содержит переменный участок тяжелой цепи (сокращенный здесь как HCVR или VH) и константный участок тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи содержит три домена CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи (сокращенный здесь как LCVR или VL) и константный участок легкой цепи. Константный участок легкой цепи содержит один домен CL. Участки VH и VL могут далее подразделяться на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), окруженные участками, которые являются более консервативными, называемыми скелетными участками (FR). Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR участков, расположенных от амино- до карбоксильного конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

В данной заявке 3 CDR тяжелые цепи обозначены как "CDRH1, CDRH2 и CDRH3", а 3 CDR легкой цепи обозначены как "CDRL1, CDRL2 и CDRL3". CDR содержат большинство остатков, которые образуют специфические взаимодействия с антигеном. Нумерацию и позиционирование CDR-аминокислотных остатков в пределах HCVR и LCVR участков антител согласно данному изобретению осуществляют с хорошо известной

номенклатурой Kabat, если не указано иного. В настоящей заявке используется, если не указано иного, общепринятые буквенные обозначения аминокислот.

Термины «анти-TRBV9-антитело», «антитело к TRBV9», «антитело, специфически связывающееся с бета цепью семейства TRBV9» или «антитело против бета цепи семейства TRBV9» и им подобные являются взаимозаменяемыми в контексте настоящей заявки и относятся к антителу, которое специфически связывается с эпитопом бета цепи семейства TRBV9 Т-клеточного рецептора человека.

Термины «антитело» и «моноклональное антитело» для нужд настоящей заявки относятся к моноклональному антителу против ТКР семейства TRBV9. Как используется в настоящей заявке «моноклональное антитело» относится к антителу грызуна, семейства приматов или Camelidae, предпочтительно к антителу мыши, макаки, верблюда или ламы, химерному антителу, гуманизированному антителу или полностью человеческому антителу, если не указано иное.

Вариабельные участки каждой из пар легкая/тяжелая цепь образуют антигенсвязывающие сайты антитела. Как используется в данной заявке, "антигенсвязывающая часть", или "антигенсвязывающий участок", или "антигенсвязывающий домен" или «антигенсвязывающий центр» относятся, взаимозаменяемо, к такой части молекулы антитела, которая содержит аминокислотные остатки, взаимодействующие с антигеном и придающие антителу его специфичность и аффинность по отношению к антигену. Эта часть антитела включает "каркасные" аминокислотные остатки, необходимые для поддержания надлежащей конформации антигенсвязывающих остатков.

Термин "человеческое антитело", используемый здесь, означает антитело, в котором последовательности вариабельных и константных доменов происходят от человеческих последовательностей. Человеческие антитела, соответствующие изобретению, могут включать остатки

аминокислот, нехарактерные для человека (например, мутации, интродуцированные ненаправленным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и особенно в CDR3.

Термин «гуманизированные» по отношению к антителам используются для обозначения антител, которые характеризуются наличием свойственных человеку константных областей и структурных компонентов, но имеют обуславливающие комплементарность участки (CDR), которые свойственны иммуноглобулинам иного происхождения или соответствующим фрагментам модифицированных антител.

Термин «химерные» по отношению к антителам настоящего изобретения используются для обозначения антител, которые характеризуются наличием свойственных человеку константных областей, но имеют переменные домены иного происхождения. В таких антителах переменные домены легких и/или тяжелых цепей, имеющие нечеловеческое происхождение (например, взятые из крысы), оказываются оперативно связаны с константными доменами соответствующих цепей человеческого происхождения.

Термин «оперативно связанный» или ему подобный при описании антител относится к полипептидным последовательностям, которые находятся в физической (ковалентной, если не указано иного) и функциональной связи одна с другой. В наиболее предпочтительных воплощениях, функции полипептидных компонентов химерной молекулы не изменены по сравнению с функциональными свойствами выделенных полипептидных компонентов. Термин "оперативно связанный" или ему подобный при описании нуклеиновых кислот означает, что нуклеиновые кислоты ковалентно связаны таким образом, что в местах их соединения отсутствуют «сбойки» рамки считывания и стоп-кодона. Как очевидно для любого специалиста в данной области техники, нуклеотидные

последовательности, кодирующие химерный белок, включающий "оперативно связанные" компоненты (белки, полипептиды, линкерные последовательности, белковые домены и т.д.), состоят из фрагментов, кодирующих указанные компоненты, где эти фрагменты ковалентно связаны таким образом, что в ходе трансляции и транскрипции нуклеотидной последовательности продуцируется полноразмерный химерный белок, например, химерное антитело согласно изобретению.

Как здесь используется, термины «изолированный» и «выделенный» означают молекулу или клетку, которые находятся в среде, отличной от среды, в которой молекула или клетка находятся в естественных условиях.

В предпочтительных воплощениях антитела настоящего изобретения являются рекомбинантными, то есть полученными с помощью техники рекомбинантных ДНК. Термин «рекомбинантное антитело», используемый здесь, включает все антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами, такие как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, введенного в клетку-хозяин, антитела, выделенные из набора известных рекомбинантных комбинаторных человеческих антител, антитела, выделенные из животного, которое является трансгенным в отношении генов человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor L.D. et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295). В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантные человеческие антитела подвергают мутагенезу *in vitro* (или, если используют животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности участков VH и VL рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, поскольку они выделены из последовательностей зародышевых VH и VL человека и близки к ним, не могут в естественных условиях существовать в зародышевом наборе антител человека *in vivo*.

Термин «специфически связывает», как используется в данной заявке, относится к той ситуации, при которой один участник пары специфического связывания не связывает в значительной степени молекулы, отличные от его партнера (партнеров) по специфическому связыванию. Термин также применим, когда, например, антигенсвязывающий домен антитела по изобретению является специфическим для конкретного эпитопа, который переносится рядом антигенов, в таком случае специфическое антитело, имеющее антигенсвязывающий домен, будет способно к специфическому связыванию различных антигенов, несущих эпитоп. Соответственно, моноклональное антитело по изобретению специфически связывает эпитоп бета цепи Т клеточного рецептора человека, относящегося к семейству TRBV9, в то время как оно специфически не связывает бета-цепи ТКР других семейств и альфа цепи ТКР.

Термин «эпитоп» относится к той части молекулы, которая способна распознаваться и связываться с антителом в одном или более антигенсвязывающих участках антитела. Эпитопы часто состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи, и обладают специфическими трехмерными структурными характеристиками, а также специфическими зарядовыми характеристиками.

Термин «эпитоп», как используется в данной заявке, кроме того, относится к части полипептида, которая обладает антигенной и/или иммуногенной активностью у животного, предпочтительно млекопитающего, например, мыши, крысы или человека. Термин «антигенный эпитоп», как используется в данной заявке, определяется как часть полипептида, с которой может специфически связываться антитело, определенная любым способом, хорошо известным из уровня техники, например, при помощи традиционного иммунного анализа. Антигенные эпитопы не обязательно должны быть иммуногенными, но могут также быть иммуногенными. «Иммуногенный

эпитоп», как используется в данной заявке, определяется как часть полипептида, который вызывает отклик антитела у животного, как устанавливается любым способом, известным из уровня техники. «Нелинейный эпитоп» или "конформационный эпитоп" содержат несмежные полипептиды (или аминокислоты) в пределах антигенного протеина, с которым антитело, специфическое к эпитопу, связывается.

Выражения «биологическое свойство» или «биологическая характеристика» или термины «активность» или «биоактивность по отношению к антителу и его функциональным фрагментам по изобретению используются в данной заявке как взаимозаменяемые и включают, но не ограничиваются приведенными, эпитоп/антигенную аффинность и специфичность, способность ингибировать или быть антагонистом активности ТКР, в состав которого входит бета цепь, принадлежащая к семейству TRBV9.

Остальные идентифицируемые из уровня техники биологические свойства или характеристики антитела включают, например, перекрестную реактивность (т.е. с нечеловеческими гомологами пептида-мишени или с остальными протеинами или мишенями, в общем), и способность сохранять высокие уровни экспрессии протеина в клетках млекопитающих. Вышеуказанные свойства или характеристики могут наблюдаться, измеряться или оцениваться с использованием методик, признанных в уровне техники, включая, но не ограничиваясь, приведенными, анализ ELISA, конкурентный анализ ELISA, BIACORE или анализ поверхностного плазмонного резонанса KINEXA, анализы ингибирования *in vitro* или *in vivo* без ограничений, рецепторного связывания, продуцирования и/или секреции цитокина или фактора роста, сигнальную трансдукцию и иммуногистохимию срезов тканей, полученных из различных источников, включая человека, примата или любой другой источник.

Термины «ингибировать» или «нейтрализовать», как используется в данной заявке, по отношению к активности антитела по изобретению, означают способность в значительной степени противодействовать, препятствовать, предотвращать, ограничивать, замедлять, прерывать, уничтожать, прекращать, уменьшать, например, развитие или тяжесть того, что ингибируют, включая, но, не ограничиваясь вышеприведенными, биологическую активность антитела или свойство, заболевание или состояние.

Как здесь используется, термин «мутант» или «вариант» относятся к антителу, раскрытому в настоящем изобретении, в котором одна или более аминокислот добавлены и/или замещены и/или удалены (делетированы) и/или вставлены (инsertированы) в N-конец и/или C-конец, и/или в пределах нативных аминокислотных последовательностей антител настоящего изобретения или их фрагментов. Как здесь используется, термин «мутант» также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует мутантный белок. Кроме того, термин «мутант» относится к любому варианту, который короче или длиннее белка или нуклеиновой кислоты.

Термин "гомология" используется для описания взаимосвязи последовательностей нуклеотидов или аминокислот с другими последовательностями нуклеотидов или аминокислот, которая определена степенью идентичности и/или сходства между указанными сравниваемыми последовательностями.

Как здесь используется, аминокислотная или нуклеотидная последовательности «по существу сходны» или «по существу такие же» как референсная последовательность, если аминокислотная или нуклеотидная последовательности имеют, по крайней мере, 70% идентичности с указанной последовательностью внутри выбранного для сравнения региона. Таким образом, по существу сходные последовательности включают те, которые имеют, например, по крайней мере, 75% идентичности, например, по крайней

мере, 80% идентичности, по крайней мере, 85% идентичности, по крайней мере, 90% идентичности (например, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98% или 99% идентичности). Две последовательности, которые идентичны одна другой, так же по существу сходны.

Идентичность последовательностей определяется на основании референсной последовательности. Алгоритмы для анализа последовательности известны в данной области, такие как IgBLAST, описанный в Ye et al. *Nucleic Acids Res.* 2013, W34-40. Для целей настоящего изобретения для определения уровня идентичности и сходства между нуклеотидными последовательностями и аминокислотными последовательностями может быть использовано сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, производимое с помощью пакета программ IgBLAST, предоставляемого National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) с использованием содержащего разрывы выравнивания со стандартными параметрами. Для вычисления процента идентичности используется полная длина референсной последовательности, например, вариабельного региона.

Ссылка на нуклеотидную последовательность "кодирующую" полипептид означает, что с нуклеотидной последовательности в ходе трансляции и транскрипции мРНК продуцируется этот полипептид. При этом может быть указана как кодирующая цепь, идентичная мРНК и обычно используемая в списке последовательностей, так и комплементарная цепь, которая используется как матрица при транскрипции. Как очевидно для любого специалиста в данной области техники, термин так же включает любые вырожденные нуклеотидные последовательности кодирующие одинаковую аминокислотную последовательность. Нуклеотидная последовательности, кодирующие полипептид, включают последовательности, содержащие интроны.

Антитела

Как указано выше, настоящее изобретение относится к изолированным моноклональным антителам и их функциональным фрагментам, обладающим способностью специфически связываться с участком бета цепи семейства TRBV9 Т рецептора человека.

Антитела согласно изобретению характеризуются тем, что

а) переменный домен их тяжелой цепи (VH) содержит 3 гиперпеременных участка HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где

Антитела настоящего изобретения характеризуются тем, что

а) переменный домен их тяжелой цепи (VH) содержит 3 гиперпеременных участка HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где

HCDR1 имеет (согласно номенклатуре Kabat) аминокислотную последовательность DYLVH (SEQ IN No 1);

HCDR2 имеет аминокислотную последовательность WINTYTGTPYADDFEG (SEQ IN No 2);

HCDR3 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы SWRRGLRGLGFDY (SEQ ID No 3), SWRRGLRGIGFDY (SEQ ID No 4), SWRRGIRGLGFDY (SEQ ID No 5), SWRRGIRGIGFDY (SEQ ID No 6);

б) переменный домен их легкой цепи (VL) содержит 3 гиперпеременных участка LCDR1, LCDR2 и LCDR3, в которых:

LCDR1 имеет аминокислотную последовательность KASKSINKYLA (SEQ ID No 7);

LCDR2 имеет аминокислотную последовательность DGSTLQS (SEQ ID No 8);

LCDR3 имеет аминокислотную последовательность QQHNEYPT (SEQ ID No 9).

Антитела согласно изобретению могут быть химерными, гуманизированными или человеческими антителами, или их антигенсвязывающими фрагментами и могут использоваться в качестве

лекарственного средства для лечения болезни Бехтерева и других заболеваний, в патогенез которых вовлечены ТКР, относящиеся к TRBV9 семейству, например, целиакии или Т-клеточной лимфомы.

Моноклональные антитела по изобретению могут быть получены с использованием, например, гибридомных методик, хорошо известных из уровня техники, а также рекомбинантных технологий, технологий фагового дисплея, синтетических технологий или комбинаций таких технологий или других технологий, хорошо известных из уровня техники. Термин «моноклональное антитело», используемый в данной заявке, относится к антителу, полученному из единой копии или клона, включая, например, любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, а не к способу его получения.

Гуманизированные и химерные антитела могут быть получены пептидным синтезом или с использованием техники рекомбинантных ДНК как описано ниже в разделе «Нуклеиновые кислоты».

В некоторых воплощениях антитела настоящего изобретения являются химерными и характеризуются тем, что имеют переменные домены легкой и тяжелой цепей нечеловеческого происхождения (например, крысиного или мышинного), а константные домены, характерные для человека. В некоторых воплощениях антитела настоящего изобретения характеризуются тем, что имеют аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи, выбранную из группы SEQ ID No 13, SEQ ID No 15, SEQ ID No 17, SEQ ID No 19 и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи, показанную в SEQ ID No 11. При этом в предпочтительных воплощениях антитело содержит константный участок тяжелой цепи, такой как константный участок IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, IgD человека. Предпочтительно константным участком тяжелой цепи является константный участок тяжелой цепи IgG1 человека. Более того, антитело может содержать как константный участок легкой цепи либо каппа-константный участок легкой

цепи, либо лямбда-константный участок легкой цепи. Предпочтительно антитело содержит каппа-константный участок легкой цепи.

