

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391391** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.09.20**

(51) Int. Cl. *C07K 16/40* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2021.12.16**

---

(54) **СВЯЗЫВАЮЩИЕ GUCY2C МОЛЕКУЛЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) PCT/CN2020/137164

(32) 2020.12.17

(33) CN

(86) PCT/CN2021/138845

(87) WO 2022/127871 2022.06.23

(71) Заявитель:  
**ПАРАСОЛ БИОТЕК ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:

**Хэ Лин, Ван Линь, Ван Вэй (CN)**

(74) Представитель:

**Билык А.В., Поликарпов А.В.,  
Соколова М.В., Путинцев А.И.,  
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев  
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.  
(RU)**

---

(57) В настоящем изобретении предложены однодоменные антитела, которые связываются с GUCY2C, и содержащие их химерные антигенные рецепторы. Кроме того, предложены сконструированные иммунные эффекторные клетки (такие как Т-клетки), содержащие химерные антигенные рецепторы. Также предложены фармацевтические композиции, наборы и способы лечения заболевания или нарушения.

**202391391**  
**A1**

**202391391**  
**A1**

## СВЯЗЫВАЮЩИЕ GUCY2C МОЛЕКУЛЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Данная заявка испрашивает приоритет по международной заявке № PCT/CN2020/137164, поданной 17 декабря 2020 г., которая полностью и для всех целей включена в данный документ посредством ссылки.

### 1. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее изобретение относится к однодоменным антителам к GUCY2C, химерным антигенным рецепторам, сконструированным иммунным эффекторным клеткам и способам их применения. Настоящее изобретение дополнительно относится к активации и экспансии клеток для терапевтического применения, особенно к иммунотерапии на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором.

### 2. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Колоректальный рак является одним из наиболее распространенных типов злокачественного новообразования во всем мире, на его долю приходится около 10% всех случаев опухолей и 8,5% всех летальных исходов от злокачественных новообразований. Для заболеваемости колоректальным раком наблюдается тенденция к постепенному снижению возраста пациентов, и число пациентов моложе 40 лет составляет 2%-8% от всех пациентов с колоректальным раком. В настоящее время лечение колоректального рака построено на комбинировании хирургии, лучевой терапии и химиотерапии. Большинство пациентов с ранней стадией заболевания имеют хороший прогноз после лечения традиционными методами лечения, но для пациентов с колоректальным раком с метастазами прогноз плохой, а 5-летняя выживаемость очень низкая. Существующее лечение не может устранить латентные остаточные опухолевые клетки или затормозить рост метастазов. Терапия на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR-T) является новой и многообещающей иммунотерапией злокачественного новообразования.

[0003] Несбалансированный гомеостаз эпителиальных клеток толстой кишки, который способствует образованию опухолей кишечника, вызван отсутствием лиганда гуанилатциклазы С (GUCY2C; GCC) (Waldman, S.A. and M. Camilleri, Gut, 67(8): 1543-1552 (2018)). GUCY2C является членом семейства N-связанных гликопротеинов рецепторов гуанилатциклазы и представляет собой специфический к тканям кишечника полипептид. Он экспрессируется в эпителиальных клетках, расположенных в слизистой оболочке кишечника от тонкой кишки до прямой кишки, но не в нормальных тканях желудка и пищевода. Рецепторы GUCY2C могут регулировать пролиферацию и дифференцировку эпителиальных клеток слизистой оболочки тонкого кишечника посредством зависимых от циклического гуанилфосфата (сGMP) механизмов. Было показано, что GUCY2C стабильно

экспрессируется в клетках первичного колоректального рака, а экспрессия GUCY2C в клетках метастатического колоректального рака в 2-10 раз выше, чем в нормальных эпителиальных клетках кишечника (Carrithers et al., Proceedings of the National Academy of Sciences, 93(25): 14827-14832 (1996)), что делает GUCY2C потенциальной мишенью для лечения колоректального рака. В данной области техники существует потребность в улучшенных связывающих GUCY2C молекулах и сконструированных клетках, нацеленных на GUCY2C, например, для применения в более эффективной или действенной терапии CAR-T-клетками.

### 3. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0004]** В одном аспекте в данном документе предложено однодоменное антитело к GUCY2C (sdAb), содержащее: (i) CDR1, включающую аминокислотную последовательность  $X_1YGMX_2$ , где  $X_1$  представляет собой A, I или V, а  $X_2$  представляет собой D или G (SEQ ID NO: 64); (ii) CDR2, включающую аминокислотную последовательность  $X_3IX_4LSGRX_5X_6YX_7DAVX_8G$ , где  $X_3$  представляет собой A, S или T;  $X_4$  представляет собой F, W или Y;  $X_5$  представляет собой S или T;  $X_6$  представляет собой E, N или T;  $X_7$  представляет собой A, S или T; и  $X_8$  представляет собой K или Q (SEQ ID NO: 65); и (iii) CDR3, включающую аминокислотную последовательность  $GX_9X_{10}TAX_{11}SX_{12}RQY$ , где  $X_9$  представляет собой A, E или P;  $X_{10}$  представляет собой P или T;  $X_{11}$  представляет собой S или T; и  $X_{12}$  представляет собой G или V (SEQ ID NO: 66).

**[0005]** В некоторых вариантах осуществления CDR1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19-26; CDR2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27-34; и CDR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35-42.

**[0006]** В некоторых вариантах осуществления sdAb к GUCY2C, представленное в данном документе, содержит (i) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35; (ii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36; (iii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; (iv) CDR1, включающую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38;(v) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; (vi) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; (vii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; или (viii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

**[0007]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено однодоменное антитело к GUCY2C (sdAb), содержащее (i) CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, указанные в SEQ ID NO: 3; (ii) CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, указанные в SEQ ID NO: 4; (iii) CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, указанные в SEQ ID NO: 5; (iv) CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, указанные в SEQ ID NO: 6; (v) CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, указанные в SEQ ID NO: 7; (vi) CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, указанные в SEQ ID NO: 8; (vii) CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, указанные в SEQ ID NO: 9; или (viii) CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, указанные в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления CDR1, CDR2 или CDR3 определяют в соответствии со схемой нумерации Kabat, схемой нумерации IMGT, схемой нумерации AbM, схемой нумерации Chothia, схемой нумерации Contact или их комбинацией.

**[0008]** В некоторых вариантах осуществления sdAb, представленное в данном документе, дополнительно содержит одну или более областей FR, указанных в любой из SEQ ID NO:

3-10.

**[0009]** В некоторых вариантах осуществления sdAb к GUCY2C, представленное в данном документе, содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 3-10. В некоторых вариантах осуществления sdAb к GUCY2C, представленное в данном документе, содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 3-10.

**[0010]** В некоторых вариантах осуществления sdAb к GUCY2C представляет собой sdAb верблюдовых. В других вариантах осуществления sdAb к GUCY2C представляет собой гуманизированное sdAb.

**[0011]** В некоторых вариантах осуществления sdAb к GUCY2C генетически слито или химически конъюгировано с агентом.

**[0012]** В еще одном аспекте в данном документе предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий sdAb к GUCY2C, представленное в данном документе, (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен.

**[0013]** В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен дополнительно содержит один или более дополнительных антигенсвязывающих доменов. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен получен из молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения трансмембранный домен получен из CD8 $\alpha$ .

**[0014]** В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ .

**[0015]** В других вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137 (4-1BB), OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен получены от CD137.

**[0016]** В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению дополнительно содержит шарнирный домен, расположенный между C-концом

внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен получен из CD8 $\alpha$ .

**[0017]** В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению дополнительно содержит сигнальный пептид, расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид получен из CD8 $\alpha$ .

**[0018]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен химерный антигенный рецептор (CAR), включающий (i) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 48-55; или (ii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 48-55.

**[0019]** В еще одном аспекте в данном документе предложена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую sdAb к GUCY2C, представленное в данном документе. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота, представленная в данном документе, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 11-18.

**[0020]** В еще одном аспекте в данном документе предложен вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую однодоменные антитела, представленные в данном документе.

**[0021]** В еще одном аспекте в данном документе предложена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, представленный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота, представленная в данном документе, включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 56-63.

**[0022]** В еще одном аспекте в данном документе предложен вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, представленный в данном документе.

**[0023]** В еще одном аспекте в данном документе предложена сконструированная иммунная эффекторная клетка, содержащая CAR, выделенную нуклеиновую кислоту или вектор, которые представлены в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку.

**[0024]** В еще одном аспекте в данном документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая sdAb к GUCY2C, сконструированную иммунную эффекторную клетку или вектор, которые представлены в данном документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0025] В еще одном аспекте в данном документе предложен способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества sdAb к GUCY2C, сконструированных иммунных эффекторных клеток или фармацевтической композиции, которые представлены в данном документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой ассоциированное с GUCY2C заболевание или нарушение. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой колоректальный рак, рак желудка или рак пищевода.

#### 4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0026] На Фиг. 1 показана электрофореграмма колонии фаговой библиотеки антител. Первая дорожка представляет собой ДНК-маркер DL2000, последняя дорожка представляет собой отрицательный контроль в виде плазмиды pComb3XSS, а 1-23 представляют собой фаговую библиотеку моноклональных антител. Отобрали 23 моноклона, из которых 22 моноклона были положительными клонами, а частота вставок составила 96%.

[0027] На Фиг. 2 показаны значения при ОП450 для клонов VHH во время скрининга антител.

[0028] На Фиг. 3 показано выравнивание иллюстративных доменов VHH, представленных в данном документе.

[0029] На Фиг. 4А представлена схема вектора для трансформации pLVX-WT-G1. Промотор CMV pLVX-Ribo заменяется промотором EF-1a, а после промотора EF-1a добавляются шарнир CD8, трансмембранный домен CD8, 4-1BB и CD3z.

[0030] На Фиг. 4В показан анализ методом проточной цитометрии для определения частоты положительных событий в виде CAR-T-клеток, окрашенных вторичным антителом на основе домена VHH к IgG альпаки.

[0031] На Фиг. 5 показана флуоресцентная фотография T84, трансфицированных GFP и различными T-клетками с CAR к GUCY2C, которые совместно культивировали в течение 24 часов при соотношении эффектор:клетки-мишени 2:1. Различные совместно культивируемые линии CAR-T-клеток представляли собой (A) клон C08, (B) клон C12, (C) клон C13, (D) клон C15, (E) клон C21, (F) клон C27, (G) клон C30, (H) клон C31, (I) T-клетка, (J) только клетка T84 и (K) клетка T84 с агентом для лизиса клеток.

[0032] На Фиг. 6 представлена гистограмма, демонстрирующая специфическую цитолитическую активность различных T-клеток с CAR к GUCY2C. CAR-T-клетки и T-клетки культивировали совместно с клетками T84 при соотношении эффектор:клетки-

мишени 2:1. Процент специфического клеточного лизиса в отношении клеток T84 рассчитывали в конце совместного культивирования.

**[0033]** На **Фиг. 7А** показан рост опухоли после лечения Т-клетками с CAR к GUCY2C в NCG-мышинной модели опухоли T84. Иммунодефицитным мышам NCG вводили  $5 \times 10^6$  экспрессирующих люциферазу клеток колоректального рака T84 посредством подкожной инъекции и лечили  $3 \times 10^6$  Т-клетками или CAR-Т-клетками клона C08 на 14-й день путем инъекции в хвостовую вену. Сплошная линия: инъецированные Т-клетки, пунктирная линия: инъецированные CAR-Т-клетки клона C08. На **Фиг. 7В** показан рост опухоли после лечения Т-клетками с CAR к GUCY2C в NCG-мышинной модели опухоли T84. Иммунодефицитным мышам NCG вводили  $5 \times 10^6$  экспрессирующих люциферазу клеток колоректального рака T84 посредством подкожной инъекции и лечили  $3 \times 10^6$  Т-клетками, CAR-Т-клетками клона C12 или CAR-Т-клетками клона C13 на 14-й день путем инъекции в хвостовую вену. Сплошная линия: инъецированные Т-клетки, пунктирная линия: инъецированные CAR-Т-клетки клона C12, пунктирная линия: инъецированные CAR-Т-клетки клона C13. На **Фиг. 7С** показан рост опухоли после лечения Т-клетками с CAR к GUCY2C в NCG-мышинной модели опухоли T84. Иммунодефицитным мышам NCG вводили  $5 \times 10^6$  экспрессирующих люциферазу клеток колоректального рака T84 посредством подкожной инъекции и лечили  $3 \times 10^6$  Т-клетками, CAR-Т-клетками клона C15 или CAR-Т-клетками клона C21 на 14-й день путем инъекции в хвостовую вену. Сплошная линия: Инъецированные Т-клетки, пунктирная линия: инъецированные CAR-Т-клетки клона C15, пунктирная линия: инъецированные CAR-Т-клетки клона C21.

## **5. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0034]** Настоящее изобретение частично основано на новых однодоменных антителах (например, доменах VHH), которые связываются с GUCY2C, химерных антигенных рецепторов или сконструированных клеток, содержащих их, и их улучшенных свойствах.

### **5.1 Определения**

**[0035]** Методики и процедуры, описанные или упомянутые в данном документе, включают те, которые в целом хорошо понятны и/или обычно используются специалистами в данной области техники с использованием традиционной методологии, например, широко используемые методологии, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3d ed. 2001); *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al. eds., 2003); *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic* (An ed. 2009); *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols* (Albitar ed. 2010); и *Antibody Engineering Vols 1 and 2* (Kontermann and Dübel eds., 2d ed. 2010). Если в данном документе не указано иное, технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значения,

которые обычно понятны специалистам в данной области техники. Для целей интерпретации этого описания будет применяться следующее описание терминов, и, когда это уместно, термины, используемые в единственном числе, также будут включать множественное число, и наоборот. В случае, когда какое-либо из приведенных описаний терминов противоречит любому документу, включенному в данный посредством ссылки, приоритет имеет описание термина, приведенное ниже.

**[0036]** Термины «антитело», «иммуноглобулин» или «Ig» взаимозаменяемо употребляются в данном документе и используются в самом широком смысле и, в частности, включают, например, моноклональные антитела (включая агонистические, антагонистические, нейтрализующие антитела, полноразмерные или интактные моноклональные антитела), композиции антител с полиэпитопной или моноэпитопной специфичностью, поликлональные или моновалентные антитела, поливалентные антитела, полиспецифические антитела (*например*, биспецифические антитела при условии, что они проявляют необходимую биологическую активность), образованные по меньшей мере из двух интактных антител, одноцепочечные антитела и их фрагменты (*например*, доменные антитела), описанные ниже. Антитело может быть человеческим, гуманизированным, химерным и/или иметь созревшую аффинность, а также антителом других видов, *например*, мыши, кролика, ламы и *т. д.* Подразумевается, что термин «антитело» включает полипептидный продукт В-клеток в рамках иммуноглобулинового класса полипептидов, который способен связываться с конкретным молекулярным антигеном и состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, где каждая пара содержит одну тяжелую цепь (около 50–70 кДа) и одну легкую цепь (около 25 кДа), каждая аминоконцевая часть каждой цепи содержит переменную область от около 100 до около 130 или более аминокислот, а каждая карбокси-концевая часть содержит константную область. *См., например, Antibody Engineering (Borregaard ed., 2d ed. 1995); и Kuby, Immunology (3d ed. 1997).* Антитела также включают, но не ограничиваются ими, синтетические антитела, рекомбинантно полученные антитела, однодоменные антитела, в том числе из видов Camelidae (*например*, ламы или альпаки) или их гуманизированные варианты, интратела, антиидиотипические (анти-Id) антитела и функциональные фрагменты (*например*, антигенсвязывающие фрагменты) любого из вышеуказанных, что относится к части полипептида тяжелой или легкой цепи антитела, которая сохраняет часть или всю активность связывания антитела, из которого был получен фрагмент. Неограничивающие примеры функциональных фрагментов (*например*, антигенсвязывающих фрагментов) включают одноцепочечные Fv (scFv) (*например*, включая моноспецифические, биспецифические *и т. д.*), фрагменты Fab, фрагменты F(ab'), фрагменты F(ab)<sub>2</sub>, фрагменты F(ab')<sub>2</sub>, дисульфид-связанные Fv (dsFv),

фрагменты Fd, фрагменты Fv, диатело, триатело, тетратело и минитело. В частности, предложенные в данном документе антитела включают молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные части молекул иммуноглобулина, например, антигенсвязывающие домены или молекулы, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном (*например*, одна или более CDR антитела). Такие фрагменты антитела можно найти, например, в Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1989); Mol. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers ed., 1995); Huston *et al.*, 1993, Cell Biophysics 22:189-224; Plückthun and Skerra, 1989, Meth. Enzymol. 178:497-515; и Day, Advanced Immunochemistry (2d ed. 1990). Предложенные в данном документе антитела могут принадлежать любому классу (*например*, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA) или любому подклассу (*например*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) молекул иммуноглобулина. Антитела могут быть агонистическими антителами или антагонистическими антителами. Антитела могут быть ни агонистическими, ни антагонистическими.

**[0037]** «Антиген» представляет собой структуру, с которой может избирательно связываться антитело. Целевой антиген может представлять собой полипептид, углевод, нуклеиновую кислоту, липид, гаптен или другое природное или синтетическое соединение. В некоторых вариантах осуществления целевой антиген представляет собой полипептид. В определенных вариантах осуществления антиген связан с клеткой, например, присутствует на клетке или внутри нее.

**[0038]** «Интактное» антитело представляет собой антитело, содержащее антигенсвязывающий сайт, а также CL и по меньшей мере константные области тяжелой цепи CH1, CH2 и CH3. Константные области могут включать человеческие константные области или варианты их аминокислотной последовательности. В определенных вариантах осуществления интактное антитело имеет одну или более эффекторных функций.

**[0039]** «Одноцепочечные Fv», также имеющие аббревиатуру «sFv» или «scFv», представляют собой фрагменты антител, которые содержат домены антител VH и VL, связанные в одну полипептидную цепь. Предпочтительно, полипептид sFv также содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, позволяющий sFv образовывать структуру, необходимую для связывания с антигеном. Обзор по sFv см. у Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

**[0040]** Термин «антитело, состоящее только из тяжелых цепей» или «HCAb» относится к функциональному антителу, которое содержит тяжелые цепи, но не содержит легких цепей, обычно присутствующих в 4-цепочечных антителах. Известно, что животные семейства

верблюжьих (такие как верблюды, ламы или альпаки) производят HCAb.

**[0041]** В контексте данного документа «однодоменное антитело» или «sdAb» относится к одному мономерному переменному домену антитела, который способен связываться с антигеном (например, однодоменные антитела, которые связываются с GUCY2C). Однодоменные антитела включают домены VHH, как описано в данном документе. Примеры однодоменных антител включают, но не ограничиваются ими, антитела, в которых естественным образом отсутствуют легкие цепи, такие как антитела видов Camelidae (например, ламы), однодоменные антитела, полученные из обычных 4-цепочечных антител, сконструированные антитела и однодоменные каркасы, отличные от полученных из антител. Однодоменные антитела могут быть получены из любых видов, включая, но не ограничиваясь ими, мышь, человека, верблюда, ламу, козу, кролика и крупный рогатый скот. Например, однодоменное антитело может быть получено из антител, выработанных у видов Camelidae, например, у верблюда, ламы, одногорбого верблюда, альпаки и гуанако, как описано в данном документе. Другие виды, помимо Camelidae, могут продуцировать антитела, содержащие только тяжелые цепи, в которых естественным образом отсутствуют легкие цепи; VHH, полученные из таких других видов, входят в объем настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело (например, VHH), представленное в данном документе, имеет структуру FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Однодоменные антитела могут быть генетически слиты или химически конъюгированы с другой молекулой (например, с агентом), как описано в данном документе. Однодоменные антитела могут быть частью более крупной связывающей молекулы (например, полиспецифического антитела или химерного антигенного рецептора).

**[0042]** Термины «связывается» или «связывание» относятся к взаимодействию между молекулами, включая, например, образование комплекса. Взаимодействия могут быть, например, нековалентными взаимодействиями, включая водородные связи, ионные связи, гидрофобные взаимодействия и/или ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Комплекс также может включать связывание двух или более молекул, удерживаемых вместе ковалентными или нековалентными связями, взаимодействиями или силами. Сила общих нековалентных взаимодействий между одним антигенсвязывающим сайтом на антителе и одним эпитопом целевой молекулы, такой как антиген, представляет аффинность антитела или функционального фрагмента к этому эпитопу. Отношение скорости диссоциации ( $k_{off}$ ) к коэффициенту ассоциации ( $k_{on}$ ) связывающей молекулы (например, антитела) к моновалентному антигену ( $k_{off}/k_{on}$ ) представляет собой константу диссоциации  $K_D$ , что обратно пропорционально аффинности. Чем меньше  $K_D$ , тем больше аффинность антитела.

Значение  $K_D$  варьируется для разных комплексов антитела и антигена и зависит как от  $k_{on}$ , так и от  $k_{off}$ . Константа диссоциации  $K_D$  для антитела, представленного в данном документе, может быть определена с использованием любого способа, представленного в данном документе, или любого другого способа, хорошо известного специалистам в данной области техники. Аффинность в одном сайте связывания не всегда отражает истинную силу взаимодействия между антителом и антигеном. Когда комплексные антигены, содержащие множество повторяющихся антигенных детерминант, такие как поливалентный антиген, вступают в контакт с антителами, содержащими множество сайтов связывания, взаимодействие антитела с антигеном в одном сайте будет повышать вероятность реакции во втором сайте. Сила таких множественных взаимодействия между поливалентным антителом и антигеном называется авидностью.

**[0043]** В отношении связывающих молекул, описанных в данном документе, такие термины, как «связываться с», «специфически связывающиеся с» и аналогичные термины, также используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к связывающим молекулам антигенсвязывающих доменов, которые специфически связываются с антигеном, таким как полипептид. Связывающая молекула или антигенсвязывающий домен, которые связываются или специфически связываются с антигеном, можно идентифицировать, например, с помощью иммуноанализа, Octet<sup>®</sup>, Biacore<sup>®</sup> или других методов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления связывающая молекула или антигенсвязывающий домен связываются с антигеном или специфически связываются с антигеном, когда оно связывается с антигеном с более высокой аффинностью, чем с любым перекрестно-реактивным антигеном, как определено с использованием экспериментальных методов, таких как радиоиммуноанализ (РИА) и иммуноферментный анализ (ИФА). Как правило, специфическая или селективная реакция будет по меньшей мере вдвое превышать фоновый сигнал или шум, и может более чем в 10 раз превышать фон. См., например, Fundamental Immunology 332-36 (Paul ed., 2d ed. 1989) в отношении обсуждения, касающегося специфичности связывания. В определенных вариантах осуществления степень с которой связывающая молекула или антигенсвязывающего домен с «нецелевым» белком составляет менее чем около 10 % от связывания связывающей молекулы или антигенсвязывающего домена с ее конкретным антигеном-мишенью, например, как определяется с помощью анализа на основе сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или РИА. Связывающая молекула или антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном, включает молекулу, которая способна связывать антиген с достаточной аффинностью, так что связывающая молекула может использоваться, например, в качестве терапевтического

и/или диагностического агента для нацеливания на антиген. В определенных вариантах осуществления связывающая молекула или антигенсвязывающий домен, которые связываются с антигеном, имеет константу диссоциации ( $K_D$ ), меньшую или равную 1 мкМ, 800 нМ, 600 нМ, 550 нМ, 500 нМ, 300 нМ, 250 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ или 0,1 нМ. В определенных вариантах осуществления связывающая молекула или антигенсвязывающий домен связываются с эпитопом антигена, который является консервативным среди антигенов разных видов.

**[0044]** В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы или антигенсвязывающие домены могут содержать «химерные» последовательности, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от определенного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, а остальная часть цепи(-ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность (см. патент США № 4816567; и Morrison *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-55). Химерные последовательности могут включать гуманизированные последовательности.

**[0045]** В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы или антигенсвязывающие домены могут содержать части «гуманизированных» форм нечеловеческих (например, антител верблюдовых, мыши, отличных от человека животных) антител, которые включают последовательности иммуноглобулинов человека (например, реципиентное антитело), в которых нативные остатки CDR заменяют остатками из соответствующей CDR вида, отличного от человека, (например, донорного антитела), такого как верблюд, мышь, крыса, кролик или отличный от человека примат, имеющей желаемую специфичность, аффинность и эффективность. В некоторых случаях один или более остатков области FR последовательностей иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые отсутствуют в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации осуществляют для дополнительного улучшения характеристик антитела. Тяжелая или легкая цепь гуманизированного антитела может содержать практически все из по меньшей одной или более переменных областей, в которых все или практически все CDR соответствуют таковым из не принадлежащего человеку иммуноглобулина, а все или практически все FR

получены из последовательности иммуноглобулина человека. В определенных вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Для получения дополнительной информации см. Jones *et al.*, Nature 321:522-25 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-29 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-96 (1992); Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-89 (1992); патенты США №№ 6800738; 6719971; 6639055; 6407213; и 6054297.