Примеры аминокислотных последовательностей тяжелых цепей антител анти-TRBV9-1, анти-TRBV9-2, анти-TRBV9-3 или анти-TRBV9-4 согласно изобретению показаны в SEQ ID No 21, 23, 25 и 27, соответственно. Пример аминокислотной последовательности легкой цепи антител показан в SEQ ID No: 29.

В некоторых воплощениях аминокислотные последовательности каркасных участков переменных доменов антитела или их части являются главным образом человеческими по происхождению и, следовательно, «гуманизированными антителами». Эта «гуманизация» считается полезной в снижении иммуногенности указанного антитела при терапевтическом назначении пациентам. Определенные выбранные аминокислотные остатки в каркасных участках остаются крысиными, а не человеческими.

В некоторых воплощениях антитела настоящего изобретения и их антигенсвязывающие фрагменты включают переменные домены легких цепей, аминокислотные последовательности которых по существу сходны с аминокислотной последовательностью SEQ ID No 11, например, идентичны с ней по крайней мере, на 90%, чаще по крайней мере на 93%, как правило на 94% или выше (предпочтительно на 95% или выше, на 96% или выше; на 97% или выше, на 98% или выше, на 99% или выше или на 99,5% или выше).

В некоторых воплощениях антитела настоящего изобретения и их антигенсвязывающие фрагменты включают переменные домены тяжелых цепей, аминокислотные последовательности переменных доменов которых по существу сходны с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы SEQ ID No 15, SEQ ID No 17, SEQ ID No 19. Например, имеют аминокислотную последовательность идентичную последовательности, выбранной из группы SEQ ID No 13, SEQ ID No 15, SEQ ID No 17, SEQ ID No 19, по крайней мере, на 90%, чаще по крайней мере на 93%, как правило на

94% или выше (предпочтительно на 95% или выше, на 96% или выше; на 97% или выше, на 98% или выше, на 99% или выше или на 99,5% или выше).

В некоторых воплощениях антитело настоящего изобретения включает тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную (например на 93% идентичную или выше, на 94% или выше, на 95% или выше, на 96% или выше; на 97% или выше, на 98% или выше, на 99% или выше или на 99,5% или выше) последовательности, выбранной из группы SEQ ID No: 21, SEQ ID No: 23, SEQ ID No: 25, SEQ ID No: 27 и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную (например на 93% идентичную или выше, на 94% или выше, на 95% или выше, на 96% или выше; на 97% или выше, на 98% или выше, на 99% или выше или на 99,5% или выше) последовательности SEQ ID NO: 29.

Из уровня техники известно, что в последовательности антител, включая переменные домены, могут быть внесены мутации, которые не затрагивают по существу способность антитела связываться с антигеном. Антитела согласно настоящему изобретению могут также содержать дополнительные мутации, которые не приводят к потере способности антитела связывать бета-цепь ТКР семейства TRBV9, но могут приводить к снижению антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности или увеличению аффинности или других биологических свойств антител. В частности, из уровня техники хорошо известно, что в последовательности антител могут быть внесены консервативные замены аминокислот. Под "консервативной заменой" в контексте заявки подразумевается замена, при которой остаток аминокислоты замещается другим остатком аминокислоты, имеющим близкую боковую цепь. Семейства остатков аминокислот, имеющих близкие боковые цепи, определены в уровне техники, в том числе основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные

боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), β -разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Предпочтительно в участки CDR3 в доменах VL и/или VH делают не более пяти консервативных замен аминокислот, чаще не более трех консервативных замен. Как правило, консервативные замены не делают в положениях аминокислот, критических для связывания эпитопа бета цепи семейства TRBV9.

Описанные выше варианты (мутанты) антител согласно изобретению могут быть получены пептидным синтезом или с использованием техники рекомбинантных ДНК как описано ниже в разделе «Нуклеиновые кислоты».

Так же обеспечиваются антигенсвязывающие фрагменты антител настоящего изобретения. Термин "антиген-связывающий фрагмент" антитела (или «функциональный фрагмент антитела» или «активный фрагмент антитела»), используемый здесь, относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связывать антиген. Показано, что антиген-связывающая функция антитела может быть осуществлена фрагментами антитела полной длины. Примеры связывающих фрагментов, охватываемые термином "антиген-связывающий фрагмент" антитела включают (а) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (б) фрагмент F(ab')₂, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанные дисульфидным мостиком в районе петли; (в) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (г) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; (д) фрагмент dAb (Ward et al. (1989) Nature 341:544-546), который состоит из домена VH, и (е) выделенный участок (CDR), определяющий комплементарность. Более того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, они

могут быть рекомбинантными способами связаны с помощью синтетического линкера, который обеспечивает их получение в виде одной белковой цепи, в которой участки VL и VH спарены с образованием моновалентных молекул (известных как Fv одной цепи (scFv); см., например, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Предполагается, что такие антитела из одной цепи также охватываются термином "антиген-связывающий фрагмент" антитела. К ним относятся также другие формы антител из одной цепи, такие как диатела. Диатела являются бивалентными, биспецифическими антителами, в которых домены VH и VL экспрессируются на одной полипептидной цепи, но с использованием линкера, который является слишком коротким, чтобы позволять спаривание двух доменов на одной и той же цепи, что заставляет домены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антиген-связывающих сайта (см., например, Holliger P. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak R.J. et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Фрагменты антител, такие как Fab F(ab')₂, могут быть получены из целых антител с использованием принятых способов, таких как разложение папаином или пепсином, соответственно, целых антител. Более того, антитела, фрагменты антител и молекулы иммуноадгезии могут быть получены с использованием стандартных способов с применением рекомбинантной ДНК.

Антитело или его антиген-связывающий фрагмент могут быть частью более крупных молекул иммуноадгезии, образованных ковалентной или нековалентной связью антитела или фрагмента антитела с одним или более белком или пептидом. Примеры таких молекул иммуноадгезии включают использование участка ядра стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov S.M. et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) и использование остатка цистеина, маркерного пептида и С-концевой полигистидиновой метки для получения бивалентных и уменьшенных биомолекул scFv (Kipriyanov S.M. et al. (1994) *Mol. Immunol.*,

31:1047-1058). Другие химические связывания фрагментов антител также хорошо известны из уровня техники.

Антитела и их функциональные фрагменты согласно изобретению находятся в изолированной форме, то есть это означает, что данный белок по существу свободен от присутствия других белков или других природных биологических молекул, таких как олигосахариды, нуклеиновые кислоты и их фрагмента и т.п., где термин «по существу свободен» в данном случае означает, что менее чем 70%, обычно менее чем 60% и чаще менее чем 50% указанной композиции, содержащей выделенный белок, представляет собой другую природную биологическую молекулу. В некоторых вариантах указанные белки присутствуют по существу в очищенной форме, где термин «по существу очищенная форма» обозначает чистоту, равную, по меньшей мере, 95%, обычно равную по меньшей мере 97% и чаще равную по меньшей мере 99%.

Способы очистки антитела, полученного путем рекомбинантной или гибридомной хорошо известны из уровня техники, например, очистка может быть осуществлена путем хроматографии (например, ионообменной, аффинной, особенно аффинной для специфичных антигенов - белка А или белка G, и колоночной хроматографией размеров), центрифугирования, дифференциальной растворимости, или любой другой стандартной методикой для очистки белков. Кроме того, антитела по технологии в соответствии с настоящим изобретением или их фрагменты могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями (например, гистидиновой меткой) для облегчения очистки.

Аффинность антитела можно определять с применением стандартного анализа через определение константы диссоциации (KD). KD вычисляется через уравнение $KD = k_d / k_{on}$, где k_d – экспериментально вычисляемая константа скорости диссоциации и k_{on} – экспериментально вычисляемая константа скорости ассоциации комплекса антитело-антиген.

Предпочтительными антителами являются те, которые связывают антиген человека со значением KD не более чем приблизительно 1×10^{-7} M; предпочтительно не более чем приблизительно 1×10^{-8} M; чаще не более чем приблизительно 1×10^{-9} M; более предпочтительно не более чем приблизительно 1×10^{-10} M, и наиболее предпочтительно не более чем приблизительно 1×10^{-11} M, например, не более чем приблизительно 1×10^{-12} M.

К предпочтительным антителам относятся антитела анти-TRBV9-1, анти-TRBV9-2, анти-TRBV9-3 или анти-TRBV9-4, отличающиеся последовательностью CDR3 и описанные в деталях в экспериментальной части, ниже.

Антитела и их фрагменты, которые можно использовать в настоящих композициях и способах, являются биологически активными антителами и фрагментами, то есть способны связывать желаемые антигенные эпитопы и проявлять биологический эффект непосредственно или опосредованно.

Антитела и их функциональные фрагменты согласно изобретению способны специфически связывать эпитоп (участок) бета цепи семейства TRBV9. В преимущественных воплощениях в результате их специфического связывания с бета цепью семейства TRBV9 происходит ингибирование активности ТКР, включающих указанную бета цепь. Как правило, ингибирование составляет предпочтительно, по крайней мере, приблизительно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% или выше.

В некоторых вариантах осуществления антитело против бета цепи семейства TRBV9 согласно изобретению или его фрагмент может элиминировать Т-лимфоциты, несущие ТЕР, содержащий бета-цепь семейства TRBV9. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент согласно изобретению может обеспечивать, по меньшей мере, приблизительно 20%, по меньшей мере, приблизительно 30%, по меньшей мере, приблизительно 40%, по меньшей мере, приблизительно 50%, по меньшей мере, приблизительно 60%, по меньшей мере, приблизительно 70%, по

меньшей мере, приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере, приблизительно 95% или приблизительно 100% элиминацию Т-лимфоцитов.

Нуклеиновые кислоты

Настоящее изобретение обеспечивает молекулы нуклеиновых кислот кодирующие тяжелую и легкую цепи антитела настоящего изобретения, их функциональные фрагменты и переменные домены, которые могут быть использованы для получения химерных антител, включающих переменные домены по изобретению, оперативно слитые с известными константными доменами антител человека.

В преимущественных воплощениях нуклеиновая кислота по изобретению кодирует тяжелую цепь антитела, переменный домен которой содержит 3 гиперпеременных участка HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где

HCDR1 (согласно номенклатуре Kabat) имеет аминокислотную последовательность SEQ IN No 1;

HCDR2 имеет аминокислотную последовательность SEQ IN No 2;

HCDR3 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6.

В преимущественных воплощениях нуклеиновая кислота по изобретению кодирует легкую цепь антитела, переменный домен которой содержит 3 гиперпеременных участка LCDR1, LCDR2 и LCDR3, в которых:

LCDR1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No 7;

LCDR2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No 8;

LCDR3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No 9.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие гомологи и мутанты указанных цепей антител, их функциональных фрагментов и доменов также находятся в рамках настоящего изобретения.

В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь антитела, вариабельный домен которой содержит аминокислотную последовательность по существу сходную с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11; например, идентичны с ней по крайней мере, на 90%, чаще по крайней мере на 93%, как правило на 94% или выше (предпочтительно на 95% или выше, на 96% или выше; на 97% или выше, на 98% или выше, на 99% или выше или на 99,5% или выше).

В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь антитела, вариабельный домен которой содержит аминокислотную последовательность по существу сходную с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы SEQ ID No 13, SEQ ID No 15, SEQ ID No 17, SEQ ID No 19; например, идентичны с ней по крайней мере, на 90%, чаще по крайней мере на 93%, как правило на 94% или выше (предпочтительно на 95% или выше, на 96% или выше; на 97% или выше, на 98% или выше, на 99% или выше или на 99,5% или выше).

В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты, кодируют легкую цепь антитела, содержащую вариабельный домен, аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID No 11 и тяжелую цепь антитела, содержащую вариабельный домен, аминокислотная последовательность которого выбрана из группы SEQ ID No 13, SEQ ID No 15, SEQ ID No 17, SEQ ID No 19.

В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота кодирует вариабельные домены, аминокислотные последовательности которых представлены в SEQ ID No 11, 13, 15, 19, которые могут быть использованы для оперативного слияния с нуклеиновыми кислотами, кодирующие соответствующие константные домены антител.

Примеры специфических типов молекул нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, раскрывается более детально ниже в экспериментальной части.

Как здесь используется, молекула нуклеиновой кислоты - это молекула ДНК, такая как геномная ДНК или кДНК молекула, или молекула РНК, такая как молекула мРНК. В некоторых воплощениях, молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения – это ДНК (или кДНК) молекула, содержащая открытую рамку считывания, которая кодирует антитело или фрагмент антитела настоящего изобретения и способна в подходящих условиях (например, физиологические внутриклеточные условия) быть использована для экспрессии в гетерологической системе экспрессии.

В некоторых воплощениях молекула нуклеиновой кислоты настоящего изобретения получена методами генной инженерии. Способы получения нуклеиновых кислот хорошо известны из области техники. Например, доступность информации о последовательности аминокислот или информации о нуклеотидной последовательности дает возможность изготовить выделенные молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения с помощью олигонуклеотидного синтеза. В случае информации о последовательности аминокислот, может быть синтезировано несколько нуклеиновых кислот отличающихся друг от друга вследствие вырожденности генетического кода. Методы выбора вариантов кодонов для требуемого хозяина хорошо известны в данной области.

Синтетические олигонуклеотиды могут быть приготовлены с помощью фосфорамидитного метода, и полученные конструкторы могут быть очищены с помощью методов хорошо известных в данной области, таких как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) или других методов как описано, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., (1989) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, и по инструкции, описанной в, например, United States Dept. of HHS, National Institute of Health (NIH) *Guidelines for Recombinant DNA Research*. Длинные двухцепочечные молекулы ДНК настоящего изобретения могут быть синтезированы следующим образом: могут быть синтезированы несколько

меньших фрагментов с необходимой комплементарностью, которые содержат подходящие концы, способные к когезии с соседним фрагментом. Соседние фрагменты могут быть сшиты с помощью ДНК-лигазы или метода, основанного на ПЦР.

Молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящего изобретения могут быть также клонированы из биологических источников.

Настоящее изобретение так же охватывает нуклеиновые кислоты, которые гомологичны, по существу сходны, идентичны, или получены из нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды настоящего изобретения.

Нуклеиновые кислоты изобретения находятся в среде, отличной от среды, в которой они находятся в естественных условиях, например, они выделены, представлены в увеличенном количестве, находятся или экспрессированы в системах *in vitro* или в клетках или организмах, отличных от тех, в которой они находятся в естественных условиях.

Изменения или различия в нуклеотидной последовательности между высоко сходными нуклеотидными последовательностями могут представлять нуклеотидные замены в последовательности, которые возникают в процессе нормальной репликации или дупликации. Другие замены могут быть специально рассчитаны и вставлены в последовательность для определенных целей таких, как изменение кодонов определенных аминокислот или нуклеотидной последовательности регуляторного региона. Такие специальные замены могут быть произведены *in vitro* с помощью различных технологий мутагенеза или получены в организмах-хозяевах, находящихся в специфических селекционных условиях, которые индуцируют или отбирают эти изменения. Такие специально полученные варианты последовательности могут быть названы "мутантами" или "производными" исходной последовательности.

Мутантные или производные нуклеиновые кислоты могут быть получены на матричной нуклеиновой кислоте, выбранной из вышеописанных

нуклеиновых кислот, путем модификации, делеции или добавления одного или более нуклеотидов в матричной последовательности или их комбинации, для получения варианта матричной нуклеиновой кислоты. Модификации, добавления или делеции могут быть выполнены любым способом, известным в данной области (см. например, Gustin et al., *Biotechniques* (1993) 14: 22; Barany, *Gene* (1985) 37: 111-123; и Colicelli et al., *Mol. Gen. Genet.* (1985) 199:537-539, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (1989), CSH Press, pp. 15.3-15.108), включая подверженный ошибкам ПЦР (error-prone PCR), shuffling, олигонуклеотид-направленный мутагенез, ПЦР со сборкой, парный ПЦР мутагенез, мутагенез *in vivo*, кассетный мутагенез, рекурсивный множественный мутагенез, экспоненциальный множественный мутагенез, сайт-специфический мутагенез, случайный мутагенез, геномная реассемблирование (gene reassembly), геномный сайт-насыщающий мутагенез (GSSM), искусственная перестройка с лигированием (SLR) или их комбинации. Модификации, добавления или делеции могут быть также выполнены методом, включающим рекомбинацию, рекурсивную рекомбинацию последовательностей, фосфотиоат-модифицированный мутагенез ДНК, мутагенез на урацил-содержащей матрице, мутагенез с двойным пропуском, точечный восстановительный по рассогласованию мутагенез, мутагенез штамма, дефицитного по восстановлению, химический мутагенез, радиоактивный мутагенез, делетационный мутагенез, рестрикционно-избирательный мутагенез, рестрикционный мутагенез с очисткой, синтез искусственных генов, множественный мутагенез, создание химерных множественных нуклеиновых кислот и их комбинации.

Также обеспечиваются вырожденные варианты нуклеиновых кислот, которые кодируют белки настоящего изобретения. Вырожденные варианты нуклеиновых кислот включают замены кодонов нуклеиновой кислоты на другие кодоны, кодирующие те же самые аминокислоты. В частности, вырожденные варианты нуклеиновых кислот создаются, чтобы увеличить

экспрессию в клетке-хозяине. В этом воплощении, кодоны нуклеиновой кислоты, которые не являются предпочтительными или являются менее предпочтительными в генах клетки-хозяина, заменены кодонами, которые обильно представлены в кодирующих последовательностях генов в клетке-хозяине, где указанные замененные кодоны кодируют ту же самую аминокислоту. Оптимизация генетического кода хорошо известна из уровня техники.

Вышеуказанные модификации не изменяют по существу свойства антител и их функциональных фрагментов, но могут облегчать белковый фолдинг в клетке-хозяине, снижать способность к агрегации или модулировать другие биохимические свойства белков, например, полупериод распада. В некоторых воплощениях, эти модификации не изменяют биохимические свойства белка. Все виды модификаций и мутаций, указанные выше, осуществляются на уровне нуклеиновой кислоты.

Заявленные нуклеиновые кислоты могут быть выделены и получены по существу в очищенной форме. По существу очищенная форма означает, что нуклеиновые кислоты являются, по меньшей мере, приблизительно на 50% чистыми, обычно, по меньшей мере, приблизительно на 90% чистыми и обычно являются "рекомбинантными", то есть, фланкированы одним или более нуклеотидами, с которыми она обычно не связана в хромосоме, встречающейся в природе в ее естественном организме-хозяине.

Также обеспечиваются нуклеиновые кислоты, которые кодируют слитые белки, включающие белок настоящего изобретения, или их фрагменты, которые ниже рассматриваются более детально. Нуклеиновые кислоты, кодирующие переменные домены по изобретению могут быть оперативно слиты с нуклеиновыми кислотами, кодирующими соответствующие константные домены легкой и тяжелой цепи антитела. Нуклеиновые кислоты, кодирующие легкую и тяжелую цепи антитела, могут быть оперативно слиты с нуклеиновыми кислотами, кодирующими лидерный пептид,

обеспечивающий транспорт продуктов экспрессии из клетки-хозяина. Лидерный пептид впоследствии отщепляется во время созревания полипептида.

Также обеспечиваются вектор и другие конструкции нуклеиновой кислоты, содержащие заявленные нуклеиновые кислоты. Термин "вектор" включает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она оперативно связана. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены, в то время как остальные векторы могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина и, таким образом, реплицированы наряду с геномом-хозяином. Более того, определенные векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они оперативно связаны. Такие векторы имеют в данной заявке название "векторы рекомбинантной экспрессии" (или, упрощенно, «векторы экспрессии» или «экспрессионные векторы»), а иллюстративные векторы хорошо известны из уровня техники. Подходящие векторы включают вирусные и невирусные векторы, плазмиды, космиды, фаги и т.д., предпочтительно плазмиды, и используются для клонирования, амплификации, экспрессии, переноса и т.д., последовательности нуклеиновой кислоты настоящего изобретения в подходящего хозяина. Выбор подходящего вектора является понятным для квалифицированного специалиста в данной области. Полноразмерная нуклеиновая кислота или ее часть обычно вставляются в вектор посредством прикрепления ДНК-лигазой к расщепленному ферментами рестрикции сайту в векторе. Альтернативно, желательная нуклеотидная последовательность может быть вставлена гомологичной рекомбинацией *in vivo*, обычно, присоединением гомологичных участков к вектору на флангах желательной нуклеотидной последовательности. Гомологичные участки добавляются лигированием олигонуклеотидов или полимеразной цепной реакцией, с использованием праймеров, включающих, например, как гомологичные

участки, так и часть желательной нуклеотидной последовательности. Вектор, как правило, имеет ориджин репликации, обеспечивающий его размножение в клетках-хозяевах в результате его введения в клетку как внехромосомного элемента. Вектор также может содержать регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине и получение целевого полипептида. В экспрессионном векторе, указанная нуклеиновая кислота является оперативно связанной с регуляторной последовательностью, которая может включать промоторы, энхансеры, терминаторы, операторы, репрессоры и индукторы, а также стартовый кодон полипептида. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота по изобретению нуклеиновая кислота также оперативно связана с лидерным пептидом, обеспечивающим выделение продукта экспрессии из клетки-хозяина во внеклеточное пространство.

Также обеспечиваются кассеты экспрессии или системы, использованные *inter alia* для получения заявленных полипептидов (например, легкой и тяжелой цепей антитела по изобретению) на их основе или для репликации заявленных молекул нуклеиновой кислоты. Кассета экспрессии может существовать как внехромосомный элемент или может быть включена в геном клетки в результате введения указанной кассеты экспрессии в клетку. Для экспрессии белковый продукт, кодируемый нуклеиновой кислотой изобретения, экспрессируется в любой удобной системе экспрессии, включая, например, бактериальные системы, дрожжи, растения, насекомых, земноводных или клетки млекопитающих. В кассете экспрессии целевая нуклеиновая кислота оперативно соединяется с регуляторными последовательностями, которые могут включать промоторы, энхансеры, терминирующие последовательности, операторы, репрессоры и индукторы, а также стартовый кодон полипептида. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота по изобретению нуклеиновая кислота также оперативно связана с лидерным пептидом, обеспечивающим выделение продукта экспрессии из

клетки-хозяина во внеклеточное пространство. Способы получения кассет или систем экспрессии, способных экспрессировать желательный продукт, известны специалистам в данной области.

Вышеописанные системы экспрессии могут использоваться в прокариотических или эукариотических хозяевах. Для получения белка могут использоваться клетки-хозяева, такие как *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, клетки насекомого в комбинации с бакуловирусными векторами, или клетки высшего организма, не являющиеся эмбриональными клетками человека, такие как дрожжи, растения, позвоночные, например, CHO клетки (например, ATCC CRL-9096), NS0 клетки, SP2/0 клетки, HEK293 клетки, COS клетки (например, ATCC CRL-1650, CRL-1651) и HeLa (ATCC CCL-2).

Для получения антитела по изобретению клетка-хозяин ко-трансформируется экспрессионным вектором, включающим нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь антитела, и экспрессионным вектором, включающим нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь антитела. В некоторых воплощениях используется один экспрессионный вектор, в который внедрены нуклеиновые кислоты, кодирующие и легкую, и тяжелую цепи антитела.

Для экспрессии легкой и тяжелой цепей экспрессионным вектором(ами), кодирующим тяжелую и легкую цепи, трансформируют (ко-трансформируют) в клетку-хозяина таким образом, что легкая и тяжелая цепи экспрессируются в клетке-хозяине и, предпочтительно, выделяются в среду, в которой культивируют клетки-хозяина, из этой среды могут быть выделены антитела. Различные трактовки термина "трансформация" предназначены для включения широкого ряда способов, обычно используемых при интродукции экзогенной ДНК в прокариотную или эукариотную клетку-хозяина, например, электропорацию, преципитацию фосфатом кальция, трансфекцию с помощью DEAE-декстрана и др., как описано Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds) *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor,

N.Y. (1989; Ausubel F.M. et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates (1989).

Когда рекомбинантные экспрессирующие векторы, содержащие нуклеиновые кислоты антитела, интродуцируют в клетки-хозяева, антитела образуются при культивировании клеток-хозяев в течение периода времени, который достаточен для экспрессии антитела в клетке-хозяине, или (более предпочтительно) секретируют антитела в культуральную среду, в которой выращивают клетки-хозяина. Антитела могут быть выделены из культуральной среды с использованием стандартных способов очистки белков. Условия культивирования различных клеток хорошо известны специалистам в данной области и описаны, например, в Current Protocols in Cell Biology, под ред. Bonifacino J.S., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J. и Yamada K.M., изд-во John Wiley & Sons, Inc., 2000.

Если используется любая вышеупомянутая клетка-хозяин или другие подходящие клетки-хозяева или организмы для репликации и/или экспрессии нуклеиновых кислот изобретения, то полученная реплицированная нуклеиновая кислота, экспрессированный белок или полипептид находятся в рамках притязания изобретения как продукт клетки-хозяина или организма. Продукт может быть выделен подходящим способом, известным в данной области.

Клеточные линии, которые устойчиво экспрессируют белки настоящего изобретения, могут быть выбраны способами, известными в данной области (например, ко-трансфекция с селектируемым маркером, таким как dhfr, gpt, неомицин, гигромицин, что делает возможным выявление и выделение трансфицированных клеток, которые содержат ген, включенный в геном).

Молекулы нуклеиновых кислот настоящего изобретения также могут применяться для определения экспрессии гена в биологическом образце. Способ, в котором исследуются клетки на наличие специфических нуклеотидных последовательностей, таких как геномная ДНК или РНК,

хорошо отработан в данной области. Кратко, выделяют ДНК или мРНК из образца клетки. мРНК может быть амплифицирована ОТ-ПЦР, с использованием обратной транскриптазы для формирования комплементарной цепочки ДНК, с последующей амплификацией с помощью полимеразной цепной реакции с использованием праймеров, специфических для заявленных последовательностей ДНК. Альтернативно, образец мРНК отделяют с помощью гель-электрофореза, переносят на подходящий носитель, например, нитроцеллюлозу, нейлон и т.д., и затем тестируют фрагментом заявленной ДНК в качестве пробы. Могут также использоваться другие способы, такие как анализы сшивания олигонуклеотидов, гибридизация *in situ* и гибридизация ДНК-пробами, иммобилизованными на твердый чип. Обнаружение мРНК, гибридизующейся с заявленной последовательностью указывает на экспрессию гена в образце.

Терапевтическое применение антител по изобретению

В одном аспекте антитело или его активный фрагмент по данному изобретению применяется в лечении нарушений, которые связаны с активностью патологических Т-лимфоцитов, несущих на поверхности ТКР семейства TRBV9, например, с активностью аутоиммунных Т-лимфоцитов при АС, целиакии, Т-клеточных лимфомах.

Термин "пациент" в данной заявке относится к млекопитающему, включая, но не ограничиваясь приведенными, мышей, обезьян, людей, млекопитающих сельскохозяйственных животных, млекопитающих спортивных животных и млекопитающих комнатных животных; предпочтительно термин относится к людям. В определенном из вариантов осуществления пациент дополнительно характеризуется заболеванием или расстройством, или состоянием, опосредованными наличием в его организме ТКР, бета цепь которого относится к семейству TRBV9. Из уровня техники известно, что ТКР, бета цепь которого относится к семейству TRBV9,

ассоциированы с AC и целиакией. Также ТКР, бета цепь которого относится к семейству TRBV9, могут быть связаны с развитием ряда заболеваний крови, таких как Т клеточная лимфома, вызванная вирусом Эпштейн-Барр.

Используемые в данном документе термины «совместное назначение», «совместно назначенный» и «в сочетании с» относящиеся антителу с одним или более другими терапевтическими агентами, как предполагается, означают, ссылаются или включают:

1) одновременное введение такой комбинации антитела по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы вместе в одной лекарственной форме, из которой указанные компоненты высвобождаются практически одновременно указанному пациенту,

2) одновременное введение такой комбинации антитела по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы отдельно в разных лекарственных формах, введение которых происходит практически в одно и то же время указанному пациенту, после чего указанные компоненты высвобождаются практически одновременно указанному пациенту,

3) последовательное введение такой комбинации антитела по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы отдельно друг от друга в отдельных лекарственных формах, которые принимаются в последовательно по времени указанным пациентом со значимым временным интервалом между каждым введением, после чего указанные компоненты высвобождаются в практически разное время указанному пациенту; а также

4) последовательное введение такой комбинации антитела по данному изобретению и терапевтического агента пациенту, который нуждается в лечении, когда такие компоненты сформулированы вместе в единый лекарственной форме, из которой высвобождение указанных компонентов

происходит контролируемым образом, после чего они одновременно, последовательно или совместно высвобождаются в одно и то же время и/или разное время указанному пациенту, где каждая часть может быть введена одним или разными путями.

Антитело по данному изобретению (например, анти-TRBV9-1, анти-TRBV9-2, анти-TRBV9-3 или анти-TRBV9-4) могут назначаться без дополнительного терапевтического лечения, т.е. в качестве самостоятельной терапии. Кроме того, лечение антителом по данному изобретению может включать по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое лечение (комбинированная терапия). В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело может вводиться совместно или быть сформулирована с другим медикаментом/препаратом для аутоиммунного или онкологического заболевания, в патогенез которого вовлечены ТКР, содержащие бета-цепь TRBV9, например, АС, целиакия, Т-клеточная лимфома, Т-клеточный лейкоз.