**[0046]** В определенных вариантах осуществления связывающие молекулы или антигенсвязывающие домены могут содержать части «полностью человеческого антитела» или «человеческого антитела», где термины используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к антителу, которое содержит переменную область человека, и, например, константную область человека. Связывающие молекулы могут содержать однодоменную последовательность антитела. В конкретных вариантах осуществления термины относятся к антителу, которое содержит переменную область и константную область человеческого происхождения. «Полностью человеческие» антитела в некоторых вариантах осуществления могут также включать антитела, которые связывают полипептиды и кодируются последовательностями нуклеиновых кислот, которые представляют собой встречающиеся в природе соматические варианты последовательности нуклеиновой кислоты иммуноглобулина зародышевой линии человека. Термин «полностью человеческое антитело» включает антитела, имеющие переменные и константные области, соответствующие последовательностям иммуноглобулина зародышевой линии человека, как описано в Kabat *et al.* (См. Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). «Человеческое антитело» представляет собой антитело, которое имеет аминокислотную последовательность, которая соответствует таковой из антитела, вырабатываемого человеком, и/или была создана с помощью любых технологий получения человеческих антител. Из этого определения антитела человека, в частности, исключено гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки нечеловеческого происхождения. Человеческие антитела можно получать, используя различные технологии, известные в данной области техники, включая библиотеки фагового дисплея (Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581 (1991)) и библиотеки дрожжевого дисплея (Chao *et al.*, Nature Protocols 1: 755-68 (2006)). Также для получения человеческих моноклональных антител доступны способы, описанные в Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 77 (1985); Boerner *et al.*, J. Immunol. 147(1):86-95 (1991); и van Dijk and van de Winkel, Curr.

Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001). Человеческие антитела можно получать путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано так, чтобы вырабатывать такие антитела в ответ на стимуляцию антигеном, но чьи эндогенные локусы были инактивированы, *например*, мыши (см., например, Jakobovits, Curr. Opin. Biotechnol. 6(5):561-66 (1995); Brüggemann and Taussing, Curr. Opin. Biotechnol. 8(4):455-58 (1997); и патенты США №№ 6075181 и 6150584 относительно технологии XENOMOUSE™). См., также, например, Li *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3557-62 (2006) относительно человеческих антител, полученных с помощью технологии человеческой В-клеточной гибридомы.

**[0047]** В определенных вариантах осуществления связывающие молекулы или антигенсвязывающие домены могут содержать части «рекомбинантного человеческого антитела», при этом данный термин включает человеческие антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами, такими как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяин, антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных комбинаторных антител человека, антитела, выделенные из животного (*например*, мыши или коровы), которое является трансгенным и/или трансхромосомным по генам иммуноглобулина человека (см., *например*, Taylor, L. D. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295 (1992)) или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека могут иметь переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека (см. Kabat, E. A. *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). При этом в определенных вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела можно подвергать *in vitro* мутагенезу (или, в случае использования животного, трансгенного в отношении последовательностей человеческого Ig, *in vivo* соматическому мутагенезу) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей VH и VL рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей VH и VL человеческой зародышевой линии и родственны им, в природе могут не существовать в рамках репертуара антител человеческой зародышевой линии *in vivo*.

**[0048]** В некоторых вариантах осуществления связывающие молекулы или антигенсвязывающие домены могут содержать часть «моноклонального антитела», где

используемый в данном документе термин относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, например, отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах, или хорошо известных посттрансляционных модификаций, таких как изомеризация или дезамидирование аминокислот, окисление метионина или дезамидирование аспарагина или глутамина, каждое моноклональное антитело, как правило, распознает один эпитоп на антигене. В конкретных вариантах осуществления «моноклональное антитело», используемое в данном документе, представляет собой антитело, продуцируемое одной гибридомой или другой клеткой. Термин «моноклональное» не ограничен каким-либо конкретным способом получения антитела. Например, моноклональные антитела, применимые в настоящем изобретении, могут быть получены с помощью методологии гибридомы, впервые описанной Kohler *et al.*, Nature 256:495 (1975), или могут быть получены с использованием методов рекомбинантных ДНК в бактериальных или эукариотических клетках животных или растений (см., например, патент США № 4816567). «Моноклональные антитела» также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с помощью способов, описанных, например, в Clackson *et al.*, Nature 352:624-28 (1991) и Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-97 (1991). Другие способы получения клональных линий клеток и экспрессируемых ими моноклональных антител хорошо известны в данной области техники. См., например, Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.* eds., 5th ed. 2002).

**[0049]** Как правило, 4-цепочечная единица антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. В случае IgG 4-цепочечная единица в целом имеет массу около 150000 дальтон. Каждая L-цепь связана с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи связаны друг с другом одной или более дисульфидными связями в зависимости от изоформа H-цепи. Каждая H- и L-цепь также содержит расположенные на равном расстоянии друг от друга внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая H-цепь содержит на N-конце переменный домен (VH), за которым следуют три константных домена (CH) в случае каждой из  $\alpha$  и  $\gamma$  цепей и четыре CH-домена в случае изоформ  $\mu$  и  $\epsilon$ . Каждая L-цепь содержит на N-конце переменный домен (VL), за которым следует константный домен (CL) на другом конце. VL выровнена с VH, а CL выровнена с первым константным доменом тяжелой цепи (CH1). Считается, что конкретные аминокислотные остатки образуют область контакта между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи. Спаривание вместе VH и VL образует один антигенсвязывающий сайт. Информацию по структуре и свойствам разных классов антител

см., например, Basic and Clinical Immunology 71 (Stites *et al.* eds., 8th ed. 1994); и Immunobiology (Janeway *et al.* eds., 5<sup>th</sup> ed. 2001).

**[0050]** Термин «Fab» или «область Fab» относится к области антитела, которая связывается с антигенами. Обычный IgG, как правило, содержит две области Fab, каждая из которых расположена на одном из двух плеч Y-образной структуры IgG. Каждая область Fab обычно состоит из одной вариабельной области и одной константной области каждой из тяжелой и легкой цепи. Более конкретно, вариабельная область и константная область тяжелой цепи в области Fab представляют собой области VH и CH1, а вариабельная область и константная область легкой цепи в области Fab представляют собой области VL и CL. VH, CH1, VL и CL в области Fab могут быть расположены различными способами для придания антигенсвязывающей способности в соответствии с данным изобретением. Например, области VH и CH1 могут быть на одном полипептиде, а области VL и CL могут быть на отдельном полипептиде, аналогично области Fab обычного IgG. Альтернативно, все области VH, CH1, VL и CL могут быть на одном и том же полипептиде и ориентированы в разном порядке, как более подробно описано в разделах ниже.

**[0051]** Термины «вариабельная область», «вариабельный домен», «V-область» или «V-домен» относятся к части легкой или тяжелой цепей антитела, которая в общем случае расположена в амино-конце легкой или тяжелой цепи и имеет длину от около 120 до 130 аминокислот в тяжелой цепи и от около 100 до 110 аминокислот в легкой цепи, и обуславливает связывание и специфичность каждого конкретного антитела к его конкретному антигену. Вариабельная область тяжелой цепи может называться «VH». Вариабельная область легкой цепи может называться «VL». Термин «вариабельный» относится к тому факту, что определенные сегменты вариабельных областей сильно отличаются по последовательности среди разных антител. V-область опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела к его конкретному антигену. При этом вариабельность неравномерно распределена по 110-аминокислотному участку вариабельных областей. На самом деле V-области состоят из менее вариабельных (*например*, относительно инвариантных) участков, называемых каркасными областями (FR) из около 15–30 аминокислот, разделенных более короткими областями большей вариабельности (*например*, сильной вариабельности), называемыми «гипервариабельными областями», каждая из которых имеет длину около 9–12 аминокислот. Каждая из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей содержит по четыре FR, преимущественно принимающих  $\beta$ -складчатую конфигурацию, соединенных тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, соединяющие  $\beta$ -складчатую структуру, а в некоторых случаях, образующие ее часть. Гипервариабельные области каждой цепи удерживаются

вместе в непосредственной близости FR и, вместе с гипервариабельными областями другой цепи, участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антител (см., например, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th ed. 1991)). Константные области не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, однако проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) и комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ). Вариабельные области сильно отличаются по последовательности среди разных антител. В конкретных вариантах осуществления вариабельная область представляет собой вариабельную область человека.

**[0052]** Термины «нумерация остатков вариабельной области по Kabat» или «нумерация аминокислотных позиций по Kabat» и их вариации относятся к системе нумерации, используемой для вариабельных областей тяжелой цепи или вариабельных областей легкой цепи при составлении антител в Kabat *et al.*, *выше*. При использовании этой системы нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество или дополнительное количество аминокислот, что соответствует укорочению FR или CDR вариабельного домена или вставке в них. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может содержать вставку одной аминокислоты (остаток 52a в соответствии с Kabat) после остатка 52 и три вставленных остатка (например, остатки 82a, 82b и 82c и т. д. в соответствии с Kabat) после остатка 82. Нумерация остатков по Kabat может быть определена для данного антитела путем выравнивания областей гомологии в последовательности антитела со «стандартной» пронумерованной по Kabat последовательностью. Система нумерации по Kabat в общем случае используется для обозначения остатка в вариабельном домене (приблизительно, остатки 1–107 легкой цепи и остатки 1–113 тяжелой цепи) (например, Kabat *et al.*, *выше*). «Система нумерации EU» или «индекс EU» в общем случае используется для обозначения остатка в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс EU, описанный в Kabat *et al.*, *выше*). «Индекс EU по Kabat» относится к нумерации остатков человеческого антитела IgG 1 EU. Были описаны другие системы нумерации, например, AbM, Chothia, Contact, IMGT и АНоп.

**[0053]** Термин «тяжелая цепь», употребляемый в отношении антитела, относится к полипептидной цепи массой около 50–70 кДа, в которой амино-концевая часть содержит вариабельную область от около 120 до 130 или более аминокислот, а карбокси-концевая часть содержит константную область. Константная область может принадлежать одному из пяти разных типов (например, изоформ), называемых альфа ( $\alpha$ ), дельта ( $\delta$ ), эpsilon ( $\epsilon$ ), гамма ( $\gamma$ ) и мю ( $\mu$ ) на основании аминокислотной последовательности константной области

тяжелой цепи. Разные тяжелые цепи отличаются по размеру:  $\alpha$ ,  $\delta$  и  $\gamma$  содержат приблизительно 450 аминокислот, тогда как  $\mu$  и  $\epsilon$  содержат приблизительно 550 аминокислот. В комбинации с легкой цепью эти разные типы тяжелых цепей обуславливают наличие пяти хорошо известных классов (например, изотипов) антител, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно, включая подклассы IgG, а именно IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

**[0054]** Термин «легкая цепь», употребляемый в отношении антитела, относится к полипептидной цепи массой около 25 кДа, в которой амино-концевая часть содержит переменную область от около 100 до 110 или более аминокислот, а карбокси-концевая часть содержит константную область. Приблизительная длина легкой цепи составляет от 211 до 217 аминокислот. Существуют два разных типа, называемых каппа ( $\kappa$ ) или лямбда ( $\lambda$ ) на основании аминокислотной последовательности их константных доменов.

**[0055]** Используемые в данном документе термины «гипервариабельная область», «HVR», «определяющая комплементарность область» и «CDR» используются взаимозаменяемо. «CDR» относится к одной из трех гипервариабельных областей (H1, H2 или H3) в пределах некаркасной области  $\beta$ -складчатой каркаса VH иммуноглобулина (Ig или антитела) или одной из трех гипервариабельных областей (L1, L2 или L3) в пределах некаркасной области  $\beta$ -складчатого каркаса VL антитела. Соответственно, CDR представляют собой последовательности переменной области, перемежающиеся последовательностями каркасной области.

**[0056]** Области CDR хорошо известны специалистам в данной области техники и определены с помощью хорошо известных систем нумерации. Например, определяющие комплементарность области по Kabat (CDR) основаны на переменной последовательности и являются наиболее применимыми (см., например, Kabat *et al.*, *выше*). Нумерация по Chothia, напротив, относится к расположению структурных петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-17 (1987)). Конец петли CDR-H1 по Chothia при нумерации согласно системе нумерации по Kabat варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что в схеме нумерации по Kabat в H35A и H35B размещаются вставки; если ни 35A ни 35B не присутствуют, петля заканчивается в 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается в 33; если присутствуют оба 35A и 35B, петля заканчивается в 34). Гипервариабельные области AbM представляет компромиссный вариант между CDR по Kabat и структурными петлями по Chothia и используются в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM (см., например, *Antibody Engineering* Vol. 2 (Kontermann and Dübel eds., 2d ed. 2010)). «Контактные» гипервариабельные области основаны на анализе доступных комплексных

кристаллических структур. Была также разработана и стала широко применяться универсальная система нумерации ImMunoGeneTics (IMGT) Information System<sup>®</sup> (Lafranc *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* 27(1):55-77 (2003)). IMGT представляет собой интегрированную информационную систему, специализирующуюся на иммуноглобулинах (IG), Т-клеточных рецепторах (ТКР) и главном комплексе гистосовместимости (ГКГС) человека и других позвоночных. В данном документе CDR указаны в терминах как аминокислотной последовательности, так и расположения в легкой или тяжелой цепи. Так как «расположение» CDR в структуре варибельного домена иммуноглобулина является консервативным среди разных видов и представлено в структурах, называемых петлями, с помощью систем нумерации, которые выравнивают последовательности варибельного домена в соответствии со структурными характеристиками, остатки CDR и каркасной области легко определимы. Эту информацию можно использовать при прививании и замещении остатков CDR из иммуноглобулинов одного вида в акцепторную каркасную область из, как правило, человеческого антитела. Дополнительная система нумерации (АНон) была разработана Honegger and Plückthun, *J. Mol. Biol.* 309: 657-70 (2001). Соответствие между системами нумерации, включая, например, нумерацию Kabat и уникальную систему нумерации IMGT, хорошо известно специалисту в данной области техники (*см., например, Kabat, выше; Chothia and Lesk, выше; Martin, выше; Lefranc et al., выше*). Примеры остатков из каждой из этих гиперварибельных областей или CDR приведены в таблице 6 ниже.

**Таблица 6. Иллюстративные CDR в соответствии с различными системами нумерации**

Петля	Kabat	AbM	Chothia	Contact	IMGT
CDR L1	L24--L34	L24--L34	L26--L32 или L24--L34	L30--L36	L27--L38
CDR L2	L50--L56	L50--L56	L50--L52 или L50--L56	L46--L55	L56--L65
CDR L3	L89--L97	L89--L97	L91--L96 или L89--L97	L89--L96	L105-L117
CDR H1	H31--H35B (Нумерация Kabat)	H26--H35B	H26--H32..34	H30-- H35B	H27--H38
CDR H1	H31--H35 (Нумерация	H26--H35	H26--H32	H30--H35	

Петля	Kabat	AbM	Chothia	Contact	IMGT
	Chothia)				
CDR H2	H50--H65	H50--H58	H53--H55 или H52--H56	H47--H58	H56--H65
CDR H3	H95--H102	H95--H102	H96--H101 или H95--H102	H93--H101	H105-H117

**[0057]** Границы заданных CDR могут варьироваться в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Таким образом, если не указано иное, термины «CDR» и «определяющая комплементарность область» данного антитела или его области, такие как переменная область, а также отдельные CDR (например, CDR-H1, CDR-H2) следует понимать, что антитело или его область охватывают определяющую комплементарность область, как определено любой из известных схем, описанных в данном документе выше. В некоторых случаях указана схема идентификации конкретной CDR или CDR, например, CDR, как определено методом IMGT, Kabat, Chothia или Contact. В других случаях приводится конкретная аминокислотная последовательность CDR. Следует отметить, что области CDR также могут быть определены комбинацией различных систем нумерации, например, комбинацией систем нумерации Kabat и Chothia или комбинацией систем нумерации Kabat и IMGT. Таким образом, такой термин, как «CDR, указанная в конкретном VH или VHH», включает любую CDR1, как определено иллюстративными системами нумерации CDR, описанными выше, но не ограничивается ими. После определения переменной области (например, VHH, VH или VL) специалистам в данной области техники будет понятно, что CDR внутри области могут быть определены с помощью различных систем нумерации или их комбинаций.

**[0058]** Гипервариабельные области могут включать «расширенные гипервариабельные области», а именно: 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2) и 89-97 или 89-96 (L3) в VL, и 26-35 или 26-35A (H1), 50-65 или 49-65 (H2) и 93-102, 94-102, или 95-102 (H3) в VH .

**[0059]** Термины «константная область» или «константный домен» относятся к карбокси-концевой части легкой и тяжелой цепи, которая непосредственно не принимает участие в связывании антитела с антигеном, но проявляет различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Этот термин относится к части молекулы иммуноглобулина, имеющей более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с другой частью иммуноглобулина, переменной областью, которая содержит антигенсвязывающий сайт. Константная область может содержать области CH1, CH2 и CH3 тяжелой цепи и область CL легкой цепи.

[0060] Термин «каркасная область» или «FR» относится к остаткам варибельной области, которые фланкируют CDR. Остатки FR присутствуют, например, в химерных, гуманизированных, человеческих доменных антителах (например, однодоменных антителах), диателах, линейных антителах и биспецифических антителах. Остатки FR представляют собой остатки варибельного домена, отличные от остатков гиперварибельной области или остатков CDR.

[0061] В данном документе термин «область Fc» употребляется для определения С-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая, например, области Fc нативной последовательности, рекомбинантные области Fc и варианты области Fc. Хотя границы области Fc тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, область Fc тяжелой цепи человеческого IgG часто определяют как участок от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до его карбокси-конца. С-концевой лизин (остаток 447 в соответствии с системой нумерации EU) области Fc может быть удален, например, во время получения или очистки антитела, или путем рекомбинантного конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, композиция интактных антител может содержать популяции антител, в которых удалены все остатки K447, популяции антител, в которых не удалены остатки K447, и популяции антител, содержащие смесь из антител с остатком K447 и без него. «Функциональная область Fc» обладает «эффекторной функцией» области Fc с нативной последовательностью. Иллюстративные «эффекторные функции» включают связывание C1q; КЗЦ; связывание Fc-рецептора; АЗКЦ; фагоцитоз; снижение экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора); *т.д.* Такие эффекторные функции обычно требуют объединения области Fc со связывающей областью или связывающим доменом (например, варибельной областью или доменом антитела) и могут быть оценены с использованием различных анализов, известных специалистам в данной области техники. «Вариантная область Fc» содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от нативной последовательности области Fc за счет по меньшей мере одной аминокислотной модификации (например, замены, добавления или делеции). В определенных вариантах осуществления вариантная область Fc содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с нативной последовательностью области Fc или с областью Fc исходного полипептида, например, от около одной до около десяти аминокислотных замен или от около одной до около пяти аминокислотных замен в нативной последовательности области Fc или в области Fc исходного полипептида. В данном документе вариантная область Fc может иметь по меньшей мере около 80% гомологии с нативной последовательностью области Fc и/или с областью Fc родительского полипептида, или по

меньшей мере около 90% гомологии с ними, например, по меньшей мере около 95% гомологии с ними.

**[0062]** В контексте данного документа термин «эпитоп» представляет собой термин в данной области техники и относится к локализованной области антигена, с которой связывающая молекула (например, антитело, содержащее последовательность однодоменного антитела) может специфически связываться. Эпитоп может быть линейным эпитопом или конформационным, нелинейным или прерывистым эпитопом. В случае полипептидного антигена, например, эпитоп может представлять собой смежные аминокислоты полипептида («линейный» эпитоп) или эпитоп может включать аминокислоты из двух или более несмежных областей полипептида («конформационный», «нелинейный» или «прерывистый» эпитоп). Специалисту в данной области будет понятно, что, как правило, линейный эпитоп может зависеть или не зависеть от вторичной, третичной или четвертичной структуры. Например, в некоторых вариантах осуществления связывающая молекула связывается с группой аминокислот независимо от того, уложены ли они в естественную трехмерную белковую структуру. В других вариантах осуществления связывающей молекуле необходимо, чтобы аминокислотные остатки, составляющие эпитоп, имели определенную конформацию (*например*, изгиб, скручивание, поворот или складывание) для распознавания и связывания эпитопа.

**[0063]** «Блокирующее» антитело или «антагонистическое» антитело представляет собой антитело, которое ингибирует или снижает биологическую активность антигена, который оно связывает. В некоторых вариантах осуществления блокирующие антитела или антагонистические антитела по существу или полностью ингибируют биологическую активность антигена.

**[0064]** «Агонистическое» или активирующее антитело представляет собой антитело, которое усиливает или инициирует сигналинг антигеном, с которым оно связывается. В некоторых вариантах осуществления агонистические антитела вызывают или активируют сигналинг без присутствия природного лиганда.

**[0065]** Термины «процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» и «гомология» в отношении последовательности пептида, полипептида или антитела определяется как процент аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной пептидной или полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если это необходимо, для обеспечения наибольшего процента идентичности последовательности и без учета каких-либо консервативных замен в качестве части идентичной последовательности. Выравнивание в целях определения процента

идентичности аминокислотных последовательностей может быть выполнено различными способами, известными специалисту в данной области техники, например, с помощью общедоступного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGALIGN™ (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для обеспечения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

**[0066]** Термин «специфичность» относится к селективному распознаванию антигенсвязывающего белка (такого как CAR или sdAb) для конкретного эпитопа антигена. Природные антитела, например, являются моноспецифическими. В контексте данного документа термин «полиспецифический», означает, что антигенсвязывающий белок (такой как CAR или sdAb) имеет два или более антигенсвязывающих сайта, из которых по меньшей мере два связывают разные антигены. В контексте данного документа термин «биспецифический» означает, что антигенсвязывающий белок (такой как aCAR или sdAb) имеет две разные антигенсвязывающие специфичности. В контексте данного документа термин «моноспецифические» CAR означает антигенсвязывающий белок (такой как CAR или sdAb), который имеет один или более сайтов связывания, каждый из которых связывает один и тот же антиген.

**[0067]** В контексте данного документа термин «валентный» означает наличие определенного количества сайтов связывания в антигенсвязывающем белке (таком как CAR или sdAb). Например, природное антитело или полноразмерное антитело имеет два сайта связывания и является двухвалентным. Таким образом, термины «трехвалентный», «четыревалентный», «пятивалентный» и «шестивалентный» обозначают наличие двух сайтов связывания, трех сайтов связывания, четырех сайтов связывания, пяти сайтов связывания и шести сайтов связывания, соответственно, в антигенсвязывающем белке (например, CAR или sdAb).

**[0068]** В контексте данного документа «химерный антигенный рецептор» или «CAR» относится к генетически сконструированным рецепторам, которые можно использовать для прививания одной или более антигенных специфичностей иммунным эффекторным клеткам, таким как Т-клетки. Некоторые CAR также известны как «искусственные Т-клеточные рецепторы», «химерные Т-клеточные рецепторы» или «химерные иммунные рецепторы». В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, специфичный для одного или более антигенов (таких как опухолевые антигены), трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен Т-клетки и/или других рецепторов. «CAR-Т-клетка» относится к Т-клетке, которая

экспрессирует CAR.

**[0069]** Термины «полипептид», и «пептид», и «белок» взаимозаменяемо используются в данном документе и относятся к полимерам аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может быть разделен не аминокислотами. Кроме того, указанные термины включают аминокислотный полимер, который был модифицирован природным путем или путем вмешательства; например, образованием дисульфидных связей, гликозилированием, липидацией, ацетилированием, фосфорилированием или любыми другими манипуляциями или модификациями. Также в определение включены, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты, включая, помимо прочего, неприродные аминокислоты, а также другие модификации, известные в данной области техники. Понятно, что, поскольку полипептиды по данному описанию могут быть основаны на антителах или других членах суперсемейства иммуноглобулинов, в некоторых вариантах осуществления «полипептид» может встречаться в виде одной цепи или в виде двух или более связанных цепей.

**[0070]** Взаимозаменяемо употребляемые в данном документе термины «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота» относятся к полимерам нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть включен в полимер ДНК- или РНК-полимеразой или с помощью синтетической реакции. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. В контексте данного документа «олигонуклеотид» относится к коротким, в общем случае одноцепочечным, синтетическим полинуклеотидам, которые в общем случае, но не обязательно, имеют длину менее чем около 200 нуклеотидов. Термины «олигонуклеотид» и «полинуклеотид» не являются взаимоисключающими. Вышеприведенное описание для полинуклеотидов в равной и полной степени применимо для олигонуклеотидов. Клетка, которая продуцирует связывающую молекулу по настоящему изобретению, может включать исходную гибридную клетку, а также бактериальные и эукариотические клетки-хозяева, в которые были введены нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела. Если не указано иное, левый конец любой одноцепочечной полинуклеотидной последовательности, описанной в данном документе, является 5' концом; левое направление двухцепочечных полинуклеотидных последовательностей называется 5' направлением. Направление 5'–3' добавления растущих транскриптов РНК называется направлением транскрипции; области последовательности в цепи ДНК, имеющие такую же последовательность, как и РНК-

транскрипт, которые расположены 5' относительно 5' конца РНК-транскрипта, называются «вышележащими последовательностями»; области последовательности в цепи ДНК, имеющие такую же последовательность, как и РНК-транскрипт, которые расположены 3' относительно 3' конца РНК-транскрипта, называются «нижележащими последовательностями».

**[0071]** «Выделенная нуклеиновая кислота» представляет собой нуклеиновую кислоту, например, РНК, ДНК или смешанные нуклеиновые кислоты, которая в значительной степени отделена от других последовательностей геномной ДНК, а также белков или комплексов, таких как рибосомы и полимеразы, которые в естественном состоянии сопутствуют нативной последовательности. «Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу, которая отделена от других молекул нуклеиновых кислот, которые присутствуют в естественном источнике молекулы нуклеиновой кислоты. Кроме того, «выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК, может по существу не содержать другой клеточный материал или культуральную среду в случае получения рекомбинантными методами, или по существу не содержать химические предшественники или другие химические вещества в случае химического синтеза. В конкретном варианте осуществления выделяют или очищают одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих однодоменное антитело или антитело, как описано в данном документе. Этот термин включает последовательности нуклеиновых кислот, которые были удалены из своего природного окружения, и включает изоляты рекомбинантной или клонированной ДНК и химически синтезированные аналоги или же аналоги, синтезированные биологически гетерологичными системами. По существу очищенная молекула может включать выделенные формы молекулы. В частности, «выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR или sdAb, описанные в данном документе, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена по меньшей мере от одной загрязняющей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в среде, в которой она была получена.

**[0072]** Термин «регуляторные последовательности» относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Регуляторные последовательности, которые подходят для прокариот, например, включают промотор, необязательно операторную последовательность и сайт связывания рибосом. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

**[0073]** В контексте данного документа термин «функционально связанный» и аналогичные

фразы (например, генетически слитые), когда они используются в отношении нуклеиновых кислот или аминокислот, относятся к функциональной связи последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей, соответственно, находящихся в функциональных отношениях друг с другом. Например, функционально связанные промотор, энхансерные элементы, открытая рамка считывания, 5'- и 3'-UTR и терминаторные последовательности приводят к точному получению молекулы нуклеиновой кислоты (например, РНК). В некоторых вариантах осуществления функционально связанные элементы нуклеиновой кислоты приводят к транскрипции открытой рамки считывания и, в конечном счете, к продукции полипептида (т.е. к экспрессии открытой рамки считывания). В качестве еще одного примера, функционально связанный пептид представляет собой пептид, в котором функциональные домены расположены на соответствующем расстоянии друг от друга, чтобы обеспечить предполагаемую функцию каждого домена.

**[0074]** Термин «вектор» относится к субстанции, которая используется для переноса или включения последовательности нуклеиновой кислоты, включая, например, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую связывающую молекулу (например, антитело), как описано в данном документе, для введения нуклеиновой кислоты последовательность в клетку-хозяина. Векторы, применимые для использования, включают, например, векторы экспрессии, плазмиды, фаговые векторы, вирусные векторы, эписомы и искусственные хромосомы, которые могут содержать селективные последовательности или маркеры, функциональные для стабильной интеграции в хромосому клетки-хозяина. Кроме того, векторы могут содержать один или более генов селективных маркеров и соответствующие последовательности регуляции экспрессии. Гены селективных маркеров, которые могут быть включены, например, обеспечивают устойчивость к антибиотикам или токсинам, восполняют ауксотрофный дефицит или обеспечивают важные питательные вещества, отсутствующие в культуральной среде. Последовательности регуляции экспрессии могут включать конститутивные и индуцибельные промоторы, энхансеры транскрипции, терминаторы транскрипции и т.п., которые хорошо известны в данной области техники. Когда две или более молекулы нуклеиновой кислоты должны совместно экспрессироваться (*например*, тяжелая и легкая цепь антитела или VH и VL антитела), обе молекулы нуклеиновой кислоты могут быть вставлены, например, в один вектор экспрессии или в отдельные векторы экспрессии. В случае экспрессии из одного вектора, кодирующие нуклеиновые кислоты могут быть функционально связаны с одной общей последовательностью регуляции экспрессии или связаны с разными последовательностями регуляции экспрессии, таким как один

индуцибельный промотор и один конститутивный промотор. Введение молекул нуклеиновых кислот в клетку-хозяина можно осуществлять, используя способы, хорошо известные в данной области техники. Такие способы включают, например, анализ нуклеиновых кислот, такой как нозерн-блоттинг или амплификация мРНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), иммуноблоттинг для экспрессии генных продуктов или другие подходящие аналитические методы для исследования экспрессии внесенной последовательности нуклеиновой кислоты или ее соответствующего генного продукта. Специалистам в данной области техники понятно, что молекулы нуклеиновых кислот экспрессируют в достаточном количестве для получения необходимого продукта, и дополнительно понятно, что уровни экспрессии можно оптимизировать для получения достаточной экспрессии, используя способы, хорошо известные в данной области техники.

**[0075]** В контексте данного документа термин «хозяин» относится к животному, такому как млекопитающее (например, человек).

**[0076]** В контексте данного документа термин «клетка-хозяин» относится к конкретной рассматриваемой клетке, которая может быть трансфицирована молекулой нуклеиновой кислоты, и потомству или потенциальному потомству такой клетки. Потомство такой клетки может не быть идентичным с исходной клеткой, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты вследствие мутаций или влияния окружения, которые могут возникать в последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

**[0077]** В контексте данного документа подразумевается, что термин «аутологичный» означает любой материал, полученный от того же индивида, которому впоследствии его будут вводить.

**[0078]** «Аллогенный» относится к трансплантату, полученному от другого индивида того же вида.

**[0079]** В контексте данного документа термины «трансфицированный», или «трансформированный», или «трансдуцированный» относятся к процессу, посредством которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку-хозяина. «Трансфицированная», или «трансформированная», или «трансдуцированная» клетка представляет собой клетку, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка включает первичную клетку субъекта и свое потомство.

**[0080]** В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый» означает то, что он одобрен регуляторным органом Федерального правительства или правительства штата, или приведен в Фармакопее США, Европейской фармакопее или другой

общепризнанной фармакопее для применения для животных и, в частности, для человека.

**[0081]** «Экципиент» означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, растворитель или инкапсулирующий материал. Экципиенты включают, например, инкапсулирующие материалы или добавки, такие как ускорители абсорбции, антиоксиданты, связывающие вещества, буферы, носители, покрывающие агенты, красители, разбавители, дезинтегрирующие агенты, эмульгаторы, наполнители, филлеры, ароматизаторы, увлажнители, смазывающие вещества, отдушки, консерванты, пропелленты, разделительные агенты, стерилизующие агенты, подсластители, солюбилизаторы, смачивающие агенты и их смеси. Термин «эксципиент» может также относиться к разбавителю, адьюванту (*например*, адьюванту Фрейндса (полному или неполному) или носителю.

**[0082]** В некоторых вариантах осуществления эксципиенты представляют собой фармацевтически приемлемые эксципиенты. Примеры фармацевтически приемлемых эксципиентов включают буферы, такие как фосфатный, цитратный, и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярные (*например*, менее чем около 10 аминокислотных остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONICS™. Другие примеры фармацевтически приемлемых эксципиентов описаны в Remington and Gennaro, Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed. 1990).

**[0083]** В одном варианте осуществления каждый компонент является «фармацевтически приемлемым» в том смысле, что он совместим с другими ингредиентами фармацевтического состава и подходит для применения в контакте с тканями или органами человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции, иммуногенности или других проблемы или осложнений, соответствующие разумному соотношению польза/риск. *См.*, *например*, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2005; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th ed.; Rowe et al., Eds.; The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association: 2009; Handbook of Pharmaceutical Additives, 3rd ed.; Ash and Ash Eds.; Gower Publishing Company: 2007; Pharmaceutical Preformulation and Formulation, 2nd ed.; Gibson Ed.; CRC Press LLC: Boca Raton, FL, 2009. В

некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые эксципиенты нетоксичны для клетки или млекопитающего, подвергающихся их воздействию, в используемых дозировках и концентрациях. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый эксципиент представляет собой водный раствор с рН-буфером.

**[0084]** В некоторых вариантах осуществления эксципиенты представляют собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода является типичным эксципиентом, когда композицию (например, фармацевтическую композицию) вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких эксципиентов, особенно для растворов для инъекций. Эксципиент также может включать крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол, и т. п. Композиция, при необходимости, может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульсифицирующих агентов или рН-забуференных агентов. Композиции могут находиться в форме растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т. п. Композиции для перорального применения могут содержать стандартные эксципиенты, такие как маннит, лактозу, крахмал, стеарат магния, натрий сахарин, целлюлозу, карбонат магния и *т. п.* фармацевтической степени чистоты.

**[0085]** Композиции, включая фармацевтические соединения, могут содержать связывающую молекулу (например, антитело), например, в выделенной или очищенной форме вместе с подходящим количеством эксципиентов.

**[0086]** В контексте данного документа термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству однодоменного антитела или терапевтической молекулы, содержащей агент и однодоменное антитело, или фармацевтической композиции, которые представлены в данном документе, которое является достаточным для получения желаемого результата.

**[0087]** Термины «субъект» и «пациент» могут употребляться взаимозаменяемо. Как используется в данном документе, в некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, такое как отличное от примата млекопитающее или примат (например, человек). В конкретных вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В одном варианте осуществления субъект представляет собой

млекопитающее, например, человека, у которого диагностировано заболевание или нарушение. В еще одном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, например, человека, с риском развития заболевания или нарушения.

**[0088]** Термины «вводить» или «введение» относятся к действию, состоящему в инъекции или ином варианте физической доставки вещества в том виде, в котором оно существует за пределами организма, в организм пациента, например, путем мукозальной, интрадермальной, внутривенной, внутримышечной доставки, и/или любому другому способу физической доставки, описанному в данном документе или известному в данной области техники.

**[0089]** Используемые в данном документе термины «лечить», «лечение» и «процесс лечения» относятся к уменьшению или облегчению прогрессирования, тяжести и/или продолжительности заболевания или состояния в результате применения одного или более видов терапии. Лечение можно определить, оценив, произошло ли уменьшение, облегчение и/или ослабление одного или более симптомов, связанных с основным заболеванием, так что у пациента наблюдается улучшение состояния, несмотря на то, что пациент все еще может страдать от основного заболевания. Термин «лечение» включает как сдерживание, так и облегчение заболевания. Термины «контролировать» и «контроль» относятся к благоприятным эффектам, которые субъект получает от терапии, которая не обязательно приводит к излечению заболевания.

**[0090]** Термины «предотвращать», «предотвращение» и «профилактика» относятся к снижению вероятности возникновения (или рецидива) заболевания, нарушения, патологического состояния или ассоциированного симптома(-ов) (например, диабета или злокачественного новообразования).

**[0091]** В контексте данного документа термин «задержка» развития злокачественного новообразования означает отсрочку, препятствование, замедление, задержку, стабилизацию и/или отсрочку развития заболевания. Эта задержка может быть различной продолжительности в зависимости от истории болезни и/или индивида, который подлежит лечению. Как очевидно для специалиста в данной области техники, достаточная или значительная задержка может, по сути, включать предотвращение, поскольку у индивида не развивается заболевание. Способ, который «задерживает» развитие злокачественного новообразования, представляет собой способ, который снижает вероятность развития заболевания в заданные временные рамки и/или уменьшает степень заболевания в заданные временные рамки по сравнению с неиспользованием этого способа. Такие сравнения, как правило, основаны на клинических исследованиях с участием статистически значимого числа индивидов. Развитие злокачественного новообразования можно обнаружить с

помощью стандартных методов, включая, помимо прочего, компьютерную аксиальную томографию (CAT Scan), магнитно-резонансную томографию (МРТ), УЗИ брюшной полости, тесты на свертываемость крови, ангиографию или биопсию. Развитие может также относиться к прогрессированию злокачественного новообразования, которое может быть изначально необнаружимым, и включает возникновение, рецидивирование, и манифестацию заболевания.

**[0092]** В контексте данного документа «ассоциированное с GUCY2C заболевание или нарушение» относится к заболеванию или нарушению, которое включает клетку или ткань, в которых экспрессируется GUCY2C. В некоторых вариантах осуществления ассоциированное с GUCY2C заболевание или нарушение включает клетку, на которой GUCY2C экспрессируется аномально. В других вариантах осуществления ассоциированное с GUCY2C заболевание или нарушение включает клетку, в которой или на которой имеется дефицит GUCY2C.

**[0093]** Термины «около» и «приблизительно» означают в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10%, в пределах 9%, в пределах 8%, в пределах 7%, в пределах 6%, в пределах 5%, в пределах 4%, в пределах 3%, в пределах 2%, в пределах 1% или менее заданного значения или диапазона.

**[0094]** Как используется в настоящем описании и формуле изобретения, формы единственного числа включают формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное.

**[0095]** Следует понимать, что в тех случаях, когда варианты осуществления описаны в данном документе термином «содержащий», в противном случае аналогичные варианты осуществления, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий в основном из», также представлены. Следует понимать, что во всех случаях, когда варианты осуществления описаны в данном документе с формулировкой «состоящий преимущественно из», также предложены иные аналогичные варианты осуществления, описанные в терминах «состоящий из».

**[0096]** Термин «между», используемый в такой фразе, как «между А и В» или «между А-В», относится к диапазону, включающему как А, так и В.

**[0097]** Подразумевается, что термин «и/или», используемый в данном документе в таком выражении, как «А и/или В», включает как А, так и В; А или В; А (отдельно) и В (отдельно). Аналогично, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих вариантов осуществления: А, В, и С; А, В, или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (только); В (только); и С (только).

## **5.2. Однодоменные антитела**

### 5.2.1. Однодоменные антитела, которые связываются с GUCY2C

**[0098]** В одном аспекте в данном документе предложены однодоменные антитела (например, домены VHH), способные связываться с GUCY2C.

**[0099]** В некоторых вариантах осуществления однодоменные антитела (например, домены VHH), предложенные в данном документе, связываются с GUCY2C человека. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе однодоменное антитело к GUCY2C модулирует одну или более активностей GUCY2C. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C, предложенное в данном документе, представляет собой антагонистическое антитело.

**[00100]** В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C, представленное в данном документе, связывается с GUCY2C (например, GUCY2C человека) с константой диссоциации ( $K_D$ )  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 1$  нМ,  $\leq 0,1$  нМ,  $\leq 0,01$  нМ или  $\leq 0,001$  нМ (например,  $10^{-8}$  М или меньше, например, от  $10^{-8}$  М до  $10^{-13}$  М, например, от  $10^{-9}$  М до  $10^{-13}$  М). В данной области техники известны различные способы измерения аффинности связывания, любой из которых можно использовать для целей настоящего изобретения, включая, например, РИА, выполняемый с Fab-версией представляющего интерес антитела и его антигена (Chen et al., 1999, J. Mol Biol 293:865-81); с помощью биослойной интерферометрии (BLI) или анализа методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с помощью Octet®, используя, например, систему Octet®Red96, или Biacore®, используя, например, Biacore®TM-2000 или Biacore®TM-3000. «Скорость ассоциации» или «kon» также можно определить с помощью тех же методов биослойной интерферометрии (BLI) или поверхностного плазмонного резонанса (SPR), описанных выше, с использованием, например, Octet®Red96, Biacore®TM-2000 или Biacore®TM-3000.

**[00101]** В некоторых вариантах осуществления однодоменные антитела к GUCY2C, представленные в данном документе, представляют собой домены VHH. Иллюстративные домены VHH, представленные в данном документе, получают как описано ниже в разделе 6 и эти домены VHH обозначаются как C8, C12, C13, C15, C21, C27, C30 и C31, что также показано в таблице 7 ниже.

**[00102]** Таким образом, в некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело по настоящему изобретению содержит одну или более последовательностей CDR любого из C8, C12, C13, C15, C21, C27, C30 и/или C31. В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлено однодоменное антитело, которое связывается с GUCY2C, содержащее следующую структуру: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, где последовательности CDR выбраны из последовательностей C8, C12, C13, C15, C21, C27,

C30 и/или C31.

**[00103]** В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе sdAb к GUCY2C содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность  $X_1YGMX_2$ , где  $X_1$  представляет собой A, I или V, а  $X_2$  представляет собой D или G (SEQ ID NO: 64). В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе sdAb к GUCY2C содержит CDR2, включающую аминокислотную последовательность  $X_3IX_4LSGRX_5X_6YX_7DAVX_8G$ , где  $X_3$  представляет собой A, S или T;  $X_4$  представляет собой F, W или Y;  $X_5$  представляет собой S или T;  $X_6$  представляет собой E, N или T;  $X_7$  представляет собой A, S или T; и  $X_8$  представляет собой K или Q (SEQ ID NO: 65). В других вариантах осуществления предложенное в данном документе sdAb к GUCY2C содержит CDR3, включающую аминокислотную последовательность  $GX_9X_{10}TAX_{11}SX_{12}RQY$ , где  $X_9$  представляет собой A, E или P;  $X_{10}$  представляет собой P или T;  $X_{11}$  представляет собой S или T; и  $X_{12}$  представляет собой G или V (SEQ ID NO: 66).

**[00104]** В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе sdAb к GUCY2C содержит CDR1, включающую аминокислотную последовательность  $X_1YGMX_2$ , где  $X_1$  представляет собой A, I или V, а  $X_2$  представляет собой D или G (SEQ ID NO: 64); CDR2, включающую аминокислотную последовательность  $X_3IX_4LSGRX_5X_6YX_7DAVX_8G$ , где  $X_3$  представляет собой A, S или T;  $X_4$  представляет собой F, W или Y;  $X_5$  представляет собой S или T;  $X_6$  представляет собой E, N или T;  $X_7$  представляет собой A, S или T; и  $X_8$  представляет собой K или Q (SEQ ID NO: 65); и CDR3, включающую аминокислотную последовательность  $GX_9X_{10}TAX_{11}SX_{12}RQY$ , где  $X_9$  представляет собой A, E или P;  $X_{10}$  представляет собой P или T;  $X_{11}$  представляет собой S или T; и  $X_{12}$  представляет собой G или V (SEQ ID NO: 66).

**Таблица 7. Иллюстративные однодоменные антитела**

ID клона	Домен VHH (AK)	CDR1	CDR2	CDR3
C8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 35
C12	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 36
C13	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 37
C15	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 38
C21	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 39
C27	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 40
C30	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 41
C31	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 42

**[00105]** В некоторых вариантах осуществления предложено однодоменное антитело к GUCY2C, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления предложено однодоменное антитело к GUCY2C, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления предложено однодоменное антитело к GUCY2C, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления предложено однодоменное антитело к GUCY2C, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления предложено однодоменное антитело к GUCY2C, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления предложено однодоменное антитело к GUCY2C, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления предложено однодоменное антитело к GUCY2C, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления предложено однодоменное антитело к GUCY2C, содержащее одну, две или все три CDR аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00106]** В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, имеющую аминокислотную последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2, имеющую аминокислотную последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 3. В других вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR3, имеющую аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR2, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR2, указанные в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, CDR2 и

CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 3. Последовательности CDR можно определить в соответствии с хорошо известными системами нумерации. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Kabat. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации AbM. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Contact. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00107]** В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, имеющую аминокислотную последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2, имеющую аминокислотную последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 4. В других вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR3, имеющую аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR2, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR2, указанные в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 4. Последовательности CDR могут быть определены в соответствии с хорошо известными системами нумерации. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Kabat. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации AbM. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Contact. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное

антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00108]** В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, имеющую аминокислотную последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2, имеющую аминокислотную последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 5. В других вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR3, имеющую аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR2, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR2, указанные в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 5. Последовательности CDR могут быть определены в соответствии с хорошо известными системами нумерации. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Kabat. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации AbM. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Contact. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00109]** В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, имеющую аминокислотную последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2, имеющую аминокислотную последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 6. В других вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR3, имеющую

аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR2, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR2, указанные в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 6. Последовательности CDR могут быть определены в соответствии с хорошо известными системами нумерации. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Kabat. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации AbM. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Contact. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00110]** В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, имеющую аминокислотную последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2, имеющую аминокислотную последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 7. В других вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR3, имеющую аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR2, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR2, указанные в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в

SEQ ID NO: 7. Последовательности CDR могут быть определены в соответствии с хорошо известными системами нумерации. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Kabat. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации AbM. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Contact. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00111]** В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, имеющую аминокислотную последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2, имеющую аминокислотную последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 8. В других вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR3, имеющую аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR2, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR2, указанные в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 8. Последовательности CDR могут быть определены в соответствии с хорошо известными системами нумерации. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Kabat. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации AbM. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Contact. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления

однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00112]** В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, имеющую аминокислотную последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2, имеющую аминокислотную последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 9. В других вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR3, имеющую аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR2, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR2, указанные в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 9. Последовательности CDR могут быть определены в соответствии с хорошо известными системами нумерации. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Kabat. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации AbM. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Contact. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00113]** В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, имеющую аминокислотную последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2, имеющую аминокислотную последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 10. В других вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR3, имеющую аминокислотную последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 10 (например, SEQ

ID NO: 3 или 6). В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR2, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR2, указанные в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело имеет CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, указанные в SEQ ID NO: 10. Последовательности CDR могут быть определены в соответствии с хорошо известными системами нумерации. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Kabat. В некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации AbM. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Chothia. В других вариантах осуществления CDR соответствуют нумерации Contact. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00114]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено однодоменное антитело, которое связывается с GUCY2C, имеющее следующую структуру: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, где (i) CDR1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, или SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26; (ii) CDR2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, или SEQ ID NO: 34; и/или (iii) CDR3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, или SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00115]** В других вариантах осуществления в данном документе предложено однодоменное антитело, которое связывается с GUCY2C, имеющее следующую структуру: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, где (i) CDR1 включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, или SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26; (ii) CDR2 включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, или SEQ ID NO: 34; и/или (iii) CDR3 включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, или SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00116]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено однодоменное антитело к GUCY2C (sdAb), содержащее CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00117]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено однодоменное антитело к GUCY2C (sdAb), содержащее CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах

осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00118]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено однодоменное антитело к GUCY2C (sdAb), содержащее CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00119]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено однодоменное антитело к GUCY2C (sdAb), содержащее CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00120]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено однодоменное антитело к GUCY2C (sdAb), содержащее CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00121]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено однодоменное антитело к GUCY2C (sdAb), содержащее CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00122]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено однодоменное антитело к GUCY2C (sdAb), содержащее CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00123]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено однодоменное антитело к GUCY2C (sdAb), содержащее CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является антителом верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C является гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C содержит человеческую акцепторную каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека или человеческую консенсусную каркасную область.

**[00124]** В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело дополнительно содержит одну или более каркасных областей C8, C12, C13, C15, C21, C27, C30 и/или C31. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело содержит одну или более каркасных областей, полученных из домена VHH, включающего последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело содержит одну

или более каркасных областей, полученных из домена VHH, включающего последовательность SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело содержит одну или более каркасных областей, полученных из домена VHH, включающего последовательность SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело содержит одну или более каркасных областей, полученных из домена VHH, включающего последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело содержит одну или более каркасных областей, полученных из домена VHH, включающего последовательность SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело содержит одну или более каркасных областей, полученных из домена VHH, включающего последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело содержит одну или более каркасных областей, полученных из домена VHH, включающего последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело содержит одну или более каркасных областей, полученных из домена VHH, включающего последовательность SEQ ID NO: 10.

**[00125]** В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе однодоменное антитело представляет собой гуманизованное однодоменное антитело.

**[00126]** Каркасные области, описанные в данном документе, определяются на основе границ по системе нумерации CDR. Другими словами, если CDR определяют, например, по Kabat, IMGT или Chothia, то каркасные области представляют собой аминокислотные остатки, окружающие CDR в вариабельной области в формате от N-конца к С-концу: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Например, FR1 определяется как аминокислотные остатки, N-концевые по отношению к аминокислотным остаткам CDR1, как определено, например, по системе нумерации Kabat, системе нумерации IMGT или системе нумерации Chothia, FR2 определяется как аминокислотные остатки между аминокислотными остатками CDR1 и CDR2, как определено, например, по системе нумерации Kabat, системе нумерации IMGT или системе нумерации Chothia, FR3 определяется как аминокислотные остатки между аминокислотными остатками CDR2 и CDR3, как определено, например, по системе нумерации Kabat, системе нумерации IMGT или системе нумерации Chothia, и FR4 определяется как аминокислотные остатки на С-конце аминокислотных остатков CDR3, как определено, например, по системе нумерации Kabat, системе нумерации IMGT или системе нумерации Chothia.

**[00127]** В некоторых вариантах осуществления предложено выделенное однодоменное антитело к GUCY2C, содержащее домен VHH, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления предложен

полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

**[00128]** В некоторых вариантах осуществления предложено выделенное однодоменное антитело к GUCY2C, содержащее домен VHH, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

**[00129]** В некоторых вариантах осуществления предложено выделенное однодоменное антитело к GUCY2C, содержащее домен VHH, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5.