Дозы и пути введения

Антитело по данному изобретению будет вводиться в количестве, эффективном для лечения состояния, о котором идет речь, т.е. в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от таких факторов, как конкретное состояние, по поводу которого проводится лечение, возраста, пола и веса пациента, а также является ли введение антитела самостоятельным лечением или оно проводится в комбинации с одним или более дополнительных иммуносупрессивных или противовоспалительных методов лечения.

Схемы приема лекарственных средств можно регулировать, чтобы обеспечить оптимальный желаемый ответ. Например, может быть введен один болюс, несколько разделенных доз могут быть введены в течение некоторого времени, или доза могут быть пропорционально уменьшена или увеличена в

зависимости от остроты терапевтической ситуации. Особенно полезным является изготовление парентеральных композиций в стандартной лекарственной форме для простоты введения и однородности дозирования. Стандартная лекарственная форма при использовании в данном документе, относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для пациентов/субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для стандартных лекарственных форм по настоящему изобретению, как правило, диктуется и непосредственно зависит от (а) уникальных характеристик химиотерапевтического агента и конкретного терапевтического или профилактического эффекта, которые должны быть достигнуты, и (b) ограничений, присущих в технике компаундирования такого активного соединения для лечения чувствительности у субъектов.

Таким образом, квалифицированным специалистам понятно, исходя из раскрытия, представленного в данном документе, что дозы и режим дозирования корректируются в соответствии со способами, хорошо известными в терапевтической области. Это означает, что может быть легко установлена максимально переносимая доза и может быть также определено эффективное количество, обеспечивающее обнаруживаемый терапевтический эффект для пациента, также как и требования к времени введения каждого агента для достижения видимого терапевтического эффекта для пациента. Таким образом, хотя некоторые дозы и схемы режима введения приведены в качестве примеров в данном документе, эти примеры никоим образом не ограничивают дозы и режимы введения, которые могут понадобиться для пациента в практике применения настоящего изобретения.

Следует отметить, что значения дозировки могут изменяться, в зависимости от типа и тяжести состояния, которое следует облегчить, и может

включать одну или более доз. Кроме того, необходимо понимать, что для любого конкретного пациента, конкретные схемы введения должны быть скорректированы через некоторое время согласно индивидуальной потребности и на усмотрение медицинского работника, который осуществляет введение или контролирует введение композиций, и что диапазоны концентрации, приведенные в данном описании, приведены только в качестве примера и не предназначены для ограничения объема или практики заявленных композиций. Кроме того, режим дозирования с композициями по данному изобретению может быть основан на различных факторах, включая тип заболевания, возраст, вес, пол, состояния здоровья пациента, тяжесть состояния, путь введения и конкретное используемое антитело. Таким образом, режим дозирования может широко варьироваться, но может определяться регулярно с помощью стандартных методов. Например, дозы могут быть скорректированы на основе фармакокинетических и фармакодинамических параметров, которые могут включать клинические эффекты, такие как токсические эффекты или лабораторные значения. Таким образом, настоящее изобретение охватывает индивидуальное повышение дозы, которое определяется квалифицированным специалистом. Определение необходимой дозы и режимы хорошо известны в соответствующей области техники и будут понятны специалисту в данной области после ознакомления с идеями, раскрытыми в данном документе.

Примеры подходящих способов введения предусмотрены выше.

Предполагается, что подходящая доза антитела по данному изобретению будет в диапазоне от 0,1-200 мг/кг, предпочтительно 0,1-100 мг/кг, в том числе около 0,5-50 мг/кг, например, около 1-20 мг/кг. Антитело может быть введено, например, в дозе по меньшей мере 0,25 мг/кг, например, по меньшей мере, 0,5 мг/кг, в том числе не менее 1 мг/кг, например, по меньшей мере, 1,5 мг/кг, например, также как не менее 2 мг/кг, например, по меньшей мере 3 мг/кг, в том числе по меньшей мере 4 мг/кг, например, по меньшей мере, 5 мг/кг; и,

например, вплоть до максимально 50 мг/кг, в том числе вплоть до максимально 30 мг/кг, например, вплоть до максимально 20 мг/кг, в том числе вплоть до максимально 15 мг/кг. Введение будет повторяться обычно в подходящие промежутки времени, например, раз в неделю, раз в две недели, один раз каждые три недели или один раз каждые четыре недели, и так долго, как будет сочтено целесообразным ответственным врачом, который может в некоторых случаях увеличить или уменьшить дозу при необходимости.

Фармацевтическая композиция

Антитело по изобретению может быть включено в фармацевтическую композицию, пригодную для введения пациенту. Антитела по изобретению могут быть введены отдельно или в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем и/или наполнителем в однократных или многократных дозах. Фармацевтические композиции для введения разработаны таким образом, чтобы соответствовать выбранному режиму введения, а фармацевтически приемлемые разбавители, носители и/или наполнители, такие как диспергирующие агенты, буфера, поверхностно-активные вещества, консерванты, солюбилизующие агенты, изотонические агенты, стабилизаторы и т.п. использованы должным образом. Указанные композиции разработаны в соответствии с традиционными методами, приведенными в, например, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995, где описаны различные методы получения композиций, в общем известных специалистам.

«Лекарственное средство (препарат)» – вещество или смесь веществ в виде фармацевтической композиции в виде таблеток, капсул, порошков, лиофилизатов, инъекций, инфузий, мазей и др. готовых форм, предназначенное для восстановления, исправления или изменения физиологических функций у человека и животных, а также для лечения и профилактики болезней, диагностики, анестезии, контрацепции,

косметологии и прочего. Любой способ введения пептидов, белков или антител, принятый в данной области, может соответствующим образом использоваться для антитела по данному изобретению.

Термин «фармацевтически приемлемый» означает один или несколько совместимых жидких или твердых компонентов, которые подходят для введения млекопитающему, предпочтительно человеку.

Термин «эксципиент» или «вспомогательное вещество» используется в данном документе для описания любого компонента, отличающегося от ранее описанных по данному изобретению. Это вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства, изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств.

Под термином «буфер», «буферная композиция», «буферный агент» понимается раствор, способный сохранять значение pH, благодаря взаимодействию кислотных и щелочных компонентов, входящих в его состав, который дает возможность препарату антитела проявлять устойчивость к изменениям pH. В общем случае, преимущественными являются значения pH фармацевтической композиции от 4,0 до 8,0. В качестве буферных агентов могут быть использованы, например, ацетатный, фосфатный, цитратный, гистидиновый, сукцинатный и т.п. буферные растворы, но, не ограничиваясь ими.

Термины «тонический агент», «осмолитик» или «осмотический агент» в том виде, как они здесь использованы, относятся к эксципиенту, который может подводить осмотическое давление жидкого препарата антитела. «Изотоничный» препарат представляет собой препарат, который имеет осмотическое давление, эквивалентное давлению человеческой крови. Изотоничные препараты обычно имеют осмотическое давление от примерно 250 до 350 мОсм/кг. В качестве изотонических агентов могут быть

использованы полиолы, моно- и дисахара, аминокислоты, соли металлов, например, хлорид натрия, и т.п., но, не ограничиваясь ими.

Под «стабилизатором» понимается вспомогательное вещество или смесь двух и более вспомогательных веществ, которые обеспечивают физическую и/или химическую стабильность активного агента. В качестве стабилизаторов могут быть использованы аминокислоты, например, аргинин, гистидин, глицин, лизин, глутамин, пролин, но, не ограничиваясь ими; поверхностно-активные вещества, например, полисорбат 20 (торговое наименование Tween 20), полисорбат 80 (торговое наименование Tween 80), полиэтилен-полипропилен гликоль и его кополимеры (торговые наименования Поллоксамер (Poloxamer), Плуроник (Pluronic)), натрия додецилсульфат (SDS), но, не ограничиваясь ими; антиоксиданты, например, метионин, ацетилцистеин, аскорбиновая кислота, монотиоглицерол, соли серистых кислот, и т.п., но не ограничиваясь ими; хелатирующие агенты, например, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТПА), цитрат натрия и т.п., но не ограничиваясь ими.

Фармацевтическая композиция является «стабильной», если активный агент сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность в течение заявленного срока годности при температуре хранения, например, при 2-8 °C. Предпочтительно, чтобы активный агент сохранял и физическую, и химическую стабильность, а также биологическую активность. Период хранения выбирается на основании результатов исследования стабильности при ускоренном и естественном хранении.

Фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело по изобретению, может быть введена пациенту, имеющему патологии, как описано в данной заявке, с использованием стандартных методов введения, включая пероральное, внутривенное, интраперитонеальное, подкожное,

легочное, трансдермальное, внутримышечное, интраназальное, буккальное, сублингвальное или при помощи суппозиториев.

Фармацевтическая композиция по изобретению предпочтительно содержит или является "терапевтически эффективным количеством" антитела по изобретению. "Терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному при дозировках и на протяжении периодов времени, необходимого для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество антитела может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и вес индивидуума, и способности антитела или части антитела вызывать желательную реакцию у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором терапевтически полезный эффект антитела преобладает над токсическим или вредным эффектом. "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному при дозировках и на протяжении периодов времени, необходимых для достижения желательного профилактического результата. Поскольку профилактическую дозу используют для индивидуумов до или на ранней стадии заболевания, то, типично, профилактически эффективное количество может быть меньшим, чем терапевтически эффективное количество.

Терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество представляет собой, по крайней мере, минимальную дозу, но меньшую, чем токсическая доза активного агента, необходимую для обеспечения терапевтической пользы пациенту. С другой стороны, терапевтически эффективное количество антитела по изобретению представляет собой количество, которое у млекопитающих, предпочтительно людей, снижает биологическую активность аутоиммунных клонов, например, через связывание ТКР, бета цепь которого относится к семейству TRBV9, где присутствие этих клонов вызывает или способствует нежелательным

патологическим эффектам, или снижение уровней ТКР, бета цепь которого относится к семейству TRBV9, вызывает благоприятный терапевтический эффект у млекопитающего, предпочтительно человека.

Путь введения антитела по изобретению может быть пероральным, парентеральным, путем ингаляции или местным. Предпочтительно антитела по изобретению могут быть включены в фармацевтическую композицию, пригодную для парентерального введения. Термин "парентеральный", как используется в данной заявке, включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное или интраперитонеальное введение. Преимущественным является введение путем внутривенной или интраперитонеальной, или подкожной инъекции. Подходящие носители для таких инъекций непосредственно известны из уровня техники.

Фармацевтическая композиция, как указано в соответствующих руководствах, должна быть стерильной и стабильной в условиях производства и хранения в контейнере, который обеспечивается, включая, например, герметично закрытый флакон (ампула) или шприц. Поэтому фармацевтические композиции могут быть стерильно профильтрованными после получения состава либо сделаны микробиологически пригодными иным образом. Типичная композиция для внутривенной инфузии может иметь объем в 250-1000 мл жидкости, такой как стерильный раствор Рингера, физиологический раствор, раствор декстрозы и раствор Хенка, и терапевтически эффективную дозу (например, 1-100 мг/мл или более) концентрации антитела. Доза может варьировать в зависимости от вида и тяжести заболевания. Как хорошо известно из уровня техники в области медицины, дозировки для любого из пациентов зависят от многих факторов, включая размеры пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное соединение, предназначенное для введения, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарства, которые вводят одновременно. Типичная доза может находиться, например, в диапазоне 0,001-1000 мкг;

однако, предвидятся дозы, находящиеся ниже или выше этого иллюстративного диапазона, особенно учитывая вышеуказанные факторы. Режим дозировок ежедневного парентерального введения может составлять от 0,1 мкг/кг до 100 мг/кг от общей массы тела, предпочтительно от 0,3 мкг/кг до 10 мг/кг и более предпочтительно от 1 мкг/кг до 1 мг/кг, даже более предпочтительно от 0,5 до 10 мг/кг массы тела в день. Процесс лечения можно контролировать путем периодической оценки состояния пациента. Для повторного введения в течение нескольких дней или дольше в зависимости от состояния пациента лечение повторяют до достижения желаемого ответа или подавления симптомов болезни. Однако также могут применяться другие режимы дозировок, которые не описаны в данной заявке. Желаемая дозировка может быть введена путем однократного введения, множественных болюсных введений или путем непрерывного инфузионного введения антитела в зависимости от образца фармакокинетического распада, которого хочет достигнуть практикующий специалист.

Эти предположительные количества антитела в сильной степени зависят от решения терапевта. Ключевым фактором выбора соответствующей дозы и режима является желаемый результат. Факторы, рассматриваемые в данном контексте, включают конкретное заболевание, которое лечат, конкретное млекопитающее, которое лечат, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, место введения антитела, конкретный вид антитела, способ введения, режим введения и остальные факторы, известные практикующим специалистам-медикам.

Терапевтические агенты по изобретению могут быть заморожены либо лиофилизированы и восстановлены перед применением в подходящем стерильном носителе. Лيوфилизирование и восстановление могут приводить к различным степеням потери активности антитела. Дозировки могут быть скорректированы для компенсации этой потери. В общем случае,

преимущественными являются значения pH фармацевтической композиции от 6 до 8.

Изделие (продукты) и наборы

Следующим вариантом осуществления изобретения является изделие, которое содержит продукты, применяемые для лечения аутоиммунных заболеваний и родственных состояний и злокачественных заболеваний крови, в патогенез которых вовлечены ТКР, несущие бета-цепь семейства TRBV9. К таким заболеваниям относятся, например, АС, целиакия, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома и другие.

Изделие представляет собой контейнер с этикеткой и листовкой-вкладышем, которые могут быть размещены в блистере и/или пачке. Приемлемыми контейнерами являются, например, флаконы, ампулы, шприцы и т.д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или полимерные материалы. Контейнер содержит композицию, эффективную для лечения определенного состояния, и может иметь стерильный входной канал). По меньшей мере одно действующее вещество в композиции представляет собой антитело, предлагаемое в изобретении. На этикетке и листовке-вкладыше в упаковке указано, что лекарственное средство применяют для лечения конкретного состояния. Этикетка и/или листовка-вкладыш в упаковке дополнительно должны содержать инструкции по введению композиции антитела пациенту, в том числе информацию о показаниях, применении, дозе, пути введения, противопоказаниях и/или мерах предосторожности, касающихся применения таких терапевтических продуктов. В одном из вариантов осуществления изобретения на листовке-вкладыше в упаковке указано, что композицию применяют для лечения указать чего.

Кроме того, изделие может включать другие продукты, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, например, растворители, разбавители, фильтры, иглы и шприцы, но не ограничиваясь ими.

Изобретение относится также к наборам, которые можно применять для различных целей, например, для оценки способности уничтожать Т-клетки, несущие ТКР семейства TRBV9, для очистки или иммунопреципитации рецептора TRBV9 из клеток. Для выделения и очистки набор может содержать антитело связанное с гранулами (например, сефарозными гранулами). Набор содержит контейнер и этикетку и листовку-вкладыш в упаковке.

Диагностическое использование

Антитела по настоящему изобретению также используются в диагностических целях (например, *in vitro*, *ex vivo*). Например, антитело может использоваться для обнаружения или измерения уровня Т-лимфоцитов, содержащих ТКР семейства TRBV9 в образцах, полученных от пациента, например, образец ткани или образец жидкости тела, такой как воспалительный экссудат, кровь, жидкость кишечника, слюна или моча. Подходящие методы обнаружения и измерения включают иммунологические методы, такие как проточная цитометрия, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), хемилюминесцентный анализ, радиоиммуноанализ и иммуногистология. Изобретение далее включает наборы, например, диагностические наборы, содержащие антитела, описанные в данном документе.

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения в любой форме.

Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в этой спецификации включены в данный документ путем отсылки. Хотя вышеупомянутое изобретение было довольно подробно описано путем иллюстрации и примера в целях исключения двусмысленного толкования, специалистам в данной области на основе идей, раскрытых в данном изобретении, будет вполне понятно, что могут быть внесены определенные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема прилагаемых вариантов осуществления изобретения.

Экспериментальная часть

Пример 1. Продукция и очистка антитела

Нуклеиновые кислоты (SEQ ID No 10, 12, 14, 16, 18), кодирующие переменные домены тяжелой и легкой цепей антитела, были получены путем амплификации ДНК фрагментов с использованием перекрывающихся праймеров и высокоточной полимеразы Q5 (NEB, USA). Полученные нуклеиновые кислоты были очищены на колонках Quagen (Германия) с использованием набора реагентов (# 28104) и направлено клонированы в коммерчески доступные вектора pFuse, содержащие константные области генов тяжелой (IgG1) и легкой (kappa) цепи человека (Invivogen, США). Последовательности клонированных фрагментов подтверждались путем секвенирования по методу Сэнгера.

В результате были получены плазмиды, содержащие кодирующие последовательности для четырех вариантов тяжелой цепи антитела:

NV анти-TRBV9-1, нуклеотидная и аминокислотная последовательности которого показаны в SEQ ID No: 20 и 21;

NV анти-TRBV9-2, нуклеотидная и аминокислотная последовательности которого показаны в SEQ ID No: 22 и 23;

NV анти-TRBV9-3, нуклеотидная и аминокислотная последовательности которого показаны в SEQ ID No: 24 и 25;

HV анти-TRBV9-3, нуклеотидная и аминокислотная последовательности которого показаны в SEQ ID No: 26 и 27;

и для одного варианта легкой цепи антитела LV анти-TRBV9 (SEQ ID No: 28 и 29).

Степень гуманизации тяжелой цепи антитела составляет 72%, а легкой цепи – 69%.

Для получения антител плазмиды трансфецировали в суспензионную линию клеток HEK293F. Для трансфекции использовали реагент 293fectine (Thermo Fisher scientific, USA # 1234701). По 30 млн. клеток помещали в 30 мл среды FreeStyle, добавляли к ним 30 мкг плазмиды pFuse, кодирующей один из вариантов тяжелой цепи антитела, и 30 мкг плазмиды pFuse, кодирующей легкую цепь антитела, и 60 мкл 293fectine (Thermo Fisher scientific, USA # 12347019). Плазмиды, содержащие тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов, были растворены в воде, проверенной на содержания эндотоксинов (Quagen, USA)

Полученные реакционные смеси инкубировали при 37°C на качалке в течение недели. Через неделю собирали клеточный супернатант, который использовали для выделения антител. Для этого супернатант центрифугировали три раза при 10000 об/мин по 10 мин, и очищали жидкую фракцию с помощью колонки на 1 мл HiTrap PrG (Thermo Fisher scientific, USA). Для элюции использовали 0,1М глициновый буфер pH2.5, доводится HCl. Качество выделения оценивали с помощью 12% ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях. Количественную оценку проводили с помощью измерения на микроспектрофотометре NanoDrop2000 при 280А. Полученное продукт хранили на +4°C.

Характеристики выделенных белков приведены в таблице 1.

Таблица1. Характеристики антител.

Название	Молекулярная масса (теор.), kDa	Изоточка	Коэффициент экстинкции	Чистота белка, %	Концентрация белка, мг/мл	Поглощение при 400 нм, l = 1 см
TRBV9-1	146,3	8,35	1,52	98,3	2,58	0,005
TRBV9-2	146,5	8,35	1,52	98,7	1,91	0,003
TRBV9-3	146,5	8,35	1,52	97,8	1,83	0,003
TRBV9-4	146,5	8,35	1,52	98,9	1,56	0,004

Определение аффинности анти-TRBV9 антител проводили на приборе OctetRed 96 (от ForteBio). На поверхность аминореактивных сенсоров второго поколения (от AR2G) неспецифически иммобилизовали антигены (табл.1) по стандартному протоколу согласно инструкции производителя, для подготовки и иммобилизации AR2G сенсоров. Анализ был произведен при 30°C с использованием фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего 0,1% Твин-20 и 0,1% БСА в качестве рабочего буфера. Анализ аффинности связывания анти-TRBV9 антител производили с использованием рабочего буфера от концентрации 126 нМ до 2 нМ с шагом 2. Кривые связывания с вычетом референсного сигнала анализировали с помощью программного обеспечения Octet Data Analysis (версия 7.0) согласно стандартной процедуре с

использованием модели взаимодействия 1:1. Результаты суммированы в таблице 2.

Таблица 2. Оценка аффинности антител

	Антиген: TRBV9+TRAV26				Антиген: TRBV9+TRAV38			
	kD, M	kon, 1/Ms	kdis, 1/s	R2	kD, M	kon, 1/Ms	kdis, 1/s	R2
TRBV 9-1	2,20E- 10	5,15E+ 05	1,13E- 04	0,991 5	4,14E- 10	4,41E+ 05	1,83E- 04	0,981 5
	2,78E- 10	6,58E+ 05	1,83E- 04	0,99	3,65E- 10	5,62E+ 05	2,05E- 04	0,977 6
	2,04E- 10	5,59E+ 05	1,14E- 04	0,984 1	5,29E- 10	3,71E+ 05	1,96E- 04	0,987 7
TRBV 9-2	1,35E- 11	4,47E+ 05	6,02E- 06	0,990 5	<1.0E- 12	3,97E+ 05	<1.0E- 07	0,977 2
	<1.0E- 12	3,81E+ 05	<1.0E- 07	0,986 1	<1.0E- 12	2,89E+ 05	<1.0E- 07	0,989 4
TRBV 9-3	3,19E- 10	2,87E+ 05	9,16E- 05	0,999 1	3,11E- 10	3,09E+ 05	9,61E- 05	0,994 2
	5,82E- 10	1,68E+ 05	9,80E- 05	0,999 8	4,00E- 10	2,29E+ 05	9,16E- 05	0,996 2
TRBV 9-4	<1.0E- 12	8,65E+ 05	<1.0E- 07	0,938 1	<1.0E- 12	7,13E+ 05	<1.0E- 07	0,905 8
	<1.0E- 12	5,79E+ 05	<1.0E- 07	0,954 6	<1.0E- 12	4,76E+ 05	<1.0E- 07	0,951 2

При использовании антигенов TRBV7+TRAV38 взаимодействия с антителами не наблюдалось. Лучшие характеристики проявляли антитела TRBV9-2 и TRBV9-4.

Пример 2. Использование моноклональных антител анти-TRBV9 для мечения Т-лимфоцитов, экспрессирующих бета-цепь ТКР, принадлежащую к семейству TRBV9.

Моноклональные антитела (анти-TRBV9-1, анти-TRBV9-2, анти-TRBV9-3, анти-TRBV9-4, отличающиеся последовательностью CDR3 тяжелой цепи) получали как описано в Примере 1. Для визуализации работы антител проводили их мечение флуоресцином с помощью реагента флуоресцин изотиоцианат (Sigma, США) по протоколу производителя. Контроль количества флуорофоров, вступивших в реакцию с молекулами антитела, осуществляли по соотношению спектра поглощения при длинах волн 495/280 нм. Меченые антитела использовали для выявления Т-лимфоцитов, экспрессирующих бета-цепь ТКР семейства TRBV9, в моноклеарной фракции крови человека.

Для получения указанной фракции использовали периферическую кровь 5 здоровых доноров. Кровь собирали в пробирки Vacuette с EDTA (по 2х9 мл), моноклеарную фракцию согласно стандартной методике, описанной в (Ковальчук Л. В. и др. Иммунология: практикум - 2010. - 176 с.). После выделения клетки перенесли в фосфатно-солевой буфер (PBS), содержащий 0.5% бычий сывороточный альбумин (БСА) и 2 mM ЭДТА. Суммарное количество клеток и их жизнеспособность определяли по методу окрашивания с трипановым синим как описано Лангом Н.Р. (Стимуляция лимфоцитов М.:Медицина, 1976.-288 с).

Для мечения Т-лимфоцитов в каждом тесте к аликвоте моноклеарной фракции, содержащей по 500 тысяч клеток (на тест), добавляли в буфере PBS с добавлением 0.5% бычий сывороточного альбумина (БСА) и 2 mM ЭДТА антитела анти-TRBV9-1, анти-TRBV9-2, анти-TRBV9-3, анти-TRBV9-4 до конечной концентрации 5 нг\мкл и 0,5 нг\мкл, а также моноклональное

антитело против CD3-eFluor405 ((клон ОКТ3, eBioscience);) в концентрации рекомендуемой производителем.

Полученные реакционные смеси объемом 50 мкл PBS с 0.5% БСА 2mM ЭДТА инкубировали при комнатной температуре 30 мин, после этого клетки промывали буфером PBS с 0.5% БСА 2mM ЭДТА и анализировали результаты окрашивания с помощью проточной цитометрии (FACSARIA III, USA, фиг. 1-4). Было показано, что все полученные варианты моноклональных антител специфически узнают фракцию CD3+позитивных клеток. Однако вариант TRBV9-2 показал наиболее стабильное окрашивание, которое составляло 2,9% от CD3-позитивной фракции, при концентрациях антитела как 5 нг\мкл, так и при концентрации 0.5 нг\мкл. Тогда как другие варианты антител (анти-TRBV9-2, анти-TRBV9-3, анти-TRBV9-4) продемонстрировали окрашивание различной доли TRBV9+ лимфоцитов при тех же концентрациях. Также специфичность работы анти-TRBV9-2 определялось отсутствием слабоокрашенных неспецифических CD3-негативных клеток, что присутствует при использовании других вариантов, и значительным отделением специфической популяции клеток от других CD3-позитивных лимфоцитов негативных по TRBV9 рецептору.

Таким образом, было установлено, что второй вариант (анти-TRBV9-2) показывает наиболее эффективное и высоко специфичное окрашивание Т лимфоцитов TRBV9+. Данное антитело может быть использовано в диагностических целях для детекции Т лимфоцитов TRBV9+ в концентрации 0,6 нг\мкл.

Для оценки специфичности работы антител анти-TRBV9-1, анти-TRBV9-2, анти-TRBV9-3, анти-TRBV9-4 моноклональные фракции крови, полученные как описано выше из 5 образцов периферической крови, окрашивали анти-TRBV9-FITC антителом и anti-CD3-eFluor450 (eBioscience, USA) антителом как описано выше, используя следующие соотношения:

к 3 млн клеток моноклеарной фракции крови добавляли 5 мкл (1 мкг) anti-CD3-eFluor 450 (eBioscience, USA) и 30 нг (0.5 нг\мкл) anti-TRBV9-2 FITC. Реакционные смеси инкубировали при комнатной температуре 30 мин, клетки отмывали буфером PBS с 0.5% БСА и сортировали на клеточном сортере (FACSARIA III, USA), выделяя популяцию клеток CD3+TRBV9+, а также CD3+TRBV9-. Для контроля качества сортирования проводили ре-сортировку популяции CD3+TRBV9+, которая показала, что обогащение целевой популяцией клеток составило 95%.

Полученные фракции клеток помещали в RLT-буфер (Quagen, Германия) и выделяли из них РНК с помощью набора реактивов Quiagen RNAeasy mini kit #217004 (Quagen) согласно протоколу производителя. На матрице выделенной РНК синтезировали кДНК и амплифицировали фрагменты бета цепи Т-рецептора по протоколу, описанному Britanova et al (J Immunol, 2016, 196 (12) 5005-5013) с использованием набора реактивов Mint cDNA synthesis kit (Евроген, Россия). К наработанным ампликонам лигировали адапторы Illumina (США) и секвенировали на платформе MiSeq Illumina согласно протоколу производителя секвенатора. Данные секвенирования анализировали с помощью программ MiGEC, MiXCR и VDJtools, представленных на сайте в сети Интернет: <https://milaboratory.com>. Анализ данных показал, что 90% последовательностей из фракции CD3+TRBV9+ относятся к семейству генов переменных сегментов бета цепей TRBV9. В то же время во фракции CD3+TRBV9- фрагментов, содержащих последовательность переменного сегмента TRBV9, обнаружено не было. Таким образом, анти-TRBV9-1, анти-TRBV9-2, анти-TRBV9-3, анти-TRBV9-4 специфически связываются с бета цепью семейства TRBV9.

Пример 3. Функциональная активность антител

Моноклональные антитела (анти-TRBV9-1, анти-TRBV9-2, анти-TRBV9-3, анти-TRBV9-4, отличающиеся последовательностью CDR3 тяжелой цепи)

получали как описано в Примере 1. Мононуклеарную фракцию крови человека получали как описано в Примере 2.

Дополнительно из части мононуклеарной фракции осуществляли выделение естественных киллеров с помощью набора реагентов для выделения NK клеток человека # 130-092-657 (Miltenyi biotec, USA). Использовали протокол производителей. Качество выделения NK клеток оценивали с помощью цитофлуометрии (BD FACS ARIA III, USA) с использованием меченных антител CD16- FITC, CD56-PE, CD3-VioBlue. Обогащение NK клетками составляло 85-95%.

Для оценки цитотоксичности к аликвоте мононуклеарной фракции, содержащей 1×10^6 клеток добавляли антитела (анти-TRBV9-1, анти-TRBV9-2, анти-TRBV9-3, или анти-TRBV9-4) до конечной концентрации 5 мкг/мл. В качестве негативного контроля использовали антитела ремикэйд в такой же концентрации, как и анти-TRBV9. К контрольной аликвоте клеток (положительный контроль) антитела не добавляли. Также во все реакционные смеси добавляли по 10^5 NK клеток. Конечный объем реакции составлял 100 мкл.