**[00130]** В некоторых вариантах осуществления предложено выделенное однодоменное антитело к GUCY2C, содержащее домен VHH, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

**[00131]** В некоторых вариантах осуществления предложено выделенное однодоменное антитело к GUCY2C, содержащее домен VHH, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

**[00132]** В некоторых вариантах осуществления предложено выделенное однодоменное антитело к GUCY2C, содержащее домен VHH, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

**[00133]** В некоторых вариантах осуществления предложено выделенное однодоменное антитело к GUCY2C, содержащее домен VHH, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

**[00134]** В некоторых вариантах осуществления предложено выделенное однодоменное антитело к GUCY2C, содержащее домен VHH, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления предложен полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

**[00135]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено антитело к GUCY2C или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с GUCY2C, конкурируя с любым из однодоменных антител к GUCY2C, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления конкурентное связывание можно определить с помощью анализа на основе ИФА. Например, в некоторых вариантах осуществления предложено антитело, которое специфически связывается с GUCY2C,

конкурируя с однодоменным антителом к GUCY2C, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело, которое специфически связывается с GUCY2C, конкурируя с однодоменным антителом к GUCY2C, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело, которое специфически связывается с GUCY2C, конкурируя с однодоменным антителом к GUCY2C, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело, которое специфически связывается с GUCY2C, конкурируя с однодоменным антителом к GUCY2C, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело, которое специфически связывается с GUCY2C, конкурируя с однодоменным антителом к GUCY2C, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело, которое специфически связывается с GUCY2C, конкурируя с однодоменным антителом к GUCY2C, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело, которое специфически связывается с GUCY2C, конкурируя с однодоменным антителом к GUCY2C, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело, которое специфически связывается с GUCY2C, конкурируя с однодоменным антителом к GUCY2C, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

**[00136]** В некоторых вариантах осуществления функциональные эпитопы могут быть картированы, например, с помощью комбинаторного аланинового сканирования, для идентификации аминокислот в белке GUCY2C, которые необходимы для взаимодействия с однодоменными антителами к GUCY2C, предложенными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления для идентификации эпитопов можно использовать конформационную и кристаллическую структуру однодоменного антитела к GUCY2C, связанного с GUCY2C. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлено антитело, которое специфически связывается с тем же эпитопом, что и любое из предложенных в данном документе однодоменных антител к GUCY2C. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и однодоменное антитело к GUCY2C, включающее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и однодоменное антитело к GUCY2C, включающее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и

однодоменное антитело к GUCY2C, включающее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и однодоменное антитело к GUCY2C, включающее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и однодоменное антитело к GUCY2C, включающее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и однодоменное антитело к GUCY2C, включающее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и однодоменное антитело к GUCY2C, включающее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и однодоменное антитело к GUCY2C, включающее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

**[00137]** В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотные последовательности с определенным процентом идентичности относительно любого из антител C8, C12, C13, C15, C21, C27, C30 и C31.

**[00138]** Определение процента идентичности между двумя последовательностями (например, аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот) может быть выполнено с использованием математического алгоритма. Неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264 2268 (1990), модифицированный как в Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873 5877 (1993). Такой алгоритм заложен в программы NBLAST и XBLAST Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403 (1990). Поиск нуклеотидов BLAST можно выполнять с установленными параметрами программы нуклеотидов NBLAST, например, для score=100, wordlength=12, чтобы получить нуклеотидные последовательности, гомологичные молекулам нуклеиновой кислоты, описанным в данном документе. Поиск белка BLAST может быть выполнен с установленными параметрами программы XBLAST, например, для score=50, wordlength=3, чтобы получить аминокислотные последовательности, гомологичные белковой молекуле, описанной в данном документе. Для определения выравнивания с внесенными в целях сравнения гэпами можно использовать BLAST с гэпами, как описано в Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389 3402 (1997). В качестве альтернативы PSI BLAST можно использовать для выполнения

повторного поиска, который обнаруживает отдаленные отношения между молекулами (*Id.*). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI Blast можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см., например, Национальный центр биотехнологической информации (NCBI) во всемирной сети, [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)). Другим неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Миллера-Маерса, CABIOS 4:11-17 (1998). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью программного пакета выравнивания последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу весовых остатков RAM120, штраф за длину гэпа 12 и штраф за гэп 4. Процентная идентичность между двумя последовательностями может быть определена с использованием методов, аналогичных описанным выше, с пропусками или без них. При вычислении процентной идентичности обычно учитываются только точные совпадения.

**[00139]** В некоторых вариантах осуществления предложено однодоменное антитело к GUCY2C, содержащее домен VHH, имеющий по меньшей мере около 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 3-10. В некоторых вариантах осуществления последовательность VHH, имеющая по меньшей мере около 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности, содержит замены (например, консервативные замены), вставки или делеции по отношению к эталонной последовательности, но однодоменное антитело к GUCY2C, содержащее эту последовательность, сохраняет способность связываться с GUCY2C. В некоторых вариантах осуществления в аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3-10, были заменены, вставлены и/или удалены в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами CDR (т.е. в FR). Необязательно, однодоменное антитело к GUCY2C содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 3-10, включая посттрансляционные модификации этой последовательности.

**[00140]** В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело, описанное в данном документе, содержит домен VHH, имеющий по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%



99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, где однодоменное антитело связывается с GUCY2C.

**[00146]** В определенных вариантах осуществления описанное в данном документе однодоменное антитело содержит домен VHH, имеющий по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, где однодоменное антитело связывается с GUCY2C.

**[00147]** В определенных вариантах осуществления описанное в данном документе однодоменное антитело содержит домен VHH, имеющий по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10, где однодоменное антитело связывается с GUCY2C.

**[00148]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен связывающий GUCY2C белок, содержащий любое однодоменное антитело к GUCY2C, описанное выше. В некоторых вариантах осуществления связывающий GUCY2C белок представляет собой моноклональное антитело, включая антитело верблюдовых, химерное, гуманизованное или человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к GUCY2C представляет собой фрагмент антитела, например, фрагмент VHH. В некоторых вариантах осуществления антитело к GUCY2C представляет собой полноразмерное антитело, содержащее только тяжелые цепи, содержащее область Fc любого класса или изотипа антител, например, IgG1 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функция области Fc снижена или минимизирована. В некоторых вариантах осуществления связывающий GUCY2C белок представляет собой слитый белок, содержащий однодоменное антитело к GUCY2C, предложенное в данном документе. В других вариантах осуществления связывающий GUCY2C белок представляет собой полиспецифическое антитело, содержащее однодоменное антитело к GUCY2C, предложенное в данном документе. Другие иллюстративные связывающие GUCY2C молекулы более подробно описаны в следующих разделах.

**[00149]** В некоторых вариантах осуществления антитело к GUCY2C (такое как однодоменное антитело к GUCY2C) или антигенсвязывающий белок в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления могут включать любые признаки,

по отдельности или в комбинации, как описано в разделах с 5.2.2 по 5.2.7 ниже.

### 5.2.2. Варианты однодоменных антител

**[00150]** В дополнение к однодоменным антителам, которые связываются с GUCY2C, описанным в данном документе, предполагается, что могут быть получены варианты однодоменных антител, которые связываются с GUCY2C, описанным в данном документе. Например, варианты однодоменного антитела могут быть получены путем внесения соответствующих нуклеотидных изменений в кодирующую ДНК и/или путем синтеза желаемого антитела или полипептида. Специалисты в данной области техники понимают, что аминокислотные замены могут изменить посттрансляционные процессы для однодоменного антитела.

**[00151]** Вариации могут представлять собой замену, делецию или вставку одного или более кодонов, кодирующих однодоменное антитело или полипептид, что приводит к изменению аминокислотной последовательности по сравнению с исходным антителом или полипептидом. Сайты, представляющие интерес для замещающего мутагенеза, включают CDR и FR.

**[00152]** Аминокислотные замены могут быть результатом замены одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей сходные структурные и/или химические свойства, такого как замена лейцина серином, например, консервативные аминокислотные замены. Стандартные методы, известные специалистам в данной области, могут быть использованы для введения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу, представленную в данном документе, включая, например, сайт-направленный мутагенез и мутагенез, опосредованный ПЦР, который приводит к аминокислотным заменам. Размер вставок или делеций, необязательно, может находиться в диапазоне от около 1 до 5 аминокислот. В определенных вариантах осуществления замена, делеция или вставка включают менее 25 аминокислотных замен, менее 20 аминокислотных замен, менее 15 аминокислотных замен, менее 10 аминокислотных замен, менее 5 аминокислотных замен, менее 4 аминокислотных замен, менее 3 аминокислотных замен или менее 2 аминокислотных замен относительно исходной молекулы. В конкретном варианте осуществления замена представляет собой консервативную аминокислотную замену, произведенную в одном или более предсказанных заменимых аминокислотных остатках. Допустимые вариации можно определить путем систематического внесения аминокислотных вставок, делеций или замен в последовательности и тестирования полученных вариантов на активность, проявляемую исходными антителами.

**[00153]** Вставки аминокислотной последовательности включают амино- и/или карбоксиконцевые слияния длиной от одного остатка до полипептидов, содержащих

несколько остатков, а также вставки внутри последовательности одного или более аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым остатком метионила.

**[00154]** В настоящее изобретение включены однодоменные антитела, полученные путем консервативных аминокислотных замен. При консервативной аминокислотной замене аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь с аналогичным зарядом. Как описано выше, в данной области определены семейства аминокислотных остатков, имеющих боковые цепи с аналогичными зарядами. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Альтернативно, мутации могут быть введены случайным образом вдоль всей или части кодирующей последовательности, например, путем мутагенеза с насыщением, и полученные мутанты могут быть подвергнуты скринингу на биологическую активность для выявления мутантов, сохраняющих активность. После мутагенеза кодируемый белок может быть экспрессирован, и может быть определена активность белка. Консервативные (например, внутри аминокислотной группы с аналогичными свойствами и/или боковыми цепями) замены могут быть сделаны таким образом, чтобы сохранить или существенно не изменить свойства. Иллюстративные замены показаны в таблице ниже.

**Таблица 8: Аминокислотные замены**

Исходный Остаток	Иллюстративные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala

Исходный Остаток	Иллюстративные замены
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин

**[00155]** Аминокислоты можно объединить в группы в соответствии со сходными свойствами их боковых цепей (*см., например, Lehninger, Biochemistry 73-75 (2d ed. 1975)*): (1) неполярные: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) незаряженные полярные: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) кислые: Asp (D), Glu (E); и (4) основные: Lys (K), Arg (R), His (H). Альтернативно, природные остатки можно разделить на группы на основе общих свойств боковой цепи: (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) кислые: Asp, Glu; (4) основные: His, Lys, Arg; (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; и (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe. Например, любой остаток цистеина, не участвующий в поддержании правильной конформации однодоменного антитела, также может быть заменен, например, другой аминокислотой, такой как аланин или серин, для улучшения окислительной стабильности молекулы и предотвращения aberrantного сшивания. Неконсервативные замены приводят к замене члена одного из этих классов на член другого класса.

**[00156]** Один тип варианта замещения включает замену одного или более остатков гипервариабельной области исходного антитела (например, гуманизованное или человеческое антитело). Как правило, полученный вариант(-ы), выбранный для дальнейшего изучения, будет иметь модификации (например, улучшения) определенных биологических свойств (например, повышенную аффинность, пониженную иммуногенность) по сравнению с исходным антителом, и/или будет иметь по существу

сохраненные определенные биологические свойства исходного антитела. Иллюстративным вариантом замещения является антитело с созревшей аффинностью, которое традиционно можно получить, *например*, применяя методы созревания на основе фагового дисплея, такие как те, что описаны в данном документе. Вкратце один или более аминокислотных остатков CDR подвергают мутации и варианты антитела экспонируют на поверхности фага и проводят скрининг в отношении конкретного вида биологической активности (*например*, аффинности связывания).

**[00157]** В CDR могут быть внесены изменения (*например*, замены), *например*, для повышения аффинности антитела. Такие изменения могут быть произведены в «горячих точках» CDR, т. е. остатках, кодируемых кодонами, которые подвергаются мутированию с высокой частотой во время процесса соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207: 179-196 (2008)), и/или SDR (a-CDR), при этом полученный вариант антитела или его фрагмент тестируется на аффинность связывания. Созревание аффинности путем конструирования и повторного выбора из вторичных библиотек описано, *например*, в Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). В некоторых вариантах осуществления созревания аффинности, разнообразие вводится в вариабельные гены, выбранные для созревания, любым из множества способов (*например*, подверженной ошибкам ПЦР, перетасовкой цепей или олигонуклеотид-направленным мутагенезом). Затем создается вторичная библиотека. Затем проводят скрининг библиотеки для идентификации любых вариантов антител с требуемой аффинностью. Другой способ для внесения разнообразия включает подходы, направленные на CDR, в которых несколько аминокислотных остатков CDR (4-6 аминокислотных остатков подряд) являются рандомизированными. Остатки CDR, вовлеченные в связывание антигена, могут быть специфически идентифицированы, например, с использованием аланин-сканирующего мутагенеза или моделирования. Более подробное описание созревания аффинности представлено в разделе ниже.

**[00158]** В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции могут совершаться внутри одной или более CDR при условии, что такие изменения существенно не снижают способность антитела связывать антиген. Например, в CDR можно проводить консервативные замены (например, консервативные замены, предложенные в данном документе), которые существенно не снижают аффинность связывания. В некоторых вариантах осуществления вариантов последовательностей VHH, представленных в данном документе, каждая CDR либо не изменена, либо содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

**[00159]** Удобный способ выявления остатков или областей антитела, которые могут быть

мишенями для мутагенеза, называется «аланин-сканирующим мутагенезом», описанным в Cunningham and Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989). В данном способе аминокислотный остаток или группу целевых аминокислотных остатков (например, заряженные аминокислотные остатки, такие как Arg, Asp, His, Lys и Glu) идентифицируют и заменяют нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином) для определения влияния на взаимодействие антитела с антигеном. Дополнительные замены могут быть внесены в те расположения аминокислот, которые проявляли функциональную чувствительность к исходным заменам. В альтернативном или дополнительном варианте используют кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и расположенные рядом остатки можно использовать в качестве мишеней или удалять из кандидатов для замены. Варианты могут быть подвергнуты скринингу для определения наличия в них желаемых свойств.

**[00160]** Вставки аминокислотной последовательности включают амино- и/или карбокси-концевые слияния, имеющие длину в диапазоне от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым остатком метионила. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом (например, для терапии ADEPT) или полипептидом, который увеличивает время полужизни в сыворотке крови.

**[00161]** Вариации могут быть получены с использованием способов, известных в данной области, таких как опосредованный олигонуклеотидами (сайт-направленный) мутагенез, аланиновое сканирование и ПЦР-мутагенез. Сайт-направленный мутагенез (*см., например, Carter, Biochem J.* 237:1-7 (1986); и *Zoller et al., Nucl. Acids Res.* 10:6487-500 (1982)), кассетный мутагенез (*см., например, Wells et al., Gene* 34:315-23 (1985)), или другие известные способы могут быть применены к клонированной ДНК для получения варианта ДНК однодоменного антитела.

**[00162]** В некоторых вариантах осуществления однодоменные антитела, представленные в данном документе, химически модифицированы, например, путем ковалентного присоединения любого типа молекулы к однодоменному антителу. Производные антител могут включать антитела, которые были химически модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пэгилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком или конъюгации с одним или более доменов иммуноглобулина (например, Fc или часть Fc). Любая из

многочисленных химических модификаций может быть осуществлена с помощью известных методов, включая, но не ограничиваясь ими, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, получение составов, метаболический синтез туникамицина и т. д. Кроме того, антитело может содержать одну или более неклассических аминокислот.

**[00163]** В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, изменено для увеличения или уменьшения степени, в которой антитело является гликозилированным. Добавление или удаление сайтов гликозилирования в антителе легко осуществить путем изменения аминокислотной последовательности, приводящего к созданию или удалению одного или более сайтов гликозилирования.

**[00164]** Когда представленное в данном документе однодоменное антитело сливают с областью Fc, при этом связанный с ней углевод может быть изменен. Нативные антитела, продуцируемые клетками млекопитающих, как правило, содержат разветвленный биантеннальный олигосахарид, который обычно присоединяется посредством N-связи к Asn<sup>297</sup> домена CH<sub>2</sub> области Fc. См., например, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). Олигосахарид может содержать различные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в «стволе» биантеннальной олигосахаридной структуры. В некоторых вариантах осуществления модификации олигосахаридов в связывающих молекулах, предложенных в данном документе, могут быть выполнены для создания вариантов с определенными улучшенными свойствами.

**[00165]** В других вариантах осуществления, когда однодоменное антитело, представленное в данном документе, слито с областью Fc, варианты антител, представленные в данном документе, могут иметь углеводную структуру, в которой отсутствует фукоза, присоединенная (прямо или косвенно) к указанной области Fc. Например, количество фукозы в таком антителе может составлять от 1% до 80%, от 1% до 65%, от 5% до 65% или от 20% до 40%. Количество фукозы определяют, рассчитывая среднее количество фукозы в сахарной цепи Asn<sup>297</sup> относительно общего количества гликоструктур, присоединенных к Asn<sup>297</sup> (например, комплексных, гибридных или содержащих большое количество маннозы структур), согласно данным масс-спектрометрии MALDI-TOF, как описано, например, в WO 2008/077546. Asn<sup>297</sup> относится к остатку аспарагина, расположенному в положении 297 в области Fc (согласно нумерации EU остатков области Fc); при этом Asn<sup>297</sup> также может быть расположен на около ± 3 аминокислот выше или ниже положения 297, т.е. между положениями 294 и 300, вследствие незначительных вариаций последовательностей в антителах. Такие варианты фукозилирования могут иметь улучшенную функцию АЗКЦ. См., например, патентные

публикации США №№ 2003/0157108 и 2004/0093621. Примеры публикаций, относящихся к «дефукозилированным» или «дефицитным по фукозе» вариантам антител, включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Примеры линий клеток, способных вырабатывать дефукозилированные антитела, включают клетки CHO Lec13 с дефицитом фукозилирования белка (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); заявка на патент США № US 2003/0157108; и WO 2004/056312, особенно в Примере 11), и линии клеток с нокаутом, таких как ген альфа-1,6-фукозилтрансферазы, *FUT8*, клетки с нокаутом CHO (см., например, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); и WO 2003/085107).

**[00166]** Связывающие молекулы, содержащие однодоменное антитело, представленное в данном документе, дополнительно снабжены разделенными пополам олигосахаридами, например, в которых биантеннальный олигосахарид, присоединенный к области Fc, разделен пополам с помощью GlcNAc. Такие варианты могут иметь пониженное фукозилирование и/или улучшенную функцию АЗКЦ. Примеры таких вариантов описаны, например, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); патенте США № 6602684 (Umana et al.); и US 2005/0123546 (Umana et al.). Также предлагаются варианты с по меньшей мере одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к области Fc. Такие варианты могут иметь улучшенную функцию КЗЦ. Такие варианты описаны, например, в WO 1997/30087; WO 1998/58964; и WO 1999/22764.

**[00167]** В молекулах, которые содержат однодоменное антитело по настоящему изобретению и область Fc, в область Fc могут быть введены одна или более аминокислотных модификаций, тем самым создавая вариант области Fc. Вариант области Fc может включать последовательность человеческой области Fc (например, человеческой области Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или более аминокислотных положениях.

**[00168]** В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке рассмотрены варианты, которые обладают некоторыми, но не всеми эффекторными функциями, что делает ее желательным кандидатом для применений, в которых важен период полужизни связывающей молекулы *in vivo*, но есть определенные эффекторные функции (такие как комплемент и АЗКЦ) являются ненужными или вредными. Анализы цитотоксичности могут быть проведены *in vitro* и/или *in vivo* для подтверждения восстановления/ослабления

активности КЗЦ и/или АЗКЦ. Например, анализы связывания Fc-рецептора (FcR) могут быть проведены, чтобы гарантировать, что связывающая молекула не связывается с FcγR (следовательно, вероятно, не обладает активностью АКЗЦ), но сохраняет способность связывания с FcRn. Неограничивающие примеры анализов *in vitro* для оценки активности АЗКЦ представляющей интерес молекулы описаны в патенте США № 5500362 (см., например, Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) и Hellstrom, I et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5821337 (см. Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). В альтернативном варианте могут быть использованы нерадиоактивные методы анализа (см., например, нерадиоактивный анализ цитотоксичности АСТТ<sup>™</sup> для проточной цитометрии (CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, штат Калифорния; и нерадиоактивный анализ цитотоксичности CytoTox 96<sup>®</sup> (Promega, Мадисон, штат Висконсин). Эффекторные клетки, пригодные для такого анализа, включают мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) и природные клетки-киллеры (NK). В качестве альтернативы или дополнения, активность АЗКЦ молекулы, представляющей интерес, можно оценить *in vivo*, например, на животной модели, такой как описанная в публикации Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). Также можно проводить анализ связывания C1q, чтобы подтвердить, что антитело неспособно связывать C1q и, следовательно, у него отсутствует активность КЗЦ. См., например, ИФА связывания C1q и C3c в WO 2006/029879 и WO 2005/100402. Для оценки активации комплемента может быть проведен анализ КЗЦ (см., например, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); и Cragg, M.S. И M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). Связывание FcRn и определение клиренса/периода полужизни *in vivo* также можно проводить с использованием методов, известных в данной области техники (см., например, Petkova, S.B. et al., *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

**[00169]** Связывающие молекулы со сниженной эффекторной функцией включают молекулы с заменой одного или более остатков области Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (патент США № 6737056). Такие мутанты Fc включают мутантов Fc с заменами в двух или более аминокислотных положениях 265, 269, 270, 297 и 327, в том числе так называемые мутанты Fc «DANA» с заменой остатков 265 и 297 на аланин (патент США 7332581).

**[00170]** Описаны некоторые варианты с улучшенным или уменьшенным связыванием с FcR. (См., например, патент США 6737056; WO 2004/056312, и Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).)

**[00171]** В некоторых вариантах осуществления вариант содержит область Fc с одной или более аминокислотными заменами, которые улучшают АЗКЦ, например, замены в

положениях 298, 333 и/или 334 области Fc (нумерация EU для остатков). В некоторых вариантах осуществления в область Fc вносятся изменения, которые приводят к измененному (*m.e.* улучшенному или ослабленному) связыванию C1q и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ), *например*, как описано в патенте США № 6194551, WO 99/51642 и Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

**[00172]** Связывающие молекулы с повышенным периодом полужизни и улучшенным связыванием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который отвечает за перенос материнских IgG к плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)), описаны в US 2005/0014934 A1 (Hinton et al.). Эти молекулы содержат область Fc с одной или более заменами в ней, которые улучшают связывание области Fc с FcRn. Такие варианты Fc включают варианты с заменами в одном или более остатках области Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, *например*, заменой остатка 434 области Fc (патент США № 7371826). См. также Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821; и WO 94/29351, касающиеся других примеров вариантов области Fc.

**[00173]** В некоторых вариантах осуществления может быть желательно создать сконструированные с цистеином, в которых один или более остатков антитела замещены остатками цистеина. В некоторых вариантах осуществления замещенные остатки находятся в доступных сайтах антитела. За счет замещения этих остатков цистеином реактивные тиоловые группы тем самым размещаются в доступных сайтах антитела и могут использоваться для конъюгирования антитела с другими фрагментами, такими как лекарственные фрагменты или линкер-лекарственные фрагменты, для создания иммуноконъюгата, как описано далее в данном документе.

### 5.2.3. Созревание аффинности *in vitro*

**[00174]** В некоторых вариантах осуществления, варианты антител, имеющие улучшенные свойства, такие как аффинность, стабильность или уровень экспрессии, по сравнению с родительским антителом, можно готовить посредством *in vitro* созревания аффинности. Как и в случае природного прототипа, *in vitro* созревание аффинности основано на принципах мутации и отбора. Библиотеки антител экспонируют на поверхности организма (*например*, клетки фага, бактерий, дрожжей или млекопитающего) или в ассоциации (*например*, ковалентной или нековалентной) с кодирующей мРНК или ДНК. Аффинный отбор представленных антител позволяет выделить организмы или комплексы, несущие генетическую информацию, кодирующую антитела. Два или три раунда мутаций и отбора с использованием методов дисплея, таких как фаговый дисплей, обычно приводят к

получению фрагментов антител с аффинностью в нижнем наномолярном диапазоне. Антитела с созревшей аффинностью могут иметь наномолярные или даже пикомолярные аффинности к целевому антигену.

**[00175]** Фаговый дисплей является широко распространенным методом для представления и отбора антител. Антитела экспонируются на поверхности бактериофагов Fd или M13 в виде гибридов с белком оболочки бактериофага. Отбор включает контакт с антигеном для того, чтобы обеспечить возможность связывания представленных на фаге антител с их мишенями, что называется «пэннингом». Проводят выделение связанных с антигеном фагов и используют их, чтобы инфицировать бактерии для получения фагов для последующих раундов отбора. Обзор см., например, в Hoogenboom, *Methods. Mol. Biol.* 178:1-37 (2002); и Bradbury and Marks, *J. Immunol. Methods* 290:29-49 (2004).

**[00176]** В системе дрожжевого дисплея (см., например, Boder *et al.*, *Nat. Biotech.* 15:553-57 (1997) и Chao *et al.*, *Nat. Protocols* 1:755-68 (2006)) антитело может быть слитым с адгезивной субъединицей дрожжевого белка агглютинина Aga2p, который прикрепляется к клеточной стенке дрожжей через дисульфидные связи с Aga1p. Представление белка посредством Aga2p приводит к отдалению белка от клеточной поверхности, минимизируя потенциальные взаимодействия с другими молекулами стенки дрожжевой клетки. Для скрининга библиотеки используют магнитное разделение и проточную цитометрию, чтобы провести отбор антител с улучшенной аффинностью или стабильностью. Связывание с представляющим интерес растворимым антигеном определяют путем мечения дрожжей биотинилированным антигеном и вторичным реагентом, таким как стрептавидин, конъюгированный с флуорофором. Изменения поверхностной экспрессии антитела можно измерить с помощью иммунофлуоресцентного мечения либо гемагглютинина, либо эпитопной метки с-Мус, фланкирующей одноцепочечное антитело (например, scFv). Было показано, что экспрессия коррелирует со стабильностью экспонируемого белка, и, таким образом, антитела могут быть выбраны для улучшения стабильности, а также аффинности (см., например, Shusta *et al.*, *J. Mol. Biol.* 292:949-56 (1999)). Дополнительным преимуществом дрожжевого дисплея является то, что сворачивание представляемых белков происходит в эндоплазматическом ретикулуме эукариотических дрожжевых клеток, используя преимущество шаперонов и аппарата контроля качества эндоплазматического ретикулума. После завершения созревания аффинность антитела можно удобным образом «титровать» при экспонировании на поверхности дрожжей, устраняя необходимость экспрессии и выделения каждого клона. Теоретическим ограничением дисплея на дрожжевой поверхности является потенциально меньший размер библиотеки, чем в других методах дисплея; однако в недавно разработанном подходе используется система

скрещивания дрожжевых клеток для создания комбинаторного разнообразия, которое по оценкам имеет размер  $10^{14}$  (см., например, публикацию патента США 2003/0186374; и Blaise *et al.*, *Gene* 342:211–18 (2004)).

**[00177]** В рибосомном дисплее создают комплексы антитело-рибосома-мРНК (ARM) для проведения отбора в бесклеточной системе. Библиотеку ДНК, кодирующую конкретную библиотеку антител, генетически сливают со спейсерной последовательностью, в которой отсутствует стоп-кодон. При трансляции эта спейсерная последовательность остается присоединенной к пептидильной тРНК и занимает рибосомальный туннель, позволяя, таким образом, представляющему интерес белку выступать за пределы рибосомы и сворачиваться. Получаемый в результате комплекс мРНК, рибосомы и белка может связываться со связанным с поверхностью лигандом, что позволяет проводить одновременное выделение антитела и кодирующей его мРНК посредством аффинного захвата лигандом. Затем проводят обратную транскрипцию связанной с рибосомой мРНК в кДНК, которую затем можно подвергнуть мутагенезу и использовать в следующем раунде отбора (см., например, Fukuda *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 34:e127 (2006)). В мРНК-дисплее создают ковалентную связь между антителом и мРНК, используя пурамицин в качестве адаптерной молекулы (Wilson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3750-55 (2001)).

**[00178]** Так как все эти методы осуществляют полностью *in vitro*, они обеспечивают два основных преимущества по сравнению с другими технологиями. Во-первых, разнообразие библиотеки не ограничено эффективностью трансформации бактериальных клеток, а только числом рибосом и разных молекул мРНК, присутствующих в пробирке для исследования. Во-вторых, после каждого раунда отбора легко можно вводить случайные мутации, например, посредством некорректирующих полимераз, так как после любой стадии расширения разнообразия не нужно проводить трансформацию библиотеки.

**[00179]** В некоторых вариантах осуществления могут использоваться системы дисплея на клетках млекопитающих.

**[00180]** Разнообразие также можно вносить в CDR библиотек антител направленным образом или посредством случайного внесения. Первый подход включает последовательное нацеливание на все CDR антитела посредством мутагенеза на высоком или низком уровне или нацеливание на выделенные горячие точки соматических гипермутаций (см., например, Ho *et al.*, *J. Biol. Chem.* 280:607-17 (2005)) или остатки, которые предположительно влияют на аффинность на основании экспериментальных данных или по структурным причинам. Разнообразие также можно вносить путем замещения областей, разнообразие которых обеспечивается естественным образом путем перетасовки ДНК, или аналогичными методами (см., например, Lu *et al.*, 2003, *J. Biol. Chem.*

278:43496-507; патенты США № 5565332 и 6989250). Альтернативные методы нацелены на гипервариабельные петли, простирающиеся до остатков каркасной области (см., например, Bond *et al.*, J. Mol. Biol. 348:699-709 (2005)) с использованием делеций и вставок петель в CDR или внесение разнообразия на основе гибридизации (см., например, публикацию патента США № 2004/0005709). Дополнительные методы создания разнообразия в CDR описаны, например, в патенте США № 7985840. Дополнительные способы, которые можно использовать для создания библиотек антител и/или созревания аффинности антител, описаны, *например*, в патентах США №№ 8685897 и 8603930, и публикациях США №№ 2014/0170705, 2014/0094392, 2012/0028301, 2011/0183855 и 2009/0075378, которые все включены в данный документ посредством ссылки.

**[00181]** Скрининг библиотек можно проводить различными методами, известными в данной области техники. Например, однодоменные антитела можно иммобилизовать на твердых подложках, колонках, шпильках или целлюлозных/поли(винилиденфторидных) мембранах/других фильтрах, экспрессировать на клетках-хозяевах, прикрепленных к адсорбционным планшетам, или использовать в сортировке клеток, или конъюгировать с биотином для захвата на покрытых стрептавидином частицах, или использовать в любом другом способе для пэннинга дисплейных библиотек.

**[00182]** Обзор методов *in vitro* созревания аффинности смотрите, например, в Hoogenboom, Nature Biotechnology 23:1105-16 (2005); Quiroz and Sinclair, Revista Ingenieria Biomedica 4:39-51 (2010); и приведенных в них ссылок.

#### **5.2.4. Модификации однодоменных антител**

**[00183]** Ковалентные модификации однодоменных антител включены в объем настоящего изобретения. Ковалентные модификации включают реакцию целевых аминокислотных остатков однодоменного антитела с органическим дериватирующим агентом, который способен реагировать с выбранными боковыми цепями или N- или C-концевыми остатками однодоменного антитела. Другие модификации включают дезамидирование остатков глутамила и аспарагина до соответствующих остатков глутамила и аспартила, соответственно, гидроксирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп остатков серила и треонила, метилирование  $\alpha$ -аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (см., *например*, Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties 79-86 (1983)), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

**[00184]** Другие типы ковалентной модификации однодоменного антитела, включенные в объем настоящего изобретения, включают изменение нативного профиля гликозилирования антитела или полипептида, как описано выше (см., например, Beck *et al.*,

Curr. Pharm. Biotechnol. 9:482-501 (2008); и Walsh, Drug Discov. Today 15:773-80 (2010)), и связывание антитела с одним из множества небелковых полимеров, например, полиэтиленгликолем (PEG), полипропиленгликолем или полиоксиалкиленами, как указано, например, в патенте США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192; или 4179337. Однодоменное антитело, которое связывается с GUCY2C по настоящему изобретению, также может быть генетически слито или конъюгировано с одной или более константными областями иммуноглобулина или их частями (например, Fc) для продления периода полужизни и/или для придания известных Fc-опосредованных эффекторных функций.

**[00185]** Одноцепочечное антитело, которое связывается с GUCY2C по настоящему изобретению, также может быть модифицировано с образованием химерных молекул, содержащих одноцепочечное антитело, которое связывается с GUCY2C, слитое с другим гетерологичным полипептидом или аминокислотной последовательностью, например, эпитопной меткой (см., например, Terpe, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60:523-33 (2003)) или областью Fc молекулы IgG (см., например, Aruffo, *Antibody Fusion Proteins* 221-42 (Chamow and Ashkenazi eds., 1999)). Одноцепочечное антитело, которое связывается с GUCY2C, также можно использовать для создания связывающего GUCY2C химерного антигенного рецептора (CAR), как более подробно описано ниже.

**[00186]** Также в данном документе предложены слитые белки, содержащие одноцепочечное антитело, которое связывается с GUCY2C по настоящему изобретению, и гетерологичный полипептид. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный полипептид, с которым антитело генетически слито или химически конъюгировано, применим для нацеливания антитела на клетки, имеющие экспрессируемый на клеточной поверхности GUCY2C.

**[00187]** Также в данном документе предложены панели антител, которые связываются с антигеном GUCY2C. В конкретных вариантах осуществления панели антител имеют разные скорости ассоциации, разные скорости диссоциации, разную аффинность в отношении GUCY2C и/или разную специфичность в отношении антигена GUCY2C. В некоторых вариантах осуществления панели содержат или состоят из около 10-1000 антител или более. Панели антител можно использовать, например, в 96-луночных или 384-луночных планшетах для такого анализа, как ИФА.

#### **5.2.5. Гуманизированные однодоменные антитела**

**[00188]** Описанные в данном документе однодоменные антитела включают гуманизированные однодоменные антитела. Общие стратегии гуманизации однодоменных антител из видов Camelidae были описаны (см., например, Vincke *et al.*, J. Biol. Chem., 284(5):3273-3284 (2009)) и могут быть полезны для получения гуманизированных доменов

VНН, описанных в данном документе. Конструкция гуманизированных однодоменных антител из видов Camelidae может включать отличительные остатки в VНН, такие как остатки 11, 37, 44, 45 и 47 (нумерация остатков по Kabat) (Muyldermans, *Reviews Mol Biotech* 74:277-302 (2001)).

**[00189]** Гуманизированные антитела, такие как описанные в данном документе гуманизированные однодоменные антитела, также могут быть получены с использованием различных способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, пересадку CDR (Европейский патент № EP 239400; международная публикация № WO 91/09967 и патентах США №№ 5225539, 5530101 и 5585089), маскировку поверхностных остатков или изменение поверхности (Европейские патенты №№ EP 592106 и EP 519596; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); и Roguska *et al.*, *PNAS* 91:969-973 (1994)), перетасовку цепей (патент США № 5565332), и методики, раскрытые, *например*, в патенте США № 6407213, патенте США № 5766886, WO 9317105, Tan *et al.*, *J. Immunol.* 169:1119-25 (2002), Caldas *et al.*, *Protein Eng.* 13(5):353-60 (2000), Morea *et al.*, *Methods* 20(3):267-79 (2000), Vaca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272(16):10678-84 (1997), Roguska *et al.*, *Protein Eng.* 9(10):895-904 (1996), Couto *et al.*, *Cancer Res.* 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto *et al.*, *Cancer Res.* 55(8):1717-22 (1995), Sandhu JS, *Gene* 150(2):409-10 (1994), и Pedersen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 235(3):959-73 (1994). См. также публикацию патента США № US 2005/0042664 A1 (24 февраля 2005 г.), которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

**[00190]** В некоторых вариантах осуществления однодоменные антитела, предложенные в данном документе, могут представлять собой гуманизированные однодоменные антитела, которые связываются с GUCY2C, включая GUCY2C человека. Например, гуманизированные одноцепочечные антитела по настоящему изобретению могут содержать одну или более CDR, указанных в SEQ ID NO: 3-10. Различные способы гуманизации антител, не являющихся человеческими, известны в данной области техники. Например, гуманизированное антитело может иметь один или более аминокислотных остатков, введенных в него из источника, который не является человеком. Эти нечеловеческие аминокислотные остатки часто называются «импортированными» остатками, которые, как правило, взяты из «импортированного» варибельного домена. Гуманизацию можно осуществлять, например, следуя методу Jones *et al.*, *Nature* 321:522-25 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-27 (1988); и Verhoeven *et al.*, *Science* 239:1534-36 (1988)), путем замещения последовательностей гиперварибельной области соответствующими последовательностями человеческого антитела.

**[00191]** В некоторых случаях гуманизированные антитела конструируют путем

прививания CDR, при котором аминокислотные последовательности CDR исходного нечеловеческого антитела прививают в каркасную область человеческого антитела. Например, Padlan *et al.* определили, что в действительности только около одной трети остатков в CDR контактируют с антигеном и назвали их «определяющими специфичность остатками» или SDR (Padlan *et al.*, FASEB J. 9:133-39 (1995)). В методе прививания SDR в каркасную область человеческого антитела прививают только остатки SDR (см., например, Kashmiri *et al.*, Methods 36:25-34 (2005)).

**[00192]** Выбор человеческих переменных доменов для применения при получении гуманизованных антител может иметь важное значение для снижения антигенности. Например, в соответствии с так называемым методом «наилучшего соответствия» последовательность переменного домена нечеловеческого антитела подвергают скринингу против всей библиотеки известных человеческих последовательностей переменных доменов человека. Человеческая последовательность, наиболее близкая к последовательности нечеловеческого антитела, может быть выбрана в качестве человеческой каркасной области для гуманизованного антитела (Sims *et al.*, J. Immunol. 151:2296-308 (1993); и Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-17 (1987)). В другом методе используют конкретную каркасную область, полученную из консенсусной последовательности всех человеческих антител конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Одну и ту же каркасную область можно использовать для нескольких разных гуманизованных антител (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-89 (1992); and Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623-32 (1993)). В некоторых случаях каркасная область получена из консенсусных последовательностей наиболее распространенных человеческих подклассов, V<sub>L</sub>6 подгруппы I (V<sub>L</sub>6I) и V<sub>H</sub> подгруппы III (V<sub>H</sub>III). В еще одном методе используются гены человеческой зародышевой линии в качестве источника каркасных областей.

**[00193]** В альтернативной парадигме на основании сравнения CDR, называемой супергуманизацией, гомология FR является нерелевантной. Метод состоит в сравнении нечеловеческой последовательности с репертуаром функциональных генов зародышевой линии человека. Затем отбирают те гены, которые кодируют одинаковые или близкородственные с мышинными последовательностями канонические структуры. Далее, среди генов, имеющих общие канонические структуры с нечеловеческим антителом, в качестве доноров FR отбирают те, которые характеризуются наибольшей гомологией в пределах CDR. Наконец, на эти FR прививают нечеловеческие CDR (см., например, Tan *et al.*, J. Immunol. 169:1119-25 (2002)).

**[00194]** В общем случае также необходимо, чтобы антитела были гуманизованными с

сохранением своей аффинности к антигену и других предпочтительных биологических свойств. Для достижения этой цели, в соответствии с одним способом гуманизированные антитела получают в процессе анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов, используя трехмерные модели исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов общедоступны и знакомы специалистам в данной области техники. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают возможные трехмерные конформационные структуры выбранных кандидатных последовательностей иммуноглобулинов. К ним относятся, например, WAM (Whitelegg and Rees, *Protein Eng.* 13:819-24 (2002)), Modeller (Sali and Blundell, *J. Mol. Biol.* 234:779-815 (1993)) и Swiss PDB Viewer (Guex and Peitsch, *Electrophoresis* 18:2714-23 (1997)). Изучение таких отображений позволяет провести анализ вероятной роли остатков в функционировании кандидатных последовательностей иммуноглобулина, например, анализ остатков, которые влияют на способность кандидатного иммуноглобулина связываться с антигеном-мишенью. Следовательно, можно выбирать и объединять остатки FR из реципиентных и импортных последовательностей таким образом, чтобы получить необходимую характеристику антитела, такую как повышенная аффинность к целевому(-ым) антигену(-ам). В общем случае остатки гипервариабельной области непосредственно и в наибольшей степени вовлечены в связывание антигена.

**[00195]** Другой способ гуманизации антител основан на критериях «человечности» антител, называемых Human String Content (HSC). Этот способ состоит в сравнении мышинной последовательности с репертуаром генов человеческой зародышевой линии, а разницу оценивают как HSC. Затем целевую последовательность гуманизируют путем максимизации ее HSC, а не используя глобальный показатель идентичности для создания множества разных гуманизированных вариантов (Lazar *et al.*, *Mol. Immunol.* 44:1986-98 (2007)).

**[00196]** Помимо вышеописанных способов для создания и отбора гуманизированных антител можно использовать эмпирические способы. Эти способы включают способы, основанные на создании больших библиотек гуманизированных вариантов и отборе наилучших клонов, используя технологии обогащения или технологии высокопроизводительного скрининга. Варианты антител можно выделять из библиотек фагового, рибосомального и дрожжевого дисплея, а также путем скрининга бактериальных колоний (*см., например*, Hoogenboom, *Nat. Biotechnol.* 23:1105-16 (2005); Dufner *et al.*, *Trends Biotechnol.* 24:523-29 (2006); Feldhaus *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 21:163-70 (2003); и Schlapschy *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* 17:847-60 (2004)).

**[00197]** В подходе библиотеки FR набор вариантов остатков вносят в определенные положения в FR с последующим скринингом библиотеки для отбора FR, которые наилучшим образом поддерживают привитые CDR. Остатки, подлежащие замене, могут включать некоторые или все остатки зоны Вернье, идентифицированные как потенциально обеспечивающие вклад в структуру CDR (см., например, Foote and Winter, *J. Mol. Biol.* 224:487-99 (1992)), или из более ограниченного набора целевых остатков, определенных Vasa *et al.* *J. Biol. Chem.* 272:10678-84 (1997).

**[00198]** При перетасовке FR целые FR комбинируют с нечеловеческими CDR вместо создания комбинаторных библиотек выбранных вариантов остатков (см., например, Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36:43-60 (2005)). Можно использовать одноэтапный процесс перетасовки FR. Было показано, что такой процесс эффективен, так как полученные антитела демонстрируют улучшенные биохимические и физико-химические свойства, включая усиленную экспрессию, повышенную аффинность и термическую стабильность (см., например, Damschroder *et al.*, *Mol. Immunol.* 44:3049-60 (2007)).

**[00199]** Метод «гуманиринга» основан на экспериментальном определении важных минимальных детерминант специфичности (MSD) и основан на последовательном замещении нечеловеческих фрагментов на библиотеки человеческих FR и оценке связывания. Этот метод, как правило, приводит к сохранению эпитопов и идентификации антител из нескольких подклассов с различными CDR человеческого V-сегмента.

**[00200]** Метод «человеческого конструирования» включает изменение нечеловеческого антитела или фрагмента антитела путем осуществления определенных изменений в аминокислотной последовательности антитела для получения модифицированного антитела со сниженной иммуногенностью в организме человека, которое при этом сохраняет необходимые свойства связывания исходных нечеловеческих антител. Как правило, методика включает классификацию аминокислотных остатков нечеловеческого антитела как остатков «низкого риска», «умеренного риска» или «высокого риска». Эту классификацию проводят, используя расчет глобальных рисков/выгод, который позволяет оценить прогнозируемую выгоду осуществления конкретной замены (*например*, в отношении иммуногенности в организме человека) в сравнении с риском, что эта замена окажет отрицательное влияние на сворачивание получаемого в результате антитела. Конкретный человеческий аминокислотный остаток, подлежащий замене в заданном положении (*например*, низкого или умеренного риска) последовательности нечеловеческого (*например*, мышинового) антитела, можно выбрать путем выравнивания аминокислотной последовательности из переменных областей нечеловеческого антитела с соответствующей областью специфической или консенсусной последовательности

человеческого антитела. Аминокислотные остатки в положениях низкого или умеренного риска в нечеловеческой последовательности можно замещать соответствующими остатками в последовательности человеческого антитела в соответствии с выравниванием. Методики получения человеческих сконструированных белков более подробно описаны в Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7:805-14 (1994); патент США №№ 5766886; 5770196; 5821123; и 5869619; и публикации PCT WO 93/11794.

**[00201]** Составное человеческое антитело может быть получено с использованием, например, технологии Composite Human Antibody™ (Antitope Ltd., Кембридж, Великобритания). Для получения составных человеческих антител последовательности переменных областей конструируют из фрагментов множественных последовательностей переменных областей человеческих антител таким образом, чтобы исключить Т-клеточные эпитопы, тем самым сводя к минимуму иммуногенность полученного антитела.

**[00202]** Деиммунизированное антитело представляет собой антитело, в котором были удалены Т-клеточные эпитопы. Описаны способы получения деиммунизированных антител. См., например, Jones *et al.*, *Methods Mol Biol.* 525:405-23 (2009), xiv, и De Groot *et al.*, *Cell. Immunol.* 244:148-153(2006)). Деиммунизированные антитела содержат лишенные Т-клеточных эпитопов переменные области и человеческие константные области. Вкратце, клонируют переменные области антитела и затем идентифицируют Т-клеточные эпитопы путем тестирования перекрывающихся пептидов, полученных из переменных областей антитела, в анализе пролиферации Т-клеток. Эпитопы Т-клеток идентифицируют методами *in silico* для идентификации связывания пептида с МНС класса II человека. Мутации вводят в переменные области, чтобы устранить связывание с МНС класса II человека. Затем мутированные переменные области используют для получения деиммунизированного антитела.

#### **5.2.6. Получение однодоменных антител**

**[00203]** Однодоменные антитела (такие как VHH), представленные в данном документе, могут быть получены с использованием способов, известных в данной области техники, таких как иммунизация видов верблюдовых (таких как верблюд или лама) и получение из них гибридом, или путем клонирования библиотеки однодоменных антител с использованием методов молекулярной биологии, известных в данной области техники, и последующей селекции с помощью ИФА с отдельными клонами неотобранных библиотек или с использованием фагового дисплея. Например, способы получения однодоменных антител описаны, например, в Els Pardon *et al.*, *Nature Protocol*, 9(3): 674 (2014).

**[00204]** Однодоменные антитела, предложенные в данном документе, могут быть получены путем культивирования клеток, трансформированных или трансфицированных

вектором, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие однодоменные антитела. Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные компоненты антитела по настоящему изобретению, могут быть получены с использованием стандартных рекомбинантных методик. Желаемые полинуклеотидные последовательности можно выделять и секвенировать из клеток, продуцирующих антитела, таких как гибридомные клетки или В-клетки. В альтернативном варианте полинуклеотиды можно синтезировать, используя синтезатор нуклеотидов или технологии ПЦР. После получения последовательности, кодирующие полипептиды, вставляют в рекомбинантный вектор, способный к репликации и экспрессии гетерологичных полинуклеотидов в клетках-хозяевах. Многие векторы, которые известны в данной области техники, можно использовать в целях настоящего изобретения. Выбор подходящего вектора будет зависеть главным образом от размера нуклеиновых кислот, подлежащих вставке в вектор, и конкретной клетки-хозяина, подлежащей трансформации вектором. Клетки-хозяева, подходящие для экспрессии антител по настоящему изобретению, включают прокариотов, таких как археобактерии и эубактерии, включая грамотрицательные или грамположительные организмы, эукариотических микробов, таких как нитевидные грибы или дрожжи, клетки беспозвоночных, такие как клетки насекомых или растений, и клетки позвоночных, такие как линии клеток-хозяев млекопитающих. Клетки-хозяев трансформируют вышеописанными экспрессионными векторами и культивируют в традиционных питательных средах, модифицированных при необходимости для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих необходимые последовательности. Антитела, вырабатываемые клетками-хозяевами, очищают, используя стандартные способы очистки белка, известные в данной области техники.

**[00205]** Способы получения антител, включая конструирование векторов, экспрессию и очистку, дополнительно описаны в Plückthun *et al.*, Antibody Engineering: Producing antibodies in Escherichia coli: From PCR to fermentation 203-52 (McCafferty *et al.* eds., 1996); Kwong and Rader, *E. coli Expression and Purification of Fab Antibody Fragments*, в Current Protocols in Protein Science (2009); Tachibana and Takekoshi, *Production of Antibody Fab Fragments in Escherichia coli*, в Antibody Expression and Production (Al-Rubeai ed., 2011) и Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic (An ed., 2009).

**[00206]** Конечно, предполагается, что для получения однодоменных антител к GUCY2C можно использовать альтернативные способы, которые хорошо известны в данной области техники. Например, подходящая аминокислотная последовательность или ее части могут быть получены путем прямого пептидного синтеза с использованием твердофазных методов (см., например, Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis (1969); и Merrifield, J.

Am. Chem. Soc. 85:2149-54 (1963)). *In vitro* белковый синтез можно осуществлять, используя ручные методики или автоматизированные. Различные части антитела к GUCY2C могут быть химически синтезированы по отдельности и объединены с использованием химических или ферментативных способов для получения желаемого антитела к GUCY2C. В альтернативном варианте антитела можно очищать из клеток или жидкостей организма, таких как молоко, трансгенного животного, созданного для экспрессии антитела, как описано, например, в патентах США №№ 5545807 и 5827690.

**[00207]** В частности, однодоменные антитела или другие вещества, связывающие GUCY2C, представленные в данном документе, могут быть получены путем иммунизации лам, проведения сортировки отдельных В-клеток, проведения экстракции V-гена, клонирования веществ, связывающих GUCY2C, таких как слитые белки VHH-Fc, а затем проведения экспрессии и очистки в малом масштабе. Можно провести дополнительный скрининг однодоменных антител и других молекул, которые связываются с GUCY2C, включая один или более из отборов на положительных согласно ИФА, положительных согласно BLI и  $K_D$  менее 100 нМ. Эти критерии отбора можно комбинировать, как описано в Разделе 6 ниже. Кроме того, отдельные связывающие вещества VHH (и другие молекулы, которые связываются с GUCY2C) могут быть проанализированы на их способность связываться с клетками, экспрессирующими GUCY2C. Такой анализ можно проводить с использованием анализа на основе FACS с клетками, экспрессирующими GUCY2C, и измерения средней интенсивности флуоресценции (СИФ) флуоресцентно-меченных молекул VHH. Различные аспекты, упомянутые выше, описаны более подробно ниже.