Реакционные смеси инкубировали при комнатной температуре один час, далее клетки отмывали несколько раз от антител и разносили по лункам 96-луночного круглодонного планшета, на столе.

Через 6 дней клетки собирали из лунок и использовали для иммунофенотипического анализа с помощью проточной цитометрии. Для детекции Т лимфоцитов были использованы следующие антитела: anti-CD3-eFluor450 (клон OKT3, eBioscience); anti-CD8-PC7 (клон SFCI21Thy2D3, Beckman Coulter, USA); полученные нами антитела анти-TRBV9-1,2,3,4, меченые Fitc. После окрашивания клетки отмывали и анализировали на приборе BD FACSARIA III. Т-лимфоциты CD3+TRBV9+ в образцах, подвергшихся инкубации с анти-TRBV9 антителами настоящего изобретения, не обнаруживаются. В то же время в контрольном образце без добавления

антитела (“ноль-контроль”) анти-TRBV9, а также с добавлением терапевтических антител ремикейд детекция двойных позитивных Т лимфоцитов по маркерам CD3+TRBV9+ сохраняется, что подтверждает специфическую элиминацию Т клеток TRBV9+ при добавлении антител против TRBV9. Типичный результат проточной цитометрии представлен на фиг. 5. В дополнительном негативном контроле, где вместо анти-TRBV9 антител настоящего изобретения использовались нецитотоксические антитела против CD6, целевая популяция CD3+CD6+ не менялась по сравнению с “ноль-контролем”. Это указывает, что экранирования эпитопа не меченными антителами на 6 день не происходит и подтверждает способность антител анти-TRBV9 элиминировать клетки, несущие ТКР семейства TRBV9.

Пример 4. Создание стабильной клеточной линии

Стабильная клеточная линия продуцент моноклонального антитела анти-TRBV9-2 была получена путем трансфекции суспензионной клеточной линии CHO-S векторными конструкциями, содержащими легкие и тяжелые цепи антитела в оптимизированном соотношении. Клональные линии с высоким уровнем (более 100 мг/л) были получены с использованием роботизированной платформы ClonePix (Molecular Devices). Анализ продуктивности отобранных клонов проводился на базе автоматизированной системы Biomek FX robotics (Beckman Coulter) и аналитической системы Octet RED96 (Pall Life Sciences). Для культивирования продуцента использовали бессывороточные среды, не содержащие белков животного происхождения. Нарработку препарата BCD085 для предклинических исследований проводили в ферментере HyClone single-use bioreactor (Thermoscientific) рабочим объемом 200 л.

Пример 5. Получение фармацевтической композиции, содержащей антитело согласно изобретению

Компоненты фармацевтической композиции показаны в Таблице 3.

Таблица 3. Концентрации компонентов фармацевтической композиции

Компонент	Концентрация
Антитело анти-TRBV9-2	10-50 мг/мл
Буфер цитратный 10 мМ до pH	6,0-7,0
Хлорид натрия	50-150 мМ
Сахароза, трегалоза	0,3-0,5%
Вода для инъекций	до 1 мл.

Пример 6. Набор, содержащий фармацевтическую композицию с антителами

Для выпуска наборов с лекарственной формой, содержащей композицию с антителами анти-TRBV9-2, фармацевтическую композицию, полученную согласно примеру 5 запаивают в ампулы или шприцы объемом 1 мл в стерильных условиях, маркируют и упаковывают в контейнеры из пластикового или картонного материала.

Также в контейнер с ампулой вкладывают инструкцию по применению.

Пример 7. Варианты антител по изобретению

Для получения мутантных последовательностей HV анти-TRBV9-1 проводили сайт-направленный мутагенез с использованием "overlap extention" продуктов ПЦР как описано Wurch et al., Methods in Molecular Biology. 12 (9), 653 – 657 (2004). Для ПЦР использовали высокоточную полимеразу Q5 (NEB, USA), согласно рекомендациям производителя. После амплификации полученные фрагменты очищали при помощи электрофореза в 1 % агарозном геле и дальнейшей экстракцией. Выделенные из геля фрагменты ДНК, содержащие мутации, объединяли в целую конструкцию методом «overlap extention» ПЦР (денатурация 95°C - 12 сек; отжиг 55°C - 2 мин; элонгация 72°C - 1 мин, 8 циклов ПЦР). Этот метод подразумевает, что в качестве матрицы и

затравки применяют присутствующие в реакционной смеси фрагменты с комплементарными друг другу участками. Амплификацию всей конструкции производили методом стандартной ПЦР с добавлением праймеров, комплементарным концам амплифицируемого фрагмента. Полученные нуклеиновые кислоты были очищены на колонках Quagen (Германия) с использованием набора реагентов (# 28104) и клонированы в вектор pFuse как описано в Примере 1. Последовательности мутантной ДНК проверяли секвенированием по методу Сэнгера. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности полученных вариабельных доменов показаны: вариант 1 – в SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31; вариант 2 – в SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 33. Способность мутантных антител связываться с Т-лимфоцитами, экспрессирующими бета-цепь ТКР, принадлежащую к семейству TRBV9, проверяли как описано в Примере 2. Было показано, что внесенные замены не оказывают влияния на специфичность связывания.

Перечень последовательностей

<110> ЗАО "БИОКАД"

<120> Моноклональное антитело и способы его применения

<130> TCRB9.docx

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> аминокислотная последовательность HCDR1 (согласно номенклатуре Kabat)

<400> 1

Asp Tyr Leu Val His

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> аминокислотная последовательность HCDR2 (согласно номенклатуре Kabat)

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> аминокислотная последовательность HCDR3 (согласно номенклатуре Kabat)

<400> 3

Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Leu Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> аминокислотная последовательность HCDR3 (согласно номенклатуре Kabat)

<400> 4

Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> аминокислотная последовательность HCDR3 (согласно номенклатуре Kabat)

<400> 5

Ser Trp Arg Arg Gly Ile Arg Gly Leu Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> аминокислотная последовательность HCDR3 (согласно номенклатуре Kabat)

<400> 6

Ser Trp Arg Arg Gly Ile Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> аминокислотная последовательность LCDR1 (согласно номенклатуре Kabat)

<400> 7

Lys Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> аминокислотная последовательность LCDR2 (согласно номенклатуре Kabat)

<400> 8

Asp Gly Ser Thr Leu Gln Ser
 1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> аминокислотная последовательность LCDR3 (согласно номенклатуре Kabat)

<400> 9

Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 10

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Нуклеотидная последовательность переменного домена легкой цепи антитела

<400> 10

gacgtgcaga tgaccagtc cccctacaac ctggccgcct ccccgggcga gtccgtgtcc 60
 atcaactgca aggcctccaa gtccatcaac aagtacctgg cctggtacca gcagaagccc 120
 ggcaagccca acaagctgct gatctacgac ggctccaccc tgcagtcagg catccctcc 180
 aggttctccg gctccggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagggg cctggagccc 240
 gaggacttcg gcctgtacta ctgccagcag cacaacgagt accccccac cttcggcgcc 300
 ggcaccaagc tggagctgaa g 321

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи антитела

<400> 11

Asp Val Gln Met Thr Gln Ser Pro Tyr Asn Leu Ala Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Asn Cys Lys Ala Ser Lys Ser Ile Asn Lys Tyr
 20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>	14
<211>	366
<212>	DNA
<213>	Artificial

<223> Нуклеотидная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела

```

<400> 14
cagatccagc tgggtgcagtc cggcccccag ctgaggggagc ccggcgagtc cgtgaagctg      60
tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgcactgggt gaagcaggcc      120
cccggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacctac      180
gccgacgact tcgaggggcag gttcgtgttc tccctggagg cctccgcctc caccgccaac      240
ctgcagatct ccaacctgaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggctctgg      300
aggagggggc tgagggggcat cggcttcgac tactggggcc agggcggtgtt cgtgaccgtg      360
tcctcc                                           366

```

```
<210> 15
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial
```

<223> Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела

<400> 15

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Leu Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 366
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Нуклеотидная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела

<400> 16
cagatccagc tggatcagtc cggccccgag ctgagggagc ccggcgagtc cgtgaagctg 60
tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgcactgggt gaagcaggcc 120
cccggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacctac 180
gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tcctggagg cctccgcctc caccgccaac 240
ctgcagatct ccaacctgaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggtcctgg 300
aggaggggca tcaggggcct gggcttcgac tactggggcc agggcgtgtt cgtgaccgtg 360
tcctcc 366

<210> 17
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела

<400> 17

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

1. Антиген, содержащий последовательность аминокислот, кодируемую последовательностью нуклеотидов, описанной в п. 1, и/или последовательность аминокислот, описанной в п. 2.

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

<210> 18
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Нуклеотидная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела

<400> 18	
cagatccagc tgggtgcagtc cggcccccag ctgagggagc ccggcgagtc cgtgaagctg	60
tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgcactgggt gaagcaggcc	120
cccggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacctac	180
gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tccttgagg cctccgcctc caccgccaac	240
ctgcagatct ccaacctgaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggtcctgg	300
aggaggggca tcaggggcat cggcttcgac tactggggcc agggcgtgtt cgtgaccgtg	360
tcctcc	366

<210> 19
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела

<400> 19	
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Arg Glu Pro Gly Glu	
1	15
	5
	10

FIG. 1. Amino acid sequence of the heavy chain of the anti-TRBV9-1 antibody.

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Leu Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Ile Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20

<211> 1365

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи антитела
анти-TRBV9-1

<400> 20

cagatccagc tgggtgcagtc cggccccgag ctgagggagc ccggcgagtc cgtgaagctg 60

tcctgcaagg cctccggcta cacccttcacc gactacctgg tgcactgggt gaagcaggcc 120

cccggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacctac 180

gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tccttgagg cctccgcctc caccgccaac 240

ctgcagatct ccaacctgaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggctcctg 300

aggagggggc tgaggggcct gggcttcgac tactggggcc agggcgtgtt cgtgaccgtg 360

tcctccgcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc 420

tctgggggca cagcggccct gggtgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc tgtcctacag 540

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgactgtgc cctctagcag cttgggcacc 600

cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt 660

gagccccga aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgcccagc acctgaactc 720

ctggggggac cgtcagtcct cctcttcccc ccaaaacca aggacacct catgatctcc 780

```

cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgagggtcaag      840
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcc aagacaaagcc gctggaggag      900
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg      960
aatggcaagg agtacaagtg caaggctctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa     1020
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc      1080
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc     1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg     1200
cctcccgtagc tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag     1260
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac     1320
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat gataa                      1365

```

<210> 21
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела
 анти-TRBV9-1

<400> 21

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Leu Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

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

Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

FIG. 10. Amino acid sequence of the protein encoded by the gene identified in Example 1.

```

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130                      135                      140

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

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165                      170                      175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180                      185                      190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195                      200                      205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210                      215                      220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225                      230                      235                      240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245                      250                      255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260                      265                      270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275                      280                      285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290                      295                      300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305                      310                      315                      320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325                      330                      335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340                      345                      350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355                      360                      365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370                      375                      380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

```

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 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50

```

385              390              395              400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
      405              410              415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
      420              425              430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
      435              440              445

Ser Pro Gly Lys
      450

```

```

<210> 22
<211> 1365
<212> DNA
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи антитела
      анти-TRBV9-2

```

```

<400> 22
cagatccagc tgggtcagtc cggccccgag ctgagggagc cggcgagtc cgtgaagctg      60
tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgcactgggt gaagcaggcc      120
cccggaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacctac      180
gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tccttgagg cctccgcctc caccgccaac      240
ctgcagatct ccaacctgaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggctctgg      300
aggaggggccc tgaggggcat cggcttcgac tactggggcc agggcgtgtt cgtgaccgtg      360
tcctccgect ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg caccctctc caagagcacc      420
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg      480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccggc tgtcctacag      540
tcctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgactgtgc cctctagcag cttgggcacc      600
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag ccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt      660
gagccccga aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgcccagc acctgaactc      720
ctggggggac cgtcagtcct cctcttcccc ccaaaacca aggacacct catgatctcc      780
cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag      840
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcc agacaaagcc gcgggaggag      900
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tcctgcacca ggactggctg      960
aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa      1020
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc      1080

```

cgggatgagc tgaccaagaa ccagggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc	1140
agcgacatcg ccgtgggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg	1200
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctaca graagctcac cgtggacaag	1260
agcagggtggc agcagggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac	1320
cactacacgc agaagagcct ctcctgtctt ccgggtaaat gataa	1365

```
<210> 23
<211> 452
<212> PRT
<213> Artificial
```

<223> Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела
анти-TRBV9-2

<400> 23

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Leu Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Leu Arg Gly Ile Gly Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

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

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445

Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 24
 <211> 1365
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи антитела
 анти-TRBV9-3

<400> 24
 cagatccagc tggatgcagtc cggccccgag ctgagggagc cggcgagtc cgtgaagctg 60
 tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgactgggt gaagcaggcc 120
 cccggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacctac 180
 gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tccctggagg cctccgctc caccgccaac 240
 ctgcagatct ccaacctgaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggctcctgg 300
 aggaggggca tcaggggcct gggcttcgac tactggggcc agggcggtgtt cgtgaccgtg 360
 tcctccgct ccaccaagg cccatcggtc tccccctgg caccctctc caagagcacc 420
 tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480
 gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 540
 tcctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgactgtgc cctctagcag cttgggcacc 600
 cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag ccagcaaca ccaagggtgga caagaaagtt 660
 gagccccga aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc 720
 ctggggggac cgtcagtcct cctcttcccc caaaaccca aggacacct catgatctcc 780
 cggacccctg aggtcacatg cgtgggtgtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 840
 ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcc agacaaagcc gcgggaggag 900
 cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tcctgcacca ggactggctg 960
 aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa 1020
 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc 1080
 cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1200
 cctcccgtgc tggactccga cggctcctc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1260
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1320
 cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat gataa 1365

<210> 25
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ АНТИТЕЛА
 анти-TRBV9-3

 <400> 25

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

 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

 Leu Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

 Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
 65 70 75 80

 Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

 Ala Arg Ser Trp Arg Arg Gly Ile Arg Gly Leu Gly Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

 Gly Gln Gly Val Phe Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140

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

 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175

 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190

 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205

 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 26
 <211> 1365
 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи антитела
анти-TRBV9-4