**[00208]** Поликлональные антитела, как правило, вырабатываются у животных путем множественных подкожных (п/к) или внутрибрюшинных (в/б) инъекций соответствующего антигена и адъюванта. Может быть полезно конъюгировать соответствующий антиген с белком, который является иммуногенным для видов, подлежащих иммунизации, например, гемоцианином моллюска *Megathura crenulata* (KLH), сывороточным альбумином, бычьим тиреоглобулином или ингибитором трипсина сои с использованием бифункционального или дериватирующего агента, например, сложного эфира малеимидобензоилсульфосукцинимиды (конъюгация через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимиды (через остатки лизина), глутаральдегида, ангидрида янтарной кислоты,  $SOCl_2$ , или  $R^1N=C=NR$ , где R и  $R^1$  независимо представляют собой низшие алкильные группы. Примеры адъювантов, которые можно использовать, включают полный адъювант Фрейнда и адъювант MPL-TDM (монофосфориллипид А, синтетический дикориномиколят трегалозы). Специалист в данной области техники сможет выбрать протокол иммунизации без проведения необязательных экспериментов.

[00209] Например, животных иммунизируют против антигена, иммуногенных конъюгатов или производных путем комбинирования, например, 100 мкг или 5 мкг белка или конъюгата (для кроликов или мышей, соответственно) с 3 объемами полного адъюванта Фрейнда и внутрикожной инъекции раствора в несколько мест. Через месяц животным вводят от 1/5 до 1/10 исходного количества пептида или конъюгата в полном адъюванте Фрейнда путем подкожной инъекции в несколько мест. Через семь-четырнадцать дней у животных берут кровь и анализируют сыворотку на титр антител. Животным делают бустерные инъекции до достижения плато титра. Конъюгаты также могут быть получены в культуре рекомбинантных клеток в виде слитых белков. Также агенты, вызывающие агрегацию, такие как квасцы, подходят для усиления иммунного ответа.

[00210] Моноклональные антитела получают из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Таким образом, определение «моноклональное» указывает на то, что антитело не представляет собой смесь отдельных антител. Например, моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридного метода, впервые описанного в Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), или могут быть получены методами рекомбинантной ДНК (патент США № 4816567).

[00211] В гибридном методе соответствующее животное-хозяин иммунизируют для стимулирования лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с белком, используемым для иммунизации. В альтернативном варианте лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*. Лимфоциты затем сливают с клетками миеломы, используя подходящий агент для слияния, такой как полиэтиленгликоль, и получают гибридные клетки (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986).

[00212] Иммунизирующий агент, как правило, будет включать антигенный белок или его слитый вариант. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), pp. 59-103. Иммутизированные линии клеток, как правило, представляют собой трансформированные клетки млекопитающих. Полученные таким образом гибридные клетки высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, которые ингибируют рост или выживаемость неслитых, исходных клеток миеломы. Предпочтительными иммутизированными клетками миеломы являются те, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильную продукцию антител на высоком уровне выбранными

продуцирующими антитела клетками и чувствительны к среде, такой как среда НАТ.

**[00213]** Культуральную среду, в которой растут клетки гибридомы, анализируют в отношении выработки моноклональных антител, направленных против антигена. Культуральную среду, в которой культивируют гибридомные клетки, можно проанализировать на наличие моноклональных антител, направленных против желаемого антигена. Такие методики и анализы известны в данной области техники. Например, аффинность связывания может быть определена в анализе Скэтчарда, описанного в Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

**[00214]** После идентификации гибридомных клеток, которые продуцируют антитела желаемой специфичности, аффинности и/или активности, клоны можно субклонировать с помощью процедур предельного разведения и выращивать стандартными способами (Goding, см. выше). Подходящие для этих целей культуральные среды включают, например, среду, D-МЕМ или RPMI-1640. Кроме того, гибридомные клетки можно выращивать *in vivo* как опухоли у млекопитающего.

**[00215]** Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, удобно отделять от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки с помощью традиционных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как, например, хроматография с применением протеина А-сефарозы, хроматография с гидроксипатитом, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

**[00216]** Моноклональные антитела также могут быть получены методами рекомбинантной ДНК, такими как способы, описанные в патенте США № 4816567, и как описано выше. ДНК, кодирующую моноклональные антитела, легко выделять и секвенировать с помощью традиционных процедур (например, используя олигонуклеотидные зонды, способные специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи мышинных антител). Гибридомные клетки служат в качестве предпочтительного источника такой ДНК. После выделения ДНК может быть помещена в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, обезьяньи клетки COS, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или клетки миеломы, которые иначе не продуцируют белок иммуноглобулина, чтобы осуществить синтез моноклональных антител в таких рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзорные статьи по рекомбинантной экспрессии в бактериях ДНК, кодирующей антитело, включают Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) и Plickthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992).

**[00217]** В дополнительном варианте осуществления антитела могут быть выделены из фаговых библиотек антител, созданных с использованием методов, описанных в McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) и Marks *et al.*, *J.*

*Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991). В последующих публикациях описано получение антител человека с высокой аффинностью (наномолярный диапазон) путем перетасовки цепей (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), а также комбинаторной инфекции и рекомбинации *in vivo* в виде стратегии конструирования очень больших фаговых библиотек (Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Таким образом, эти методики являются приемлемыми альтернативами традиционным гибридным технологиям получения моноклональных антител для выделения моноклональных антител.

**[00218]** ДНК также можно модифицировать, например, путем замены кодирующей последовательности (патент США № 4816567; Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), или путем ковалентного присоединения к кодирующей последовательности всей или часть кодирующей последовательности неиммуноглобулинового полипептида. Такие неиммуноглобулиновые полипептиды могут быть заменены для создания химерного двухвалентного антитела, содержащего один антигенсвязывающий центр антитела, обладающий специфичностью в отношении антигена, и другой антигенсвязывающий центр антитела, обладающий специфичностью в отношении другого антигена.

**[00219]** Химерные или гибридные антитела также могут быть получены *in vitro* с использованием известных методов химии синтетических белков, включая методы, включающие сшивающие агенты. Например, иммунотоксины могут быть сконструированы с использованием реакции дисульфидного обмена или путем образования тиоэфирной связи. Примеры подходящих реагентов для этой цели включают имиотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат.

**[00220]** Для экспрессии в эукариотических клетках компоненты вектора, как правило, включают, но не ограничиваются ими, один или более из следующего, сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

**[00221]** Вектор для применения в эукариотическом хозяине может также содержать вставку, кодирующую сигнальную последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность предпочтительно является той, которая распознается и процессируется (т.е. расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. При экспрессии клеток млекопитающих доступны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидеры, например, сигнал gD простого герпеса. ДНК такой области-предшественника может быть лигирована в рамке считывания с ДНК, кодирующей антитела по настоящей заявке.

**[00222]** Как правило, компонент в виде точки начала репликации не требуется для векторов экспрессии млекопитающих (точка начала репликации SV40, как правило, может использоваться только потому, что он содержит ранний промотор).

**[00223]** Векторы экспрессии и клонирования могут содержать ген селекции, также называемый селективируемым маркером. Гены селекции могут кодировать белки, придающие устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину; дополняют ауксотрофные дефициты; или обеспечивают важные питательные вещества, недоступные из сложных питательных сред.

**[00224]** В одном примере схемы селекции используется лекарственное средство для остановки роста клетки-хозяина. Те клетки, которые успешно трансформируются гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарственному средству, и, таким образом, выживают в режиме селекции. В качестве примеров такой доминантной селекции используют препараты неомицин, микофеноловая кислота и гигромицин.

**[00225]** Другим примером подходящих селективируемых маркеров для клеток млекопитающих являются те, которые позволяют идентифицировать клетки, способные поглощать нуклеиновую кислоту, кодирующую антитела по настоящей заявке. Например, клетки, трансформированные селективным геном DHFR, сначала идентифицируют путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, содержащей метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. Иллюстративной подходящей клеткой-хозяином при использовании DHFR дикого типа является линия клеток яичника китайского хомячка (CHO) с дефицитом активности DHFR. Альтернативно, клетки-хозяева (особенно хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), трансформированные или котрансформированные последовательностями ДНК, кодирующими полипептид, белок DHFR дикого типа и другой селективируемый маркер, такой как аминогликозид-3'-фосфотрансфераза (APH) могут быть отобраны путем роста клеток в среде, содержащей агент для селекции селективируемого маркера.

**[00226]** Векторы экспрессии и клонирования, как правило, содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей желаемые полипептидные последовательности. Гены эукариотов имеют АТ-богатую область, расположенную примерно на 25-30 единиц выше от сайта, где иницируется транскрипция. Может быть включена другая последовательность, обнаруженная на 70-80 оснований выше от сайта начала транскрипции многих генов. 3'-конец большинства эукариот может служить сигналом для добавления поли(А)-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности могут быть

вставлены в эукариотические векторы экспрессии.

**[00227]** Транскрипция полипептида из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, например, вируса полиомы, вируса оспы кур, аденовируса (такой как аденовирус 2), вируса папилломы крупного рогатого скота, вируса саркомы птиц, цитомегаловируса, ретровируса, вируса гепатита В и обезьяньего вируса 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, промотора актина или промотора иммуноглобулина, или из промоторов белков теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клеток-хозяев.

**[00228]** Транскрипцию ДНК, кодирующей антитела по настоящему изобретению, высшими эукариотами часто усиливают путем вставки энхансерной последовательности в вектор. Многие энхансерные последовательности в настоящее время известны из генов млекопитающих (глобин, эластаза, альбумин,  $\alpha$ -фетопротеин и инсулин). Примеры включают энхансер SV40 на участке позднего начала репликации (п.н. 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы на участке позднего начала репликации и энхансеры аденовируса. *См. также Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)* для описания усиливающих элементов для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть вставлен в вектор в положении 5' или 3' по отношению к последовательности, кодирующей полипептид, но предпочтительно расположен в сайте 5' от промотора.

**[00229]** Векторы экспрессии, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (дрожжи, грибы, насекомые, растения, животные, человек или ядродержащие клетки других многоклеточных организмов), также содержат последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности, как правило, доступны из 5'- и иногда 3', нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК, кодирующей полипептид. Одним из подходящих компонентов терминации транскрипции является область полиаденилирования бычьего гормона роста.

**[00230]** Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторах, описанных в данном документе, включают клетки высших эукариот, описанные в данном документе, включая клетки-хозяева позвоночных. Размножение клеток позвоночных в культуре (тканевой культуре) стало рутинной процедурой. Примерами пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40, (COS-7, ATCC CRL 1651), линия почек эмбриона человека (293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59

(1977)); клетки почки новорожденного хомяка (ВНК, ATCC CCL 10), клетки яичника китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)), мышинные клетки Сертоли (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)), клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70), клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2), клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34), клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442), клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75), клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TR1 (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5, клетки FS4, и линия гепатомы человека (Hep G2).

**[00231]** Клетки-хозяева можно трансформировать описанными выше векторами экспрессии или клонирования для продукции антител и культивировать в обычных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

**[00232]** Клетки-хозяева, используемые для получения антител по настоящей заявке, можно культивировать в различных средах. Для культивирования клеток-хозяев подходят коммерчески доступные среды, такие как F10 Хэма (Sigma), минимальная питательная среда ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и среда Игла в модификации Дульбекко ((DMEM), Sigma). Кроме того, любая из сред, описанная в Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), патентах США №№ 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; или 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; или переиздании патента США 30985, может быть использована в качестве питательной среды для клеток-хозяев. Любая из этих сред может быть при необходимости дополнена гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния и фосфата), буферами (такими как HEPES), нуклеотиды (такие как аденозин и тимидин), антибиотики (такие как лекарственное средство GENTAMYCIN™), микроэлементы (определяемые как неорганические соединения, как правило, присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкоза или эквивалентный источник энергии. Любое другие необходимые добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, известных специалистам в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., являются такими, которые ранее использовали для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и будут очевидны обычному специалисту в данной области техники.

**[00233]** При использовании рекомбинантных методов антитела можно продуцировать внутриклеточно, в периплазматическое пространство или непосредственно секретировать в среду. Если антитело продуцируется внутриклеточно, на первом этапе частицы дебриса, будь то клетки-хозяева или лизированные фрагменты, удаляются, например, путем центрифугирования или ультрафильтрации. Когда антитело секретируется в среду, супернатанты из таких систем экспрессии, как правило, сначала концентрируют с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрирования белка, например, устройства для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеазы, такой как PMSF, может быть включен в любую из вышеупомянутых стадий для ингибирования протеолиза, а антибиотики могут быть включены для предотвращения роста случайных загрязняющих веществ.

**[00234]** Композиция антител, приготовленная из клеток, может быть очищена, например, с помощью хроматографии с гидроксипатитом, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем аффинная хроматография является типичным методом очистки. Матрица, к которой присоединен аффинный лиганд, чаще всего представляет собой агарозу, но доступны и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с заданным размером пор или поли(стирол-дивинил)бензол, обеспечивают более высокую скорость потока и позволяют сократить время обработки по сравнению с агарозой. В зависимости от антитела, которое необходимо выделить также доступны другие методы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепарин – SEPHAROSE™, хроматография на анионо- или катионообменной смоле (например, на колонке с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, ДСН-ПААГ-электрофорез и осаждение сульфатом аммония. После любой предварительной(-ых) стадии(-й) очистки смесь, содержащая представляющее интерес антитело и примеси, может быть подвергнута хроматографии с гидрофобным взаимодействием при низком рН.

**[00235]** Последовательности полинуклеиновых кислот, кодирующие антитела по настоящему изобретению, могут быть получены с использованием стандартных рекомбинантных методик. Желаемые последовательности полинуклеиновых кислот могут быть выделены и секвенированы из клеток, продуцирующих антитела, таких как гибридомные клетки. В альтернативном варианте полинуклеотиды можно синтезировать, используя синтезатор нуклеотидов или технологии ПЦР. После получения последовательности, кодирующие полипептиды, встраивают в рекомбинантный вектор, способный к репликации и экспрессии гетерологичных полинуклеотидов в прокариотических хозяевах. Многие векторы, которые известны в данной области техники,

можно использовать в целях настоящего изобретения. Выбор подходящего вектора будет зависеть главным образом от размера нуклеиновых кислот, подлежащих вставке в вектор, и конкретной клетки-хозяина, подлежащей трансформации вектором. Каждый вектор содержит различные компоненты в зависимости от его функции (амплификация или экспрессия гетерологичного полинуклеотида или и то, и другое) и его совместимости с конкретной клеткой-хозяином, в которой он находится. Компоненты вектора, как правило, включают, но не ограничиваются ими, точку начала репликации, маркерный ген селекции, промотор, сайт связывания рибосомы (RBS), сигнальную последовательность, вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты и последовательность терминации транскрипции.

**[00236]** Обычно плазмидные векторы, содержащие репликон и регуляторные последовательности, полученные из видов, совместимых с клеткой-хозяином, используются с этими хозяевами. Вектор, как правило, несет сайт репликации, а также маркирующие последовательности, которые способны обеспечить фенотипическую селекцию в трансформированных клетках. Например, *E. coli*, как правило, трансформируют с использованием pBR322, плазмиды, полученной из вида *E. coli*. Примеры производных pBR322, используемых для экспрессии определенных антител, подробно описаны в Carter *et al.*, патенте США № 5648237.

**[00237]** Кроме того, фаговые векторы, содержащие репликон и регуляторные последовательности, совместимые с микроорганизмом-хозяином, могут быть использованы в качестве трансформирующих векторов в связи с этими хозяевами. Например, бактериофаг, такой как GEM™-11, можно использовать для создания рекомбинантного вектора, который можно использовать для трансформации восприимчивых клеток-хозяев, таких как *E. coli* LE392.

**[00238]** Вектор экспрессии по настоящей заявке может содержать две или более пар промотор-цистрон, кодирующих каждый из полипептидных компонентов. Промотор представляет собой нетранслируемую регуляторную последовательность, расположенную выше (5') цистрона, которая модулирует его экспрессию. Прокариотические промоторы обычно делятся на два класса: индуцируемые и конститутивные. Индуцируемый промотор представляет собой промотор, который инициирует повышенные уровни транскрипции цистрона, находящегося под его контролем, в ответ на изменения условий культивирования, т.е. наличие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры.

**[00239]** Большое число промоторов распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами, хорошо известны. Выбранный промотор может быть функционально связан с цистронной ДНК, кодирующей данное антитело, путем удаления промотора из

исходной ДНК посредством расщепления рестрикционными ферментами и встраивания выделенной промоторной последовательности в вектор по настоящей заявке. Для прямой амплификации и/или экспрессии генов-мишеней можно использовать как нативную промоторную последовательность, так и множество гетерологичных промоторов. В некоторых вариантах осуществления используются гетерологичные промоторы, поскольку они обычно обеспечивают более высокую транскрипцию и более высокие выходы экспрессированного гена-мишени по сравнению с промотором нативного полипептида-мишени.

**[00240]** Промоторы, подходящие для использования с прокариотическими хозяевами, включают промотор PhoA, системы промоторов бета-галактамазы и лактозы, систему промоторов триптофана (*trp*) и гибридные промоторы, такие как промотор *tac* или *trc*. Однако другие промоторы, функционирующие в бактериях (например, другие известные бактериальные или фаговые промоторы), также подходят. Последовательности их нуклеиновых кислот были опубликованы, что позволяет квалифицированному специалисту оперативно лигировать их с цистронами, кодирующими целевой пептид, (Siebenlist *et al. Cell* 20: 269 (1980)) с использованием линкеров или адаптеров для обеспечения любых необходимых сайтов рестрикции.

**[00241]** В одном аспекте каждый цистрон в рекомбинантном векторе содержит компонент сигнальной последовательности секреции, который направляет транслокацию экспрессируемых полипептидов через мембрану. Как правило, сигнальная последовательность может быть компонентом вектора или частью ДНК полипептида-мишени, встроенной в вектор. Сигнальная последовательность, выбранная для целей настоящего изобретения, должна быть такой, которая распознается и процессируется (т.е. расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют сигнальные последовательности, нативные для гетерологичных полипептидов, сигнальная последовательность может быть заменена прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы, состоящей из щелочной фосфатазы, пенициллиназы, *Irr* или лидеров термостабильного энтеротоксина II (STII), *LamB*, *PhoE*, *PelB*, *OmpA* и *MVP*.

**[00242]** В некоторых вариантах осуществления продукция антител по настоящему изобретению может происходить в цитоплазме клетки-хозяина и, следовательно, не требует присутствия сигнальных последовательностей секреции в каждом цистроне. Некоторые штаммы-хозяева (например, штаммы *E. coli* *trxB*<sup>-</sup>) обеспечивают условия цитоплазмы, благоприятные для образования дисульфидных связей, тем самым обеспечивая правильный фолдинг и сборку субъединиц экспрессированного белка.

**[00243]** Прокариотические клетки-хозяева, подходящие для экспрессии антител по настоящему изобретению, включают археобактерии и эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы. Примеры полезных бактерий включают *Escherichia* (например, *E. coli*), *Bacilli* (например, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, виды *Pseudomonas* (например, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, или *Paracoccus*. В некоторых вариантах осуществления используют грамотрицательные клетки. В одном варианте осуществления клетки *E. coli* используют в качестве хозяев. Примеры штаммов *E. coli* включают штамм W3110 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; номер депонирования ATCC 27325) и его производные, включая штамм 33D3, имеющий генотип W3110 AfhuA (AtonA) ptr3 lac Iq lacL8 AompT A(nmpc-fepE) degP41 kan<sup>R</sup> (патент США № 5639635). Также подходят другие штаммы и их производные, такие как *E. coli* 294 (ATCC 31446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31,537) и *E. coli* RV308 (ATCC 31608). Эти примеры являются скорее иллюстративными, чем ограничивающими. Способы конструирования производных любой из вышеупомянутых бактерий, имеющих определенные генотипы, известны в данной области техники и описаны, например, в Bass *et al.*, *Proteins*, 8:309-314 (1990). Как правило, необходимо выбрать соответствующие бактерии, принимая во внимание реплицируемость репликона в клетках бактерии. Например, виды *E. coli*, *Serratia* или *Salmonella* могут быть подходящим образом использованы в качестве хозяина, когда для доставки репликона используются хорошо известные плазмиды, такие как pBR322, pBR325, pACYC177 или pKN410.

**[00244]** Как правило, клетка-хозяин должна секретировать минимальные количества протеолитических ферментов, и в клеточную культуру желательно включать дополнительные ингибиторы протеазы.

**[00245]** Клетки-хозяев трансформируют вышеописанными экспрессионными векторами и культивируют в традиционных питательных средах, модифицированных при необходимости для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих необходимые последовательности. Трансформация означает введение ДНК в прокариотического хозяина таким образом, чтобы ДНК могла реплицироваться либо как внехромосомный элемент, либо как хромосомный интегрант. В зависимости от используемой клетки-хозяина трансформацию проводят с использованием стандартных методов, подходящих для таких клеток. Обработка кальцием с использованием хлорида кальция обычно используется для бактериальных клеток, которые имеют значимые барьеры в виде клеточной стенки. В другом методе трансформации используется

полиэтиленгликоль/ДМСО. Еще одним используемым методом является электропорация.

**[00246]** Прокариотические клетки, используемые для получения антител по настоящей заявке, выращивают в среде, известной в данной области техники и подходящей для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры подходящих сред включают бульон Лурия (LB) с необходимыми питательными добавками. В некоторых вариантах осуществления среда также содержит агент для селекции, выбранный на основе конструкции вектора экспрессии, для избирательного обеспечения роста прокариотических клеток, содержащих вектор экспрессии. Например, ампициллин добавляют в среду для роста клеток, экспрессирующих ген устойчивости к ампициллину.

**[00247]** Любые необходимые добавки помимо источников углерода, азота и неорганических фосфатов также могут быть включены в соответствующих концентрациях, вводимых отдельно или в смеси с другой добавкой или средой, такой как комплексный источник азота. Необязательно культуральная среда может содержать один или более восстанавливающих агентов, выбранных из группы, состоящей из глутатиона, цистеина, цистамина, тиогликолята, дитиоэритрита и дитиотреитола. Прокариотические клетки-хозяева культивируют при подходящих температурах и рН.

**[00248]** Если в векторе экспрессии по настоящей заявке используется индуцируемый промотор, экспрессия белка индуцируется в условиях, подходящих для активации промотора. В одном аспекте настоящей заявки промоторы PhoA используются для регуляции транскрипции полипептидов. Соответственно, трансформированные клетки-хозяева культивируют в лимитированной по фосфату среде для индукции. Предпочтительно лимитированной по фосфату средой является среда C.R.A.P (см., например, Simmons *et al.*, *J. Immunol. Methods* 263:133-147 (2002)). Можно использовать множество других индукторов в соответствии с используемой векторной конструкцией, как известно в данной области техники.

**[00249]** Экспрессированные антитела по настоящему изобретению секретируются в периплазму клеток-хозяев и выделяются из нее. Выделение белка, как правило, включает разрушение микроорганизма, как правило, такими средствами, как осмотический шок, обработка ультразвуком или лизис. После разрушения клеток клеточный дебрис или целые клетки можно удалить путем центрифугирования или фильтрации. Белки могут быть дополнительно очищены, например, путем хроматографии на аффинной смоле. Альтернативно, белки могут быть перенесены в культуральную среду и выделены из нее. Клетки могут быть удалены из культуры, а супернатант культуры отфильтрован и сконцентрирован для дальнейшей очистки полученных белков. Экспрессированные полипептиды могут быть дополнительно выделены и идентифицированы с использованием

общеизвестных методов, таких как электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) и вестерн-блоттинг.

**[00250]** В качестве альтернативы получение белка в больших количествах осуществляют в процессе ферментации. Для производства рекомбинантных белков доступны различные процедуры периодического культивирования с подпиткой в крупных масштабах. Чтобы улучшить выход продукции и качество антител по настоящему изобретению, можно менять различные условия ферментации. Например, было показано, что белки-шапероны облегчают правильный фолдинг и растворимость гетерологичных белков, продуцируемых в бактериальных клетках-хозяевах. Chen *et al.* *J Bio Chem* 274:19601-19605 (1999); патент США № 6083715; патент США № 6027888; Bothmann and Pluckthun, *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105 (2000); Ramm and Pluckthun, *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113 (2000); Arie *et al.*, *Mol. Microbiol.* 39:199-210 (2001).

**[00251]** Чтобы свести к минимуму протеолиз экспрессированных гетерологичных белков (особенно тех, которые являются протеолитически чувствительными), для настоящего изобретения можно использовать определенные штаммы-хозяева с дефицитом по протеолитическим ферментам, как описано, например, в патенте США № 5264365; патенте США № 5508192; Hara *et al.*, *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996). Штаммы *E.coli* с дефицитом по протеолитическим ферментам и трансформированные плазмидами, сверхэкспрессирующими один или более белков-шаперонов, могут быть использованы в качестве клеток-хозяев в системе экспрессии, кодирующей антитела по настоящей заявке.

**[00252]** Антитела, полученные в соответствии с данным документом, могут быть дополнительно очищены для получения препаратов, которые являются по существу гомогенными, для дальнейших анализов и применений. Можно использовать стандартные методы очистки белка, известные в данной области техники. Следующие процедуры являются примерами подходящих процедур очистки: фракционирование на иммуноаффинных или ионообменных колонках, осаждение этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматография на силикагеле или на катионообменной смоле, такой как ДЭАЭ, хроматофокусирование, ДСН-ПААГ-электрофорез, осаждение сульфатом аммония, и гель-фильтрация с использованием, например, Sephadex G-75. Белок А, иммобилизованный на твердой фазе, например, можно использовать в некоторых вариантах осуществления для иммуноаффинной очистки связывающих молекул по настоящему изобретению. Твердая фаза, на которой иммобилизован белок А, предпочтительно представляет собой колонку, имеющую поверхность из стекла или кремнезема, более предпочтительно, стеклянную колонку с контролируемым размером пор или колонку с кремниевой кислотой. В некоторых вариантах осуществления колонка покрыта реагентом, таким как глицерин, в

попытке предотвратить неспецифическое прилипание загрязняющих веществ. Затем твердую фазу промывают для удаления загрязняющих веществ, неспецифически связанных с твердой фазой. Наконец, представляющие интерес антитела выделяют из твердой фазы путем элюирования.

#### **5.2.7. Связывающие молекулы, содержащие однодоменные антитела**

**[00253]** В другом аспекте в данном документе предложена связывающая молекула, содержащая однодоменное антитело (например, домен V<sub>H</sub>H к GUCY2C), представленное в данном документе. В дополнение к химерным антигенным рецепторам (CAR), представленным в данном документе, как описано в разделе 5.3 ниже, в некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GUCY2C, представленное в данном документе, является частью других связывающих молекул. Иллюстративные связывающие молекулы по настоящему изобретению, такие как слитые белки и иммуноконъюгаты, описаны в данном документе.

**[00254]** В различных вариантах осуществления однодоменное антитело, представленное в данном документе, может быть генетически слито или химически конъюгировано с другим агентом, например, соединениями на основе белка. Однодоменное антитело может быть химически конъюгировано с агентом или иным образом нековалентно конъюгировано с агентом. Агент может представлять собой пептид или антитело (или их фрагмент).

**[00255]** Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены однодоменные антитела (например, домены V<sub>H</sub>H), рекомбинантно слитые или химически конъюгированные (ковалентные или нековалентные конъюгации) с гетерологичным белком или полипептидом (или его фрагментом, например, с полипептидом из около 10, около 20, около 30, около 40, около 50, около 60, около 70, около 80, около 90, около 100, около 150, около 200, около 250, около 300, около 350, около 400, около 450 или около 500 аминокислот, или более 500 аминокислот) для получения слитых белков, а также их применение. В частности, в данном документе предложены слитые белки, содержащие антигенсвязывающий фрагмент однодоменного антитела, представленного в данном документе (например, CDR1, CDR2 и/или CDR3), и гетерологичный белок, полипептид или пептид.

**[00256]** Кроме того, антитела, предложенные в данном документе, также можно сливать с последовательностями маркера или «метки», таким как пептид, для облегчения очистки. В конкретных вариантах осуществления аминокислотная последовательность маркера или метки представляет собой гексагистидиновый пептид, гемагглютининовую метку («HA») и метку «FLAG».

**[00257]** Способы слияния или конъюгации компонентов (включая полипептиды) с

антителами известны (см., например, Arnon et al., Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 243-56 (Reisfeld et al. eds., 1985); Hellstrom et al., Antibodies for Drug Delivery, in Controlled Drug Delivery 623-53 (Robinson et al. eds., 2d ed. 1987); Thorpe, Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review, in Monoclonal Antibodies: Biological and Clinical Applications 475-506 (Pinchera et al. eds., 1985); Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy, in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy 303-16 (Baldwin et al. eds., 1985); Thorpe et al., Immunol. Rev. 62:119-58 (1982); патенты США №№ 5336603; 5622929; 5359046; 5349053; 5447851; 5723125; 5783181; 5908626; 5844095; и 5112946; EP 307434; EP 367166; EP 394827; публикации PCT WO 91/06570, WO 96/04388, WO 96/22024, WO 97/34631, и WO 99/04813; Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 10535-39 (1991); Traunecker et al., Nature, 331:84-86 (1988); Zheng et al., J. Immunol. 154:5590-600 (1995); и Vil et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-41 (1992)).

**[00258]** Слитые белки можно создавать, например, с помощью технологии перетасовки генов, перетасовки мотивов, перетасовки экзонов и/или перетасовки кодонов (что вместе называется «перетасовкой ДНК»). Перетасовку ДНК можно использовать для изменения активности однодоменных антител, предложенных в данном документе, включая, например, антитела с более высокой аффинностью и более низкой скоростью диссоциации (см. например, патенты США №№ 5605793; 5811238; 5830721; 5834252; и 5837458; Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33 (1997); Narayama, Trends Biotechnol. 16(2):76-82 (1998); Hansson et al., J. Mol. Biol. 287:265-76 (1999); и Lorenzo and Blasco, Biotechniques 24(2):308-13 (1998)). Антитела или кодируемые антитела можно изменять, подвергая случайному мутагенезу с помощью ПЦР с внесением ошибок, вставке случайного нуклеотида или другим способам, перед рекомбинацией. Полинуклеотид, кодирующий антитело, предложенное в данном документе, можно рекомбинировать с одним или более компонентами, мотивами, участками, частями, доменами, фрагментами и т. д. одной или более гетерологичных молекул.

**[00259]** В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело, предложенное в данном документе (например, домен V<sub>H</sub>H), конъюгируют со вторым антителом с образованием гетероконъюгата антитела.

**[00260]** В различных вариантах осуществления однодоменное антитело генетически слито с агентом. Генетическое слияние можно осуществить, поместив линкер (например, полипептид) между однодоменным антителом и агентом. Линкер может быть гибким линкером.

**[00261]** В различных вариантах осуществления однодоменное антитело генетически конъюгировано с терапевтической молекулой с шарнирной областью, связывающей однодоменное антитело с терапевтической молекулой.

**[00262]** Также в данном документе предложены способы получения различных слитых белков, представленных в данном документе. Различные методы, описанные в разделе 5.2.6 выше, также могут быть использованы для получения слитых белков, представленных в данном документе.

**[00263]** В конкретном варианте осуществления представленный в данном документе слитый белок экспрессируется рекомбинантно. Для рекомбинантной экспрессии слитого белка по настоящему изобретению может потребоваться конструирование вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, кодирующий белок или его фрагмент. Как только получен полинуклеотид, кодирующий представленный в данном документе белок, или его фрагмент, вектор для получения молекулы может быть получен с помощью технологии рекомбинантной ДНК с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. Таким образом, в данном документе описаны способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего кодирующую нуклеотидную последовательность. Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, могут быть использованы для конструирования векторов экспрессии, содержащих кодирующие последовательности и соответствующие сигналы регуляции транскрипции и трансляции. Эти способы включают, например, методы рекомбинантной ДНК *in vitro*, синтетические методы и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Также предложены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок по настоящему изобретению, или его фрагмент, или CDR, функционально связанные с промотором.

**[00264]** Вектор экспрессии можно переносить в клетку-хозяин обычными способами, а затем трансфицированные клетки культивируют обычными способами для получения слитого белка, предложенного в данном документе. Таким образом, в данном документе также предложены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий слитый белок, представленный в данном документе, или его фрагменты, функционально связанные с гетерологичным промотором.

**[00265]** Для экспрессии представленного в данном документе слитого белка можно использовать различные векторные системы экспрессии хозяина. Такие системы экспрессии хозяина представляют собой носители, с помощью которых могут быть получены и впоследствии очищены представляющие интерес кодирующие последовательности, но также представляют собой клетки, которые могут при

трансформации или трансфекции соответствующими кодирующими нуклеотидными последовательностями экспрессировать *in situ* представленный в данном документе слитый белок. Они включают, но не ограничиваются ими, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные векторами экспрессии рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими кодирующие последовательности; дрожжи (например, *Saccharomyces Pichia*), трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии дрожжей, содержащими кодирующие последовательности; системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирусом), содержащими кодирующие последовательности; системы растительных клеток, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV, вирусом табачной мозаики, TMV) или трансформированные рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, плазмидой T1), содержащими кодирующие последовательности; или системы клеток млекопитающих (например, клетки COS, CHO, ВНК, 293, NS0 и 3Т3), содержащие рекомбинантные экспрессионные конструкции, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотионеина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор 7,5 кДа вируса коровьей оспы). Бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки, особенно для экспрессии всей молекулы рекомбинантного антитела, могут быть использованы для экспрессии рекомбинантного слитого белка. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как промежуточный элемент раннего промотора гена цитомегаловируса человека, представляют собой эффективную систему экспрессии антител или их вариантов. В конкретном варианте осуществления экспрессия нуклеотидных последовательностей, кодирующих слитые белки, предложенные в данном документе, регулируется конститутивным промотором, индуцируемым промотором или тканеспецифическим промотором.

**[00266]** В бактериальных системах может быть предпочтительно выбран ряд векторов экспрессии в зависимости от предполагаемого применения экспрессируемого слитого белка. Например, когда необходимо получить большое количество такого слитого белка, для создания фармацевтических композиций слитого белка могут быть желательны векторы, которые управляют экспрессией продуктов на основе слитых белков на высоких уровнях, которые легко очищаются. Такие векторы включают, но не ограничиваются ими, вектор экспрессии *E.coli* pUR278 (Ruther *et al.*, EMBO 12:1791 (1983)), в котором

кодирующая последовательность может быть лигирована отдельно в вектор в рамке считывания с кодирующей областью *lac Z*, таким образом, что продуцируется слитый белок; векторы pIN (Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509 (1989)); и тому подобное. Векторы pGEX также можно использовать для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион-5-трансферазой (GST). В целом, такие слитые белки являются растворимыми и могут быть легко очищены из лизируемых клеток посредством абсорбции и связывания с матриксными глутатион-агарозными частицами и затем элюированы в присутствии свободного глутатиона. Векторы pGEX предназначены для включения сайтов расщепления тромбином или протеазой фактора Ха, так что клонируемый продукт гена-мишени может высвободиться из GST-фрагмента.

**[00267]** В клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать ряд систем, основанных на вирусной экспрессии. В случаях, когда в качестве вектора экспрессии используется аденовирус, представляющая интерес кодирующая последовательность может быть лигирована с комплексом регуляции транскрипции/трансляции аденовируса, например, поздним промотором и тройной лидерной последовательностью. Затем этот химерный ген может быть встроен в геном аденовируса посредством рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Вставка в несущественную область вирусного генома (например, область E1 или E3) приведет к получению рекомбинантного вируса, который является жизнеспособным и способен экспрессировать слитый белок в инфицированных хозяевах (например, см. Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:355-359 (1984)). Для эффективной трансляции вставленных кодирующих последовательностей также могут потребоваться специфические сигналы инициации. Эти сигналы включают иницирующий кодон ATG и соседние последовательности. Кроме того, иницирующий кодон должен находиться в фазе с рамкой считывания нужной кодирующей последовательности, чтобы обеспечить трансляцию всей вставки. Эти экзогенные сигналы регуляции трансляции и иницирующие кодоны могут быть различного происхождения, как природными, так и синтетическими. Эффективность экспрессии может быть повышена путем включения соответствующих энхансерных элементов транскрипции, терминаторов транскрипции и т.д. (см., например, Bittner *et al.*, *Methods in Enzymol.* 153:51-544 (1987)).

**[00268]** Кроме того, можно выбрать штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию вставленных последовательностей или модифицирует и процессирует продукт гена желаемым специфическим образом. Такие модификации (*например*, гликозилирование) и процессинг (*например*, расщепление) белковых продуктов могут быть важными для функционирования белка. Различные клетки-хозяева обладают

характерными и специфическими механизмами посттрансляционного процессинга и модификации белков и продуктов генов. Для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессируемого чужеродного белка можно выбрать подходящие линии клеток или системы хозяев. С этой целью можно использовать эукариотические клетки-хозяева, которые обладают клеточным механизмом для правильного процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования продукта гена. Такие клетки-хозяева млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, CHO, VERY, ВНК, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O и T47D, NS0 (линия клеток мышины миеломы, которая эндогенно не продуцирует любые цепи иммуноглобулина), клетки CRL7030 и HsS78Bst.

**[00269]** Для длительного производства с высоким выходом рекомбинантных белков можно использовать стабильную экспрессию. Например, могут быть сконструированы линии клеток, которые стабильно экспрессируют слитые белки. Вместо того чтобы использовать векторы экспрессии, которые содержат вирусные сайты инициации репликации, клетки-хозяева могут быть трансформированы ДНК под контролем соответствующих элементов регуляции экспрессии (*например*, промотор, энхансер, последовательности, терминаторы транскрипции, сайты полиаденилирования и *т.д.*), и селективного маркера. После введения чужеродной ДНК сконструированные клетки могут расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде с последующим переносом на селективную среду. Селектируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость в селекции и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в свои хромосомы и расти с образованием очагов, которые в свою очередь можно клонировать и размножать до линий клеток. Этот способ можно успешно использовать для создания линий клеток, которые экспрессируют слитый белок. Такие сконструированные линии клеток могут быть особенно полезны для скрининга и оценки композиций, которые прямо или косвенно взаимодействуют со связывающей молекулой.

**[00270]** Можно использовать ряд селективных систем, включая, но не ограничиваясь ими, гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler *et al.*, Cell 11:223 (1977)), гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)), и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy *et al.*, Cell 22:8-17 (1980)) можно использовать в tk-, hgp<sup>r</sup>t- или ap<sup>r</sup>t-клетках, соответственно. Кроме того, устойчивость к антиметаболитам можно использовать в качестве основы для селекции следующих генов: *dhfr*, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler *et al.*, Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980); O'Hare *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); *gpt*, который придает устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); neo, который придает устойчивость к аминогликозиду G-418 (Wu

and Wu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); and Morgan and Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); May, *TIB TECH* 11(5):155-2 15 (1993)); и *hygro*, который придает устойчивость к гигромицину (Santerre *et al.*, *Gene* 30:147 (1984)). Способы, широко известные в области методов рекомбинантной ДНК, могут применяться рутинно для селекции желаемого рекомбинантного клона, и такие способы описаны, например, в Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); и в главах 12 и 13, Dracopoli *et al.* (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981), которые полностью включены в данный документ посредством ссылки.

**[00271]** Уровень экспрессии слитого белка можно увеличить путем амплификации вектора (обзор см. в Bebbington and Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)). Когда маркер в векторной системе, экспрессирующий слитый белок, является амплифицируемым, увеличение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, приведет к увеличению числа копий маркерного гена. Поскольку амплифицированная область ассоциирована с геном слитого белка, продукция слитого белка также будет увеличиваться (Crouse *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 3:257 (1983)).

**[00272]** Клетка-хозяин может быть котрансфицирована несколькими векторами экспрессии, предложенными в данном документе. Векторы могут содержать идентичные селектируемые маркеры, которые обеспечивают равную экспрессию соответствующих кодирующих полипептидов. В качестве альтернативы можно использовать один вектор, который кодирует и способен экспрессировать несколько полипептидов. Кодирующие последовательности могут содержать кДНК или геномную ДНК.

**[00273]** Как только слитый белок, представленный в данном документе, получен путем рекомбинантной экспрессии, он может быть очищен любым способом, известным в данной области техники для очистки полипептида (например, молекулы иммуноглобулина), например, с помощью хроматографии (например, ионообменной, аффинной, в частности, по аффинности к конкретному антигену после белка А, колоночной хроматографии с распределением по размерам и аффинной хроматографии KappaSelect), центрифугирования, дифференциальной растворимости или любого другого стандартного метода очистки белков. Кроме того, представленные в данном документе молекулы слитых белков могут быть слиты с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в данном документе или иным образом известными в данной области техники,

для облегчения очистки.

**[00274]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к иммуноконъюгатам, содержащим любое из антител (таких как однодоменные антитела к GUCY2C), описанных в данном документе, конъюгированных с одним или более цитотоксическими агентами, такими как химиотерапевтические агенты или лекарственные средства, ингибирующие рост агенты, токсины (например, белковые токсины, ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или их фрагменты), или радиоактивные изотопы.

**[00275]** В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), в котором антитело конъюгировано с одним или более лекарственными средствами, включая, помимо прочего, майтанзиноид (см. патенты США №№ 5208020, 5416064 и европейский патент EP 0425235 B1); ауристин, например, молекулы монометилауристина DE и DF (MMAE и MMAF) (см. патенты США №№ 5635483 и 5780588 и 7498298); доластин; калихеамицин или его производное (см. патенты США №№ 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, и 5877296; Hinman et al., *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); и Lode et al., *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); антрациклин, такой как дауномицин или доксорубин (см. Kratz et al., *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov et al., *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King et al., *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); и патент США № 6630579); метотрексат; виндезин; таксан, такой как доцетаксел, паклитаксел, ларотаксел, тезетаксел и ортатаксел; трихотецен; и CC1065.

**[00276]** В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат включает антитело, как описано в данном документе, конъюгированное с ферментативно активным токсином или его фрагментом, включая, но не ограничиваясь ими, А-цепь дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), А-цепь рицина, А-цепь абрина, цепь модекцина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор мыльнянки лекарственной, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены.

**[00277]** В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат содержит антитело, как описано в данном документе, конъюгированное с радиоактивным атомом с образованием радиоконъюгата. Для производства радиоконъюгатов доступны различные радиоактивные изотопы. Примеры включают At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> и

радиоактивные изотопы Lu. Когда радиоконъюгат используется для обнаружения, он может содержать радиоактивный атом для скintiграфических исследований, например,  $^{99m}\text{Tc}$  или  $^{123}\text{I}$ , или спиновую метку для изображений ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (также известную как магнитно-резонансная томография, МРТ), например снова йод-123, йод-131, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

**[00278]** Конъюгаты антитела и цитотоксического агента могут быть получены с использованием различных бифункциональных агентов, связывающих белок, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио) пропионат (SPDP), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), имиотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис (п-азидобензоил) гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как 2,6-диизоцианат толуола) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин может быть получен, как описано в Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987). Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является иллюстративным хелатирующим агентом для конъюгации радионуклеотида с антителом. См. WO94/11026.

**[00279]** Линкер может быть «отщепляемым линкером», облегчая высвобождение конъюгированного агента в клетке, но неотщепляемые линкеры также предусмотрены в данном документе. Линкеры для использования в конъюгатах по настоящему изобретению включают, без ограничения, кислотолабильные линкеры (например, гидразонные линкеры), дисульфидсодержащие линкеры, чувствительные к пептидазе линкеры (например, пептидные линкеры, содержащие аминокислоты, например, валин и/или цитруллин, такой как цитруллин-валин или фенилаланин-лизин), фотолабильные линкеры, диметилловые линкеры, тиоэфирные линкеры или гидрофильные линкеры, разработанные для того, чтобы избежать опосредованной транспортером устойчивости ко многим лекарственным средствам.

**[00280]** Иммуноконъюгаты или ADC по настоящему изобретению включают конъюгаты, полученные с помощью перекрестно-линкерных реагентов, включая, помимо прочего, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB, а также SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон) бензоат), которые

являются коммерчески доступными (например, от Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A), но не ограничиваются ими.

**[00281]** В других вариантах осуществления антитела, предложенные в данном документе, конъюгированы или рекомбинантно слиты, *например*, с диагностической молекулой. Такая диагностика и обнаружение могут быть осуществлены, например, путем связывания антитела с обнаруживаемыми субстанциями, включая, помимо прочего, различные ферменты, такие как, помимо прочего, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; простетические группы, такие как, но не ограничиваясь ими, стрептавидин/биотин или авидин/биотин; флуоресцентные материалы, такие как, но не ограничиваясь ими, умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеин изотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как, но не ограничиваясь ими, люминол; биолюминесцентные материалы, такие как, но не ограничиваясь ими, люцифераза, люциферин или экворин; хемилюминесцентный материал, например, излучающий  $\gamma$ -частицы  $^{225}\text{Ac}$ , излучающий электроны Оже, излучающий  $\beta$ -частицы, излучающий альфа-частицы или излучающий позитроны радиоактивный изотоп.

### **5.3. Химерные антигенные рецепторы**

**[00282]** В другом аспекте в данном документе предложен химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий по меньшей мере одно однодоменное антитело (например, VHH), предложенное в данном документе, которое связывается с GUCY2C. Иллюстративные CAR, содержащие настоящие домены VHH (т.е. CAR на основе VHH), проиллюстрированы, и их превосходные эффекты продемонстрированы, как описано в разделе 6 ниже.

**[00283]** В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор (CAR), представленный в данном документе, содержит полипептид, содержащий: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий по меньшей мере одно однодоменное антитело (sdAb), которое специфически связывается с GUCY2C, как представлено в данном документе, и, необязательно, один или более дополнительных доменов связывания; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен. Каждый компонент и дополнительные области описаны более подробно ниже.

#### **5.3.1. Внеклеточный антигенсвязывающий домен**

**[00284]** Внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR, описанных в данном документе, содержит одно или более (например, любое из 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более) однодоменных антител. Однодоменные антитела могут быть слиты друг с другом напрямую через пептидные связи или через пептидные линкеры.

### Однодоменные антитела

**[00285]** CAR по настоящему изобретению содержат внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий одно или более однодоменных антител. sdAb могут иметь одинаковое или разное происхождение и одинаковый или разный размер. Иллюстративные sdAb включают, но не ограничиваются этим, переменные домены тяжелых цепей из состоящих только из тяжелых цепей антител (например, V<sub>HH</sub> или V<sub>NAR</sub>), связывающие молекулы, в которых естественным образом отсутствуют легкие цепи, одиночные домены (такие как V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>), полученные из традиционных 4-цепочечных антител, гуманизированные состоящие только из тяжелых цепей антитела, человеческие однодоменные антитела, вырабатываемые трансгенными мышами или крысами, экспрессирующими сегменты тяжелой цепи человека, и сконструированные домены и однодоменные каркасы, отличные от полученных из антител. Любые sdAb, известные в данной области техники или разработанные в соответствии с настоящим изобретением, включая однодоменные антитела, описанные выше в настоящем изобретении, можно использовать для конструирования CAR, описанных в данном документе. sdAb могут быть получены от любого вида, включая, но не ограничиваясь этим, мышью, крысу, человека, верблюда, ламу, миногу, рыбу, акулу, козу, кролика и крупный рогатый скот. Однодоменные антитела, рассматриваемые в данном документе, также включают природные молекулы однодоменных антител из видов, отличных от Camelidae и акул.

**[00286]** В некоторых вариантах осуществления sdAb получен из природной однодоменной антигенсвязывающей молекулы, известной как антитело на основе тяжелых цепей с отсутствием легких цепей (также называемое в данном документе «состоящим только из тяжелых цепей антителом»). Такие однодоменные молекулы описаны, например, в WO 94/04678 и Hamers-Casterman, C. *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993). В целях ясности, переменный домен, полученный из молекулы на основе тяжелых цепей с естественным отсутствием легких цепей, называется в данном документе V<sub>HH</sub>, чтобы отличать его от традиционного V<sub>H</sub> четырехцепочечных иммуноглобулинов. Такая молекула V<sub>HH</sub> может быть получена из антител, вырабатываемых у представителей вида семейства *Camelidae*, например, верблюда, ламы, викунья, дромадера, альпаки и гуанако. Другие виды, помимо верблюжьих, могут вырабатывать молекулы на основе тяжелых цепей с естественным отсутствием легких цепей, и такие V<sub>HH</sub> входят в объем настоящего изобретения. Кроме того, гуманизированные версии V<sub>HH</sub>, а также другие модификации и варианты также рассматриваются и входят в объем настоящего изобретения.

**[00287]** Молекулы V<sub>HH</sub> верблюдовых примерно в 10 раз меньше, чем молекулы IgG. Они представляют собой одиночные полипептиды и могут быть очень стабильными,

устойчивыми к экстремальным условиям pH и температуры. Более того, они могут быть устойчивыми к действию протеаз в отличие от традиционных 4-цепочечных антител. Более того, экспрессия V<sub>H</sub>H *in vitro* продуцирует правильно уложенные функциональные V<sub>H</sub>H с высоким выходом. Помимо этого, антитела, генерируемые у верблюдовых, могут распознавать эпитопы, отличные от распознаваемых антителами, генерируемыми *in vitro* путем использования библиотек антител или путем иммунизации млекопитающих, отличных от верблюдовых (смотрите, например, WO9749805). Таким образом, полиспецифические или поливалентные CAR, содержащие один или более доменов V<sub>H</sub>H, могут более эффективно взаимодействовать с мишенями, чем полиспецифические или поливалентные CAR, содержащие антигенсвязывающие фрагменты, полученные из обычных 4-цепочечных антител. Поскольку известно, что V<sub>H</sub>H связываются с «необычными» эпитопами, такими как полости или бороздки, аффинность CAR, содержащих такие V<sub>H</sub>H, может быть более подходящей для терапевтического лечения, чем у обычных полиспецифических полипептидов.

**[00288]** В некоторых вариантах осуществления sdAb получен из вариабельной области иммуноглобулина хрящевых рыб. Например, sdAb может быть получен из изоформа иммуноглобулина, известного как новый антигенный рецептор (NAR), обнаруженного в сыворотке акул. Методы получения однодоменных молекул, полученных из вариабельной области NAR («IgNAR»), описаны в WO 03/014161 и Streltsov, *Protein Sci.* 14:2901-2909 (2005).