<400> 26

```

cagatccagc tgggtgcagtc cggcccccag ctgagggagc ccggcgagtc cgtgaagctg      60
tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgcactgggt gaagcaggcc      120
cccggaagg gcctgaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacctac      180
gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tcctggagg cctccgcctc caccgccaac      240
ctgcagatct ccaacctgaa gaacgaggac accgccacct actcttgcgc caggctcctgg      300
aggaggggca tcaggggcat cggcttcgac tactggggcc agggcggtgt cgtgaccgtg      360
tcctccgcct ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg caccctctc caagagcacc      420
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg      480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttcccggc tgtcctacag      540
tcctcaggac tctactcctc cagcagcgtg gtgactgtgc cctctagcag cttgggcacc      600
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag ccagcaaca ccaagggtga caagaaagt      660
gagccccga aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccagc acctgaactc      720
ctggggggac cgtcagtcct cctcttccc ccaaaccga aggacacct catgatctcc      780
cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggt gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag      840
ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag      900
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtccctaccg tcctgcacca ggactggctg      960
aatggcaagg agtacaagtg caaggctctc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa     1020
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gcccccctcc     1080
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc     1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg     1200
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag     1260
agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgagg tctgcacaac     1320
cactacacgc agaagagcct ctcctgtct ccgggtaaat gataa                       1365

```

<210> 27

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела
анти-TRBV9-4

<400> 27

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

260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 275 280 285		
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 290 295 300		
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 305 310 315 320		
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro 325 330 335		
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 340 345 350		
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 355 360 365		
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 370 375 380		
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro 385 390 395 400		
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 405 410 415		
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 420 425 430		
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 435 440 445		
Ser Pro Gly Lys 450		

<210> 28

639

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Нуклеотидная последовательность легкой цепи антитела анти-TRBV9

<400> 28

gacgtgcaga tgacccagtc cccctacaac ctggcgcgct cccccggcga gtccgtgtcc 60

atcaactgca aggcctccaa gtccatcaac aagtacctgg cctgggtacca gcagaagccc 120

ggcaagccca acaagctgct gatctacgac ggctccaccc tgcagtcagg catccccctcc 180

```
<210> 29
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Аминокислотная последовательность легкой цепи антитела анти-TRBV9

<400> 29
```

```

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

```

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210>	30
<211>	333
<212>	DNA
<213>	Artificial

<223> Нуклеотидная последовательность варианта варибельного домена тяжелой цепи антитела

```
<400> 30
cagatccagt tgggtgcagtc cggccccgag ctgaaggagc ccggcgagtc cgtgaagatc 60
tcctgcaagg cctccggcta caccctcacc gactaectgg tgcactgggt gaagcaggcc 120
cccggcaagg gcatcaagtg gatgggctgg atcaacacct acaccggcac cccacctac 180
gccgacgact tcgagggcag gttcgtgttc tccatcgagg cctccgcctc caccgccaac 240
ctgcagatct ccaacatcaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggctctgg 300
aggagggggc tgagggggcct gggcttcgac tac 333
```

```
<210> 31
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial
```

<223> Аминокислотная последовательность варианта переменного домена тяжелой цепи антитела

<400> 31

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Ile Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Ile Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

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

<210> 32
<211> 333
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Нуклеотидная последовательность варианта переменного домена
тяжелой цепи антитела

<400> 32
cagatccagt tgggtgcagtc cggcccccag ataaaggagc ccggcgagtc cgtgaagatc 60
tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc gactacctgg tgactgggt gaagcaggcc 120
cccggaagg gcatcaagtg gatgggctgg atcaaacct acaccggcac cccacctac 180
gccgacgact tcgagggcag gtctgtgttc tccatcgagg cctccgctc caccgccaac 240
ctgcagatct ccaacatcaa gaacgaggac accgccacct acttctgcgc caggtcctgg 300
aggagggggc tgaggggcct gggttcgac tac 333

<210> 33
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Аминокислотная последовательность варианта переменного домена
тяжелой цепи антитела

<400> 33

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Leu Val His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Ile Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Thr Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Val Phe Ser Ile Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Asn
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Ile Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Формула изобретения:

1. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с участком бета цепи семейства TRBV9 Т клеточного рецептора человека, включающее:

1) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотные последовательности HCDR 1-3, где

HCDR 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1,

HCDR 2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2,

HCDR 3 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID NO: 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6;

2) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотные последовательности LCDR 1-3, где

LCDR 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7,

LCDR 2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8,

LCDR 3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

2. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где вариабельный домен тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы SEQ ID No 13, SEQ ID No 15, SEQ ID No 17, SEQ ID No 19.

3. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, где вариабельный домен тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID No 13, SEQ ID No 15, SEQ ID No 17, SEQ ID No 19.

4. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где вариабельный домен легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичную аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID No 11.

5. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, где переменный домен легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID No 11.

6. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, включающее:

1) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичную последовательности, выбранной из группы SEQ ID No: 21, SEQ ID No: 23, SEQ ID No: 25, SEQ ID No: 27;

2) легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 29.

7. Моноклональное антитело по п. 6, включающее:

1) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы SEQ ID No: 21, SEQ ID No: 23, SEQ ID No: 25, SEQ ID No: 27;

2) легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

8. Моноклональное антитело по любому из пп. 1-7, которое представляет собой полноразмерное антитело IgG.

9. Моноклональное антитело по п. 8, где антитело относится к изотипу человека, выбранному из группы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

10. Нуклеиновая кислота, которая кодирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9, которые специфически связываются с участком бета цепи семейства TRBV9 Т клеточного рецептора человека.

11. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 10.

12. Способ получения клетки-хозяина для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9, включающий котрансформирование клетки вектором по п. 11, содержащим нуклеиновую кислоту по п. 10.

13. Клетка-хозяин для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 10.

14. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9, заключающийся в культивировании клетки-хозяина по п. 13 в культуральной среде в условиях, обеспечивающих продукцию указанного антитела, с последующим выделением и очисткой полученного антитела.

15. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого участком бета цепи семейства TRBV9 Т-клеточного рецептора человека, содержащая в эффективном количестве антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9, в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

16. Фармацевтическая композиция по п. 15, где указанные заболевание или нарушение выбирают из группы: анкилозирующий спондилит, целиакия, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома.

17. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения заболевания или нарушения, опосредуемого Т-клеточным рецептором человека, несущим бета цепь семейства TRBV9, содержащая в эффективном количестве антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9 и, в эффективном количестве, по меньшей мере, одно другое терапевтически активное соединение.

18. Фармацевтическая композиция по п. 17, где указанные заболевание или нарушение выбирают из группы: анкилозирующий спондилит, целиакия, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома.

19. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 17-18, где другое терапевтически активное соединение выбирают из малой молекулы, антитела или стероидных гормонов.

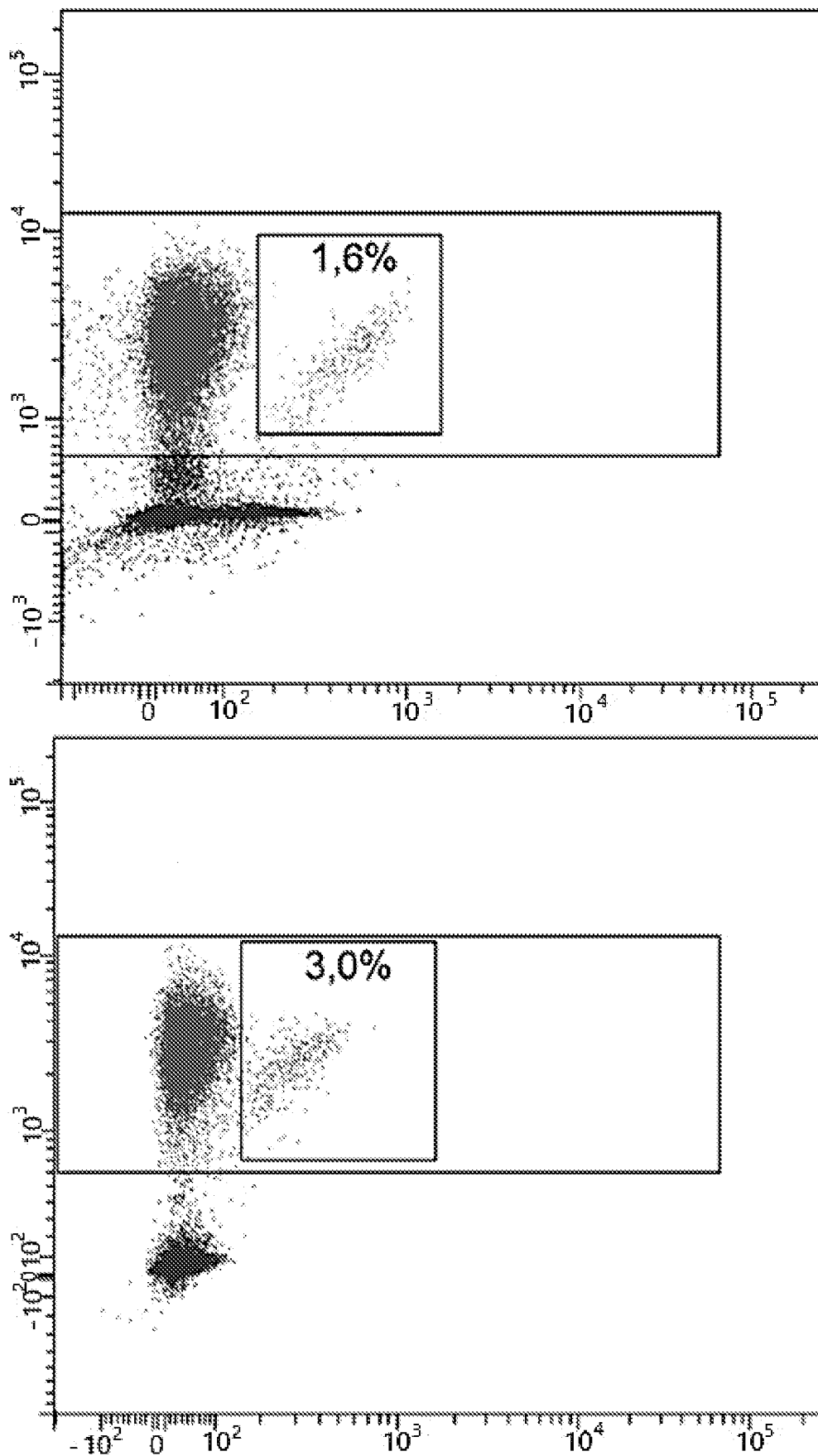
20. Способ ингибирования биологической активности Т-клеточного рецептора, бета цепь которого относится к семейству TRBV9, у субъекта, нуждающегося в таком ингибировании, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9.

21. Способ лечения заболевания или нарушения, опосредованного Т-клеточным рецептором человека, несущим бета цепь семейства TRBV9, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9 или фармацевтической композиции по п. 15 в терапевтически эффективном количестве.

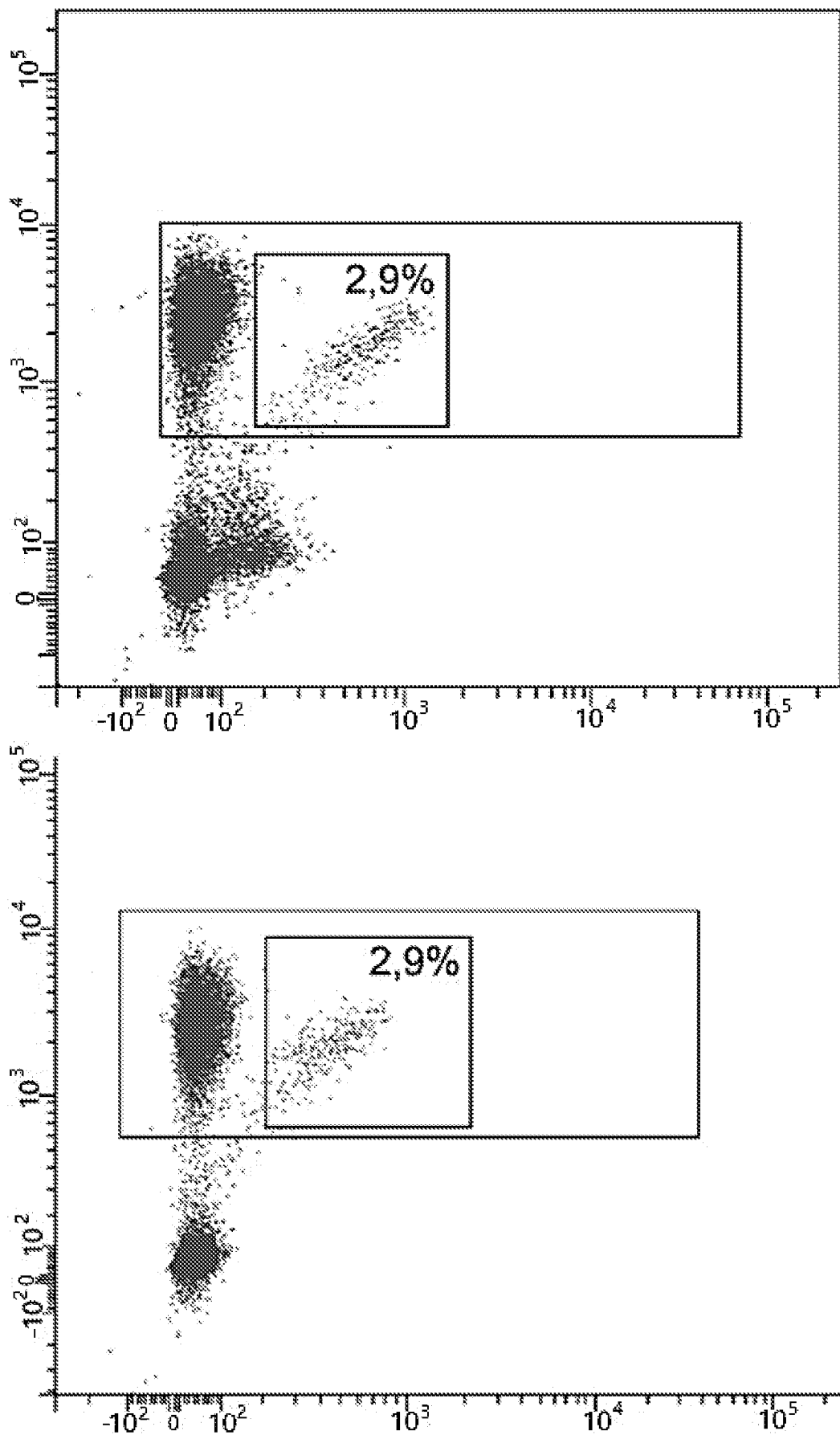
22. Способ лечения заболевания или нарушения по п. 21, где заболевание или нарушение выбрано из группы: анкилозирующий спондилит, целиакия, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома.

23. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9 или фармацевтической композиции по п. 15 для лечения у субъекта, нуждающегося в таком лечении, заболевания или нарушения, опосредуемого Т-клеточным рецептором человека, несущим бета цепь семейства TRBV9.

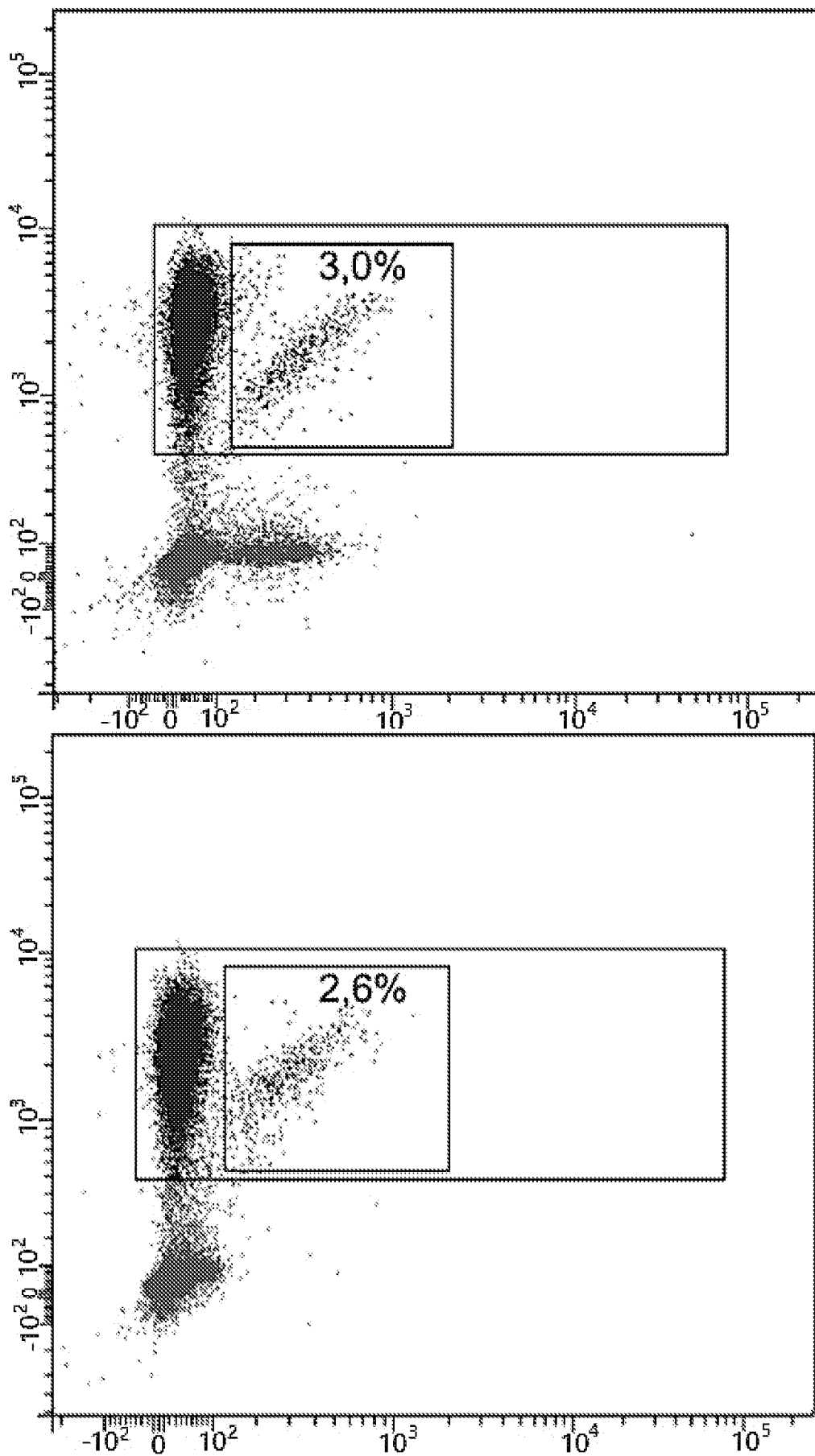
24. Применение по п. 23, где заболевание выбрано из группы: анкилозирующий спондилит, целиакия, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточная лимфома.



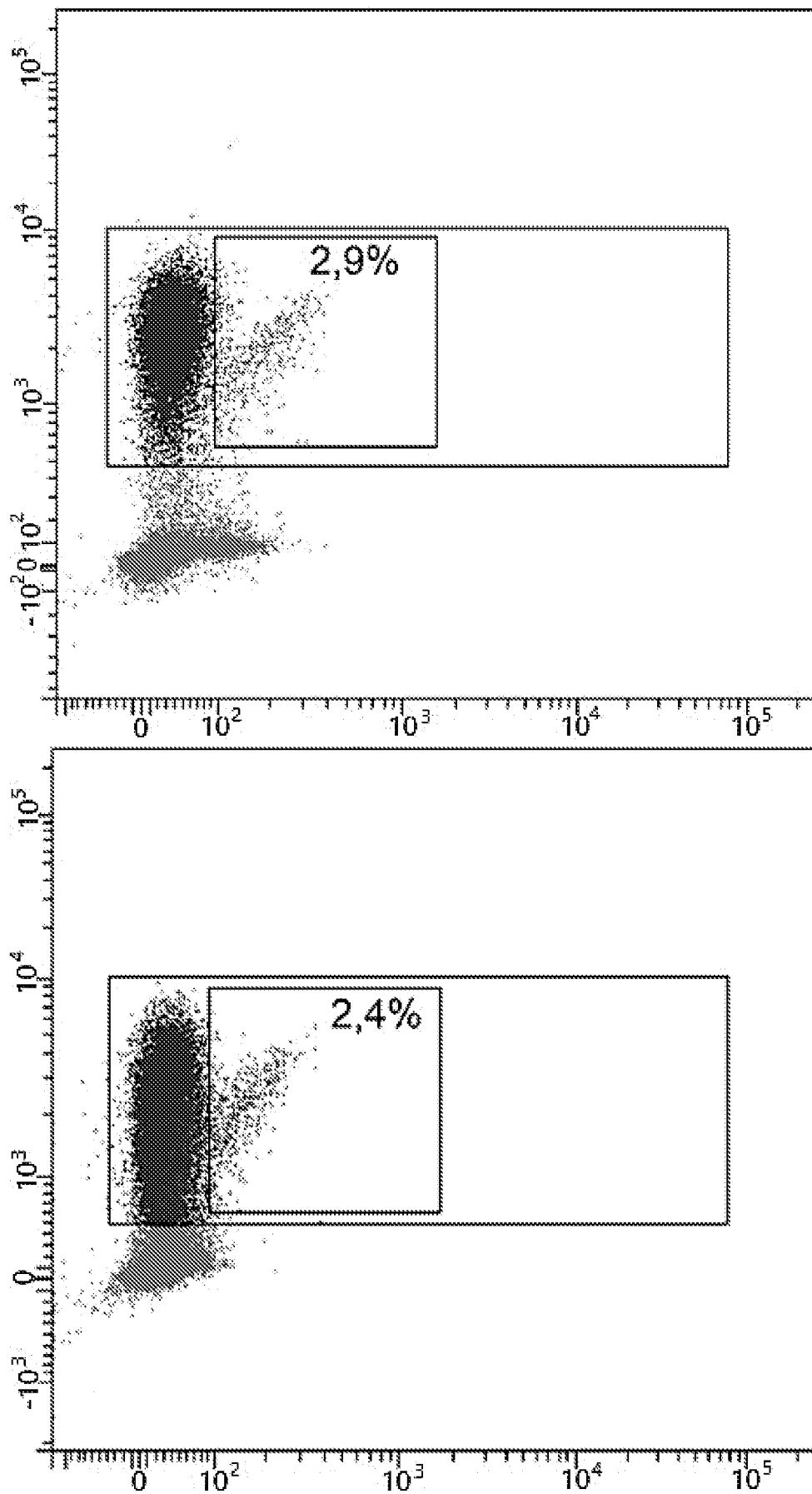
Фиг.1



Фиг. 2



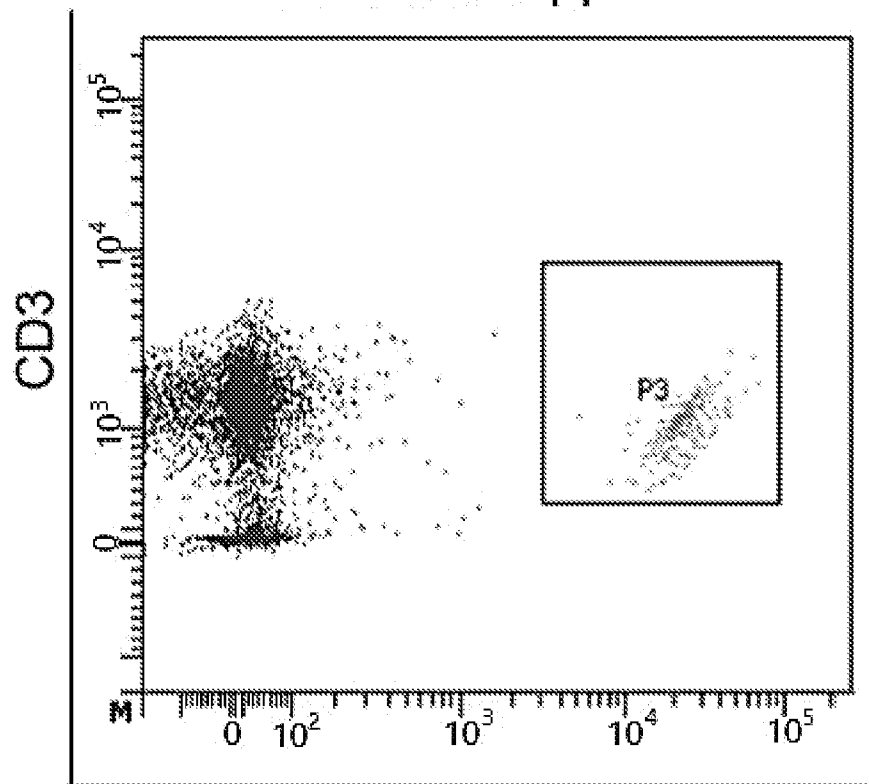
Фиг. 3



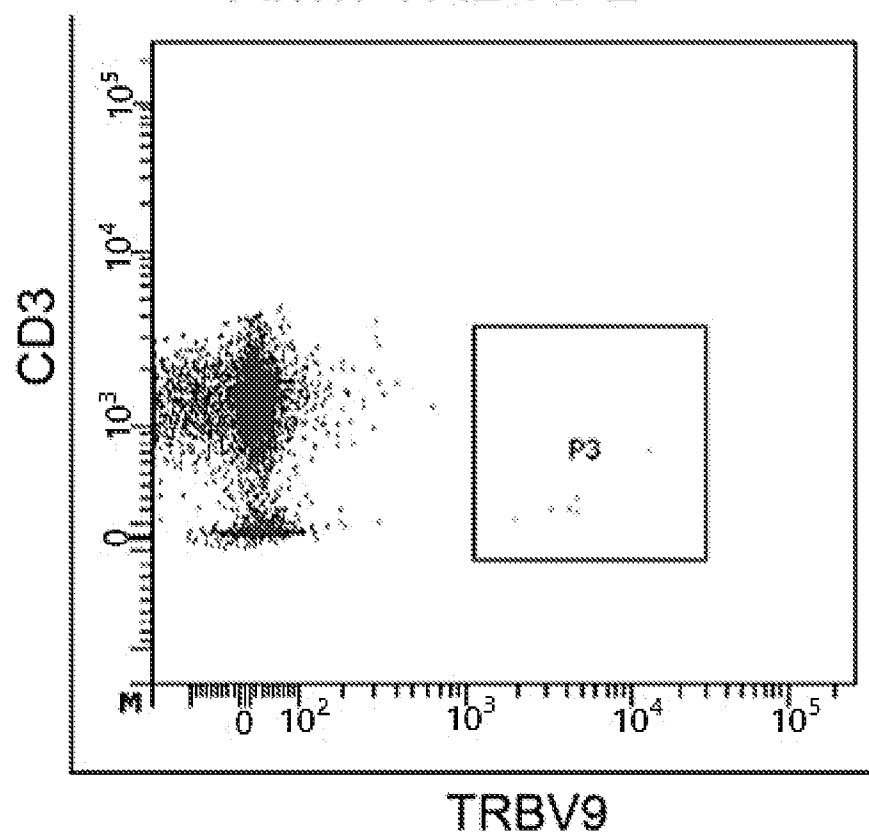
Фиг. 4

5/5

РЕМИКЕЙД



Анти-TRBV9-2



Фиг. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2018/050168

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See supplemental sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/28, C12N 5/10, 15/13, 15/63, A61K 39/395, A61P 1/00, 35/00, 37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatSearch, Espacenet, USPTO, Google

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TOYABE S et. al. "Biclonal expansion of T cells infected with monoclonal Epsteinvims (EBV) in a patient with chronic, active EBV infection", Clinical & Experimental Immunology, Vol. 135, Is. 1, October 2003, p. 92-97, 08.09.2003	1-31
A	WO 2017/137453 A1 (POLYBIOCEPT AV) 17.08.2017	1-31
A	RU 2539032 C2 (FRED KHATCHINSON KANSER RISECH SENTER) 10.01.2015	1-31



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 March 2019 (07.03.2019)

Date of mailing of the international search report

07 May 2019 (07.05.2019)

Name and mailing address of the ISA/
RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2018/050168

A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ

(см. дополнительный лист)

Согласно Международной патентной классификации МПК

B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА

Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)

C07K 16/28, C12N 5/10, 15/13, 15/63, A61K 39/395, A61P 1/00, 35/00, 37/00

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

PatSearch, Espacenet, USPTO, Google

C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	TOYABE S et. al. "Biclonal expansion of T cells infected with monoclonal Epsteinvirus (EBV) in a patient with chronic, active EBV infection", Clinical & Experimental Immunology, Vol. 135, Is. 1, October 2003, с. 92-97, 08.09.2003	1-31
A	WO 2017/137453 A1 (POLYBIOCEPT AB) 17.08.2017	1-31
A	RU 2539032 C2 (ФРЕД ХАТЧИНСОН КАНСЭР РИСЕЧ СЕНТЕР) 10.01.2015	1-31



последующие документы указаны в продолжении графы C.



данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным

“Е” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее

“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)

“О” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.

“Р” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета

“Т”

более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение

“Х”

документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности

“У”

документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста

“&”

документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного поиска

07 марта 2019 (07.03.2019)

Дата отправки настоящего отчета о международном поиске

07 мая 2019 (07.05.2019)

Наименование и адрес ISA/RU:

Федеральный институт промышленной собственности,
Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59,
ГСП-3, Россия, 125993
Факс: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37

Уполномоченное лицо:

Лаптева М.

Телефон № 8 (495)-531-64-81

C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)