**[00289]** В некоторых вариантах осуществления sdAb является рекомбинантным, содержащим привитые CDR, гуманизированным, верблюдизированным, деиммунизированным и/или созданным *in vitro* (например, отобранным с помощью фагового дисплея). В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность каркасных областей может быть изменена посредством «верблюдизации» конкретных аминокислотных остатков каркасных областей. Верблюдизация относится к замене или замещению одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности домена V<sub>H</sub> (природного происхождения) из традиционного 4-цепочечного антитела одним или более аминокислотными остатками, которые находятся в соответствующих положениях в домене V<sub>H</sub>H антитела, состоящего только из тяжелых цепей. Это может быть выполнено известным в данной области техники способом, который будет понятен специалисту в данной области техники. Такие «верблюдизирующие» замены предпочтительно вставляют в аминокислотные положения, которые образуют контактную поверхность V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> и/или присутствуют в ней, и/или в так называемых отличительных остатках Camelidae, как определено в данном документе, (см.,

например, WO 94/04678, Davies and Riechmann FEBS Letters 339: 285-290 (1994); Davies and Riechmann, Protein Engineering 9 (6): 531-537 (1996); Riechmann, J. Mol. Biol. 259: 957-969 (1996); и Riechmann and Muyldermans, J. Immunol. Meth. 231: 25-38 (1999)).

**[00290]** В некоторых вариантах осуществления sdAb представляет собой однодоменное антитело человека, вырабатываемое трансгенными мышами или крысами, экспрессирующими сегменты тяжелых цепей человека. См., например, US20090307787, патент США № 8754287, US20150289489, US20100122358, и WO2004049794. В некоторых вариантах осуществления sdAb имеет созревшую аффинность.

**[00291]** В некоторых вариантах осуществления природные домены VHH против конкретного антигена или мишени могут быть получены из (наивных или иммунных) библиотек последовательностей VHH верблюдовых. Такие методы могут включать или не включать скрининг такой библиотеки с использованием указанных антигена или мишени или по меньшей мере их части, фрагмента, антигенной детерминанты или эпитопа, с использованием одной или более известных в данной области техники методик скрининга. В качестве альтернативы можно использовать улучшенные синтетические или полусинтетические библиотеки, полученные из (наивных или иммунных) библиотек VHH, таких как библиотеки VHH, полученные из (наивных или иммунных) библиотек VHH с помощью таких методов, как случайный мутагенез и/или перетасовка CDR.

**[00292]** В некоторых вариантах осуществления однодоменные антитела получают из обычных четырехцепочечных антител. См., например, EP 0368684; Ward et al., Nature, 341 (6242): 544-6 (1989); Holt et al., Trends Biotechnol., 21(11):484-490 (2003); WO 06/030220; и WO 06/003388.

**[00293]** В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, представленный в данном документе, содержит по меньшей мере один связывающий домен, и по меньшей мере один связывающий домен содержит однодоменное антитело, которое связывается с GUCY2C, как предложено в данном документе, например, однодоменные антитела к GUCY2C, описанные в разделе 5.2 выше.

**[00294]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен CAR, содержащий полипептид, содержащий: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий sdAb к GUCY2C; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, где sdAb к GUCY2C представляет собой sdAb к GUCY2C, как описано в разделе 5.2 выше, включая, например, домены VHH в таблице 7 и домены, имеющие одну, две или все три CDR в любом из этих доменов VHH в таблице 7. В некоторых вариантах осуществления sdAb к GUCY2C является sdAb верблюдовых, химерным, человеческим или гуманизированным sdAb.

**[00295]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен CAR, содержащий полипептид, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий sdAb к GUCY2C; (b) трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен, где sdAb к GUCY2C включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, или SEQ ID NO: 10. В других вариантах осуществления в данном документе предложен CAR, содержащий полипептид, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий sdAb к GUCY2C; (b) трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен, где sdAb к GUCY2C включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10.

**[00296]** В других вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит два или более антигенсвязывающих домена. Среди этих двух или более антигенсвязывающих доменов по меньшей мере один представляет собой VHH, который связывается с GUCY2C, как предложено в данном документе. В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных связывающих доменов также представляют собой VHH, которые связываются с GUCY2C. В других вариантах осуществления один или более дополнительных связывающих доменов связываются с одним или более дополнительными различными антигенами, например, с 1, 2, 3, 4 или более дополнительными связывающими областями однодоменного антитела (sdAb), нацеленными на один или более дополнительных различных антигенов.

**[00297]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен поливалентный (например, двухвалентный и трехвалентный) CAR, содержащий полипептид, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий два или более однодоменных антитела (sdAb), специфически связывающихся с GUCY2C; (b) трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит два однодоменных антитела (sdAb), специфически связывающихся с GUCY2C, которые представлены в данном документе. В других вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит три однодоменных антитела (sdAb), специфически связывающихся с GUCY2C, которые представлены в данном документе. В некоторых вариантах осуществления два или более sdAb к GUCY2C выбраны из тех sdAb к GUCY2C,

описанных в разделе 5.2 выше, включая, например, домены VHH в таблице 7 и домены, имеющие одну, две или все три CDR в любом из этих доменов VHH в таблице 7. В некоторых вариантах осуществления sdAb к GUCY2C является sdAb верблюдовых, химерным, человеческим или гуманизированным sdAb. В некоторых вариантах осуществления каждое из двух или более sdAb против GUCY2C независимо выбрано из sdAb к GUCY2C, содержащих аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, или SEQ ID NO: 10.

**[00298]** В других вариантах осуществления в данном документе предложен полиспецифический (такой как биспецифический и триспецифический) CAR, содержащий полипептид, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся с GUCY2C; (b) трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит второе однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся со вторым антигеном (таким как второй опухолевый антиген). В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит второе однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся со вторым антигеном (таким как второй опухолевый антиген); и третье однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся с третьим антигеном (таким как третий опухолевый антиген).

**[00299]** В некоторых вариантах осуществления дополнительный антиген(-ы), на которые нацелены CAR по настоящему изобретению, представляют собой молекулы клеточной поверхности. Однодоменные антитела могут быть выбраны для распознавания антигена, который функционирует как маркер клеточной поверхности на клетках-мишенях, связанных с конкретным патологическим состоянием. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой опухолевый антиген. Опухоли экспрессируют ряд белков, которые могут служить антигенами-мишенями для иммунного ответа, в частности, опосредованных Т-клетками иммунных ответов. Антигены, на которые направлен CAR, могут быть антигенами одной пораженной клетки или антигенами, которые экспрессируются на разных клетках, каждая из которых способствует развитию заболевания. Антигены, на которые направлен CAR, могут быть прямо или косвенно связаны с заболеваниями. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген содержит один или более антигенных раковых эпитопов, ассоциированных со злокачественной опухолью. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген

представляет собой опухолеспецифический антиген (TSA) или опухолеассоциированный антиген (TAA). TSA является уникальным для опухолевых клеток и не появляется на других клетках в организме. Ассоциированный антиген TAA не является уникальным для опухолевой клетки и также экспрессируется на нормальных клетках в условиях, которые не могут индуцировать состояние иммунной толерантности в отношении антигена. Экспрессия антигена в опухоли может происходить в условиях, которые делают возможным ответ иммунной системы на антиген. TAA могут представлять собой антигены, которые экспрессируются на нормальных клетках во время развития плода, когда иммунная система является незрелой и неспособной проявлять ответ, или же они могут представлять собой антигены, которые обычно присутствуют на очень низких уровнях на нормальных клетках, но экспрессируются на значительно больших уровнях на опухолевых клетках.

**[00300]** В дополнение к одному или более антигенсвязывающим доменам, представленным в данном документе, CAR, представленный в данном документе, может дополнительно содержать один или более из следующих элементов: линкер (например, пептидный линкер), трансмембранный домен, шарнирную область, сигнальный пептид, внутриклеточный сигнальный домен, костимулирующий сигнальный домен, каждый из которых более подробно описан ниже.

**[00301]** Например, в некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен включает костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен получены от CD137. В некоторых вариантах осуществления CAR к GUCY2C дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления CAR к GUCY2C дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит от N-конца к С-концу: сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен

CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный от CD137 (4-1BB) и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ . В некоторых конкретных вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению содержит от N-конца к C-концу: сигнальный пептид CD8, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47, внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий одно или более sdAb, представленных в данном документе, шарнир CD8, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, трансмембранную область CD8, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, костимулирующий сигнальный домен 4-1BB, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44 и внутриклеточный сигнальный домен CD3 $\zeta$ , включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления CAR к GUCY2C является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления CAR к GUCY2C является моновалентным. В других вариантах осуществления CAR к GUCY2C является поливалентным.

### 5.3.2. Сигнальный пептид

**[00302]** CAR по настоящему изобретению могут содержать сигнальный пептид (также известный как сигнальная последовательность) на N-конце полипептида. В общем случае сигнальные пептиды представляют собой пептидные последовательности, которые нацеливают полипептид на необходимый сайт в клетке. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид нацеливает эффекторную молекулу на секреторный путь клетки и обеспечивает интеграцию и закрепление эффекторной молекулы в липидном бислое. Сигнальные пептиды, включая сигнальные последовательности белков природного происхождения или синтетические неприродные сигнальные последовательности, которые совместимы для применения с CAR, описанными в данном документе, известны специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид получен из молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ ,  $\alpha$ -рецептора GM-CSF и тяжелой цепи IgG1. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид получен из CD8 $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид CD8 $\alpha$  включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47.

### 5.3.3. Шарнирная область

**[00303]** CAR по настоящему изобретению могут содержать шарнирный домен, расположенный между внеклеточным антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом. Шарнирный домен представляет собой аминокислотный сегмент, который обычно находится между двумя доменами белка и может обеспечить гибкость белка и перемещение одного или обоих доменов относительно друг друга. Можно использовать

любую аминокислотную последовательность, которая обеспечивает такую гибкость и перемещение внеклеточного антигенсвязывающего домена относительно трансмембранного домена эффекторной молекулы.

**[00304]** Шарнирный домен может содержать около 10-100 аминокислот, например, около 15-75 аминокислот, 20-50 аминокислот или 30-60 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен может иметь длину по меньшей мере около 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75 аминокислот.

**[00305]** В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой шарнирный домен белка природного происхождения. Шарнирные домены любого белка, известного в данной области техники, содержащие шарнирный домен, совместимы для применения в химерных рецепторах, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен является по меньшей мере частью шарнирного домена белка природного происхождения и обеспечивает гибкость химерного рецептора. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен получен из CD8 $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой часть шарнирного домена CD8 $\alpha$ , например, фрагмент, содержащий по меньшей мере 15 (например, 20, 25, 30, 35 или 40) последовательных аминокислот шарнирного домена CD8 $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен CD8 $\alpha$  включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43.

**[00306]** Шарнирные домены антител, таких как антитела IgG, IgA, IgM, IgE или IgD, также совместимы для применения в pH-зависимых системах химерных рецепторов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен представляет собой шарнирный домен, который соединяет константные домены CH1 и CH2 антитела. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен происходит из антитела и включает шарнирный домен антитела и одну или более константных областей антитела. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит шарнирный домен антитела и константную область CH3 антитела. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен содержит шарнирный домен антитела и константные области CH2 и CH3 антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG, IgA, IgM, IgE или IgD. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит шарнирную область и константные области CH2 и CH3 антитела IgG1. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит шарнирную область и

константную область СНЗ антитела IgG1.

[00307] Не встречающиеся в природе пептиды также могут быть применимы в качестве шарнирных доменов для химерных рецепторов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен между С-концом внеклеточного лиганд-связывающего домена Fc-рецептора и N-концом трансмембранного домена представляет собой пептидный линкер, такой как линкер (GxS)<sub>n</sub>, где x и n могут независимо представлять собой целое число от 3 до 12, включая 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более.

#### 5.3.4. Трансмембранный домен

[00308] CAR по настоящему изобретению содержат трансмембранный домен, который может быть прямо или косвенно слит с внеклеточным антигенсвязывающим доменом. Трансмембранный домен может быть получен либо из природного, либо из синтетического источника. В контексте данного документа «трансмембранный домен» относится к любой белковой структуре, термодинамически стабильный в клеточной мембране, предпочтительно в эукариотической клеточной мембране. Трансмембранные домены, совместимые для использования в описанных в данном документе CAR, могут быть получены из природного белка. Альтернативно, он может представлять собой синтетический не встречающийся в природе сегмент белка, *например сегмент гидрофобного белка*, который является термодинамически стабильным в клеточной мембране.

[00309] Трансмембранные домены классифицируются на основе трехмерной структуры трансмембранного домена. Например, трансмембранные домены могут образовывать альфа-спирали, комплекс из более чем одной альфа-спирали, бета-бочки или любую другую стабильную структуру, способную охватывает фосфолипидный бислой клетки. Кроме того, трансмембранные домены также или альтернативно могут быть классифицированы на основе топологии трансмембранного домена, включая количество проходов через мембрану трансмембранного домена и ориентации белка. Например, белки, пронизывающие мембрану один раз, пересекают клеточную мембрану один раз, а белки, пронизывающие мембрану множество раз, пересекают клеточную мембрану по меньшей мере дважды (*например, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более раз*). Мембранные белки могут быть определены как белки типа I, типа II или типа III в зависимости от топологии их концов и мембранопронизывающего сегмента(-ов) относительно внутренней и внешней части клетки. Мембранные белки типа I имеют одну трансмембранную область и ориентированы таким образом, что N-конец белка находится на внеклеточной стороне липидного бислоя клетки, а С-конец белка находится на цитоплазматической стороне. Мембранные белки типа II также имеют одну трансмембранную область, но ориентированы таким образом, что

С-конец белка находится на внеклеточной стороне липидного бислоя клетки, а N-конец белка находится на цитоплазматической стороне. Мембранные белки типа III имеют несколько трансмембранных сегментов и могут быть дополнительно разделены на подклассы на основании числа трансмембранных сегментов и расположения N- и С-концов.

**[00310]** В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR, описанный в данном документе, получен из пронизывающего мембрану один раз белка типа I. В некоторых вариантах осуществления трансмембранные домены белков, пронизывающих мембрану множество раз, также могут быть совместимы для применения в CAR, описанных в данном документе. Белки, пронизывающие мембрану несколько раз, могут содержать комплекс (по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более) альфа-спиралей или бета-складчатую структуру. В некоторых вариантах осуществления N-конец и С-конец белка, пронизывающего мембрану несколько раз, находятся с противоположных сторон липидного бислоя, например, N-конец белка находится с цитоплазматической стороны липидного бислоя, а С-конец белка находится с внеклеточной стороны.

**[00311]** В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR включает трансмембранный домен, выбранный из трансмембранного домена альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD160, CD19, IL-2R-бета, IL-2R-гамма, IL-7R а, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, и/или NKG2C. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен получен из молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1.

**[00312]** В некоторых конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен получен из CD8 $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44.

**[00313]** Трансмембранные домены для применения в CAR, описанных в данном документе, также могут содержать по меньшей мере часть синтетического, неприродного белкового сегмента. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен

представляет собой синтетическую неприродную альфа-спираль или бета-лист. В некоторых вариантах осуществления белковый сегмент содержит по меньшей мере приблизительно 20 аминокислот, *например*, по меньшей мере 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более аминокислот. Примеры синтетических трансмембранных доменов известны в данной области техники, например, в патенте США № 7052906 и публикации PCT № WO 2000/032776, соответствующие описания которых включены в данный документ посредством ссылки.

**[00314]** Предложенный в данном документе трансмембранный домен может содержать трансмембранную область и цитоплазматическую область, расположенную на С-концевой стороне трансмембранного домена. Цитоплазматическая область трансмембранного домена может содержать три или более аминокислот и, в некоторых вариантах осуществления, помогает ориентировать трансмембранный домен в липидном бислое. В некоторых вариантах осуществления в трансмембранной области трансмембранного домена находятся один или более остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления в цитоплазматической области трансмембранного домена находятся один или более остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматическая область трансмембранного домена содержит положительно заряженные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматическая область трансмембранного домена содержит аминокислоты аргинин, серин и лизин.

**[00315]** В некоторых вариантах осуществления трансмембранная область трансмембранного домена содержит гидрофобные аминокислотные остатки. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR по настоящему изобретению содержит искусственную гидрофобную последовательность. Например, на С-конце трансмембранного домена может находиться триплет из фенилаланина, триптофана и валина. В некоторых вариантах осуществления трансмембранная область содержит в основном гидрофобные аминокислотные остатки, такие как аланин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан или валин. В некоторых вариантах осуществления трансмембранная область является гидрофобной. В некоторых вариантах осуществления трансмембранная область содержит поли-лейцин-аланиновую последовательность. Гидропатичность или гидрофобные или гидрофильные характеристики белка или белкового сегмента можно оценивать любым способом, известным в данной области техники, например, с помощью анализа гидропатичности Кайта — Дулиттла.

### **5.3.5. Внутриклеточный сигнальный домен**

**[00316]** CAR по настоящему изобретению содержат внутриклеточный сигнальный домен. Внутриклеточный сигнальный домен отвечает за активацию по меньшей мере одной из

нормальных эффекторных функций иммунной эффекторной клетки, экспрессирующей CAR. Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность или хелперную активность, в том числе секрецию цитокинов. Таким образом, термин «цитоплазматический сигнальный домен» относится к части белка, которая передает сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение специализированной функции. Хотя обычно можно использовать целый цитоплазматический сигнальный домен, во многих случаях не обязательно использовать новую цепь. В случае применения усеченной части цитоплазматического сигнального домена, такую усеченную часть можно использовать вместо интактной цепи при условии, что она передает сигнал эффекторной функции. Таким образом, это означает, что термин «цитоплазматический сигнальный домен» представляет собой включает любую усеченную часть цитоплазматического сигнального домена, достаточную для передачи сигнала эффекторной функции.

**[00317]** В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, состоящий по существу из первичного внутриклеточного сигнального домена иммунной эффекторной клетки. «Первичный внутриклеточный сигнальный домен» относится к цитоплазматической сигнальной последовательности, которая действует стимулирующим образом, индуцируя иммунные эффекторные функции. В некоторых вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив, или ITAM. В контексте данного документа термин «ITAM» представляет собой консервативный белковый мотив, который обычно присутствует в хвостовой части сигнальных молекул, экспрессируемых во многих иммунных клетках. Мотив может содержать два повтора аминокислотной последовательности  $YxxL/I$ , разделенные 6-8 аминокислотами, где каждый  $x$  независимо представляет собой любую аминокислоту, продуцируя консервативный мотив  $YxxL/Ix(6-8)YxxL/I$ . ITAM в сигнальных молекулах важны для сигнальной трансдукции в клетке, которая опосредуется, по крайней мере частично, фосфорилированием остатков тирозина в ITAM после активации сигнальной молекулы. ITAM могут также функционировать как стыковочные сайты для других белков, участвующих в сигнальных путях. Примеры первичных цитоплазматических сигнальных последовательностей, содержащих ITAM, включают последовательности, полученные из CD3 $\zeta$ , FcR-гамма (FCER1G), FcR-бета (Fc-эпсилон Rib), CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-

эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

**[00318]** В некоторых вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен состоит из цитоплазматического сигнального домена CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен представляет собой цитоплазматический сигнальный домен из CD3 $\zeta$  дикого типа. В некоторых вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен CD3 $\zeta$  включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен CD3 $\zeta$  дикого типа. В некоторых вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен представляет собой функциональный мутант цитоплазматического сигнального домена CD3 $\zeta$ , содержащий одну или более мутаций, таких как Q65K.

### **5.3.6. Костимулирующий сигнальный домен**

**[00319]** Многие иммунные эффекторныe клетки требуют костимуляции, в дополнение к стимуляции антигенспецифическим сигналом, для стимулирования пролиферации, дифференциации и выживания клеток, а также для активации эффекторных функций клетки. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит по меньшей мере один костимулирующий сигнальный домен. В контексте данного документа термин «костимулирующий сигнальный домен» относится к по меньшей мере части белка, который опосредует трансдукцию сигнала в клетке для индукции иммунного ответа, такого как эффекторная функция. Костимулирующий сигнальный домен химерного рецептора, описанного в данном документе, может представлять собой цитоплазматический сигнальный домен из костимулирующего белка, который трансдуцирует сигнал и модулирует ответы, опосредованные иммунными клетками, такими как Т-клетки, НК-клетки, макрофаги, нейтрофилы или эозинофилы. «Костимулирующий сигнальный домен» может представлять собой цитоплазматическую часть костимулирующей молекулы. Термин «костимулирующая молекула» относится к известному партнеру по связыванию на иммунной клетке (такой как Т-клетка), который специфически связывается с костимулирующим лигандом, тем самым опосредуя костимулирующий ответ иммунной клетки, такой как, но не ограничиваясь, пролиферация и выживаемость.

**[00320]** В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит один костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит два или более (например, около 2, 3, 4 или более) костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах

осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит два или более одинаковых костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит два или более костимулирующих сигнальных доменов из различных костимулирующих белков, таких как любые два или более костимулирующих белков, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен (такой как цитоплазматический сигнальный домен CD3 $\zeta$ ) и один или более костимулирующих сигнальных доменов. В некоторых вариантах осуществления один или более костимулирующих сигнальных доменов и первичный внутриклеточный сигнальный домен (такой как цитоплазматический сигнальный домен CD3 $\zeta$ ) сливаются друг с другом посредством необязательных пептидных линкеров. Первичный внутриклеточный сигнальный домен и один или более костимулирующих сигнальных доменов могут быть расположены в любом подходящем порядке. В некоторых вариантах осуществления один или более костимулирующих сигнальных доменов расположены между трансмембранным доменом и первичным внутриклеточным сигнальным доменом (таким как цитоплазматический сигнальный домен CD3 $\zeta$ ). Несколько костимулирующих сигнальных доменов могут обеспечивать аддитивные или синергетические стимулирующие эффекты.

**[00321]** Активация костимулирующего сигнального домена в клетке-хозяине (*например*, иммунной клетке) может индуцировать клетку к увеличению или уменьшению продукции и секреции цитокинов, фагоцитарных свойств, пролиферации, дифференциации, выживания и/или цитотоксичности. Костимулирующий сигнальный домен любой костимулирующей молекулы может быть совместим для применения в CAR, описанных в данном документе. Тип(-ы) костимулирующего сигнального домена выбирают на основе таких факторов, как тип иммунных эффекторных клеток, в которых будут экспрессироваться эффекторные молекулы (*например*, Т-клетки, НК-клетки, макрофаги, нейтрофилы или эозинофилы), и желаемая иммунная эффекторная функция (*например*, эффект АЗКЦ). Примерами костимулирующих сигнальных доменов для использования в CAR могут быть цитоплазматические сигнальные домены из костимулирующих белков, включая, помимо прочего, члены семейства B7/CD28 (*например*, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BTLA/CD272, CD28, CTLA-4, Gi24/VISTA/B7-H5, ICOS/CD278, PD-1, PD-L2/B7-DC, и PDCD6); члены суперсемейства TNF (*например*, 4-1BB/TNFSF9/CD137, лиганд 4-1BB /TNFSF9, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BAFF R/TNFRSF13C, CD27/TNFRSF7, лиганд CD27/TNFSF7, CD30/TNFRSF8, лиганд CD30/TNFSF8, CD40/TNFRSF5, CD40/TNFSF5, лиганд CD40/TNFSF5, DR3/TNFRSF25,

GITR/TNFRSF18, лиганд GITR/TNFSF18, HVEM/TNFRSF14, LIGHT/TNFSF14, лимфотоксин-альфа/TNF-бета, OX40/TNFRSF4, лиганд OX40/TNFSF4, RELT/TNFRSF19L, TACI/TNFRSF13B, TL1A/TNFSF15, TNF-альфа, и TNF RII/TNFRSF1B); члены суперсемейства SLAM (например, 2B4/CD244/SLAMF4, BLAME/SLAMF8, CD2, CD2F-10/SLAMF9, CD48/SLAMF2, CD58/LFA-3, CD84/SLAMF5, CD229/SLAMF3, CRACC/SLAMF7, NTB-A/SLAMF6, и SLAM/CD150); и любые другие костимулирующие молекулы, такие как CD2, CD7, CD53, CD82/Kai-1, CD90/Thy1, CD96, CD160, GUCY2C0, CD300a/LMIR1, HLA Class I, HLA-DR, Ikaros, интегрин-альфа 4/CD49d, интегрин-альфа 4 бета 1, интегрин-альфа 4 бета 7/LPAM-1, LAG-3, TCL1A, TCL1B, CRTAM, DAP12, Dectin-1/CLEC7A, DPPIV/CD26, EphB6, TIM-1/KIM-1/HAVCR, TIM-4, TSLP, TSLP R, ассоциированный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), и NKG2C.

**[00322]** В некоторых вариантах осуществления один или более костимулирующих сигнальных доменов выбраны из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, ассоциированного с функцией лимфоцитов антигена-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганды, которые специфически связываются с CD83.

**[00323]** В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен в CAR по настоящему изобретению содержит костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137 (т.е. 4-1BB). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит цитоплазматический сигнальный домен CD3 $\zeta$  и костимулирующий сигнальный домен CD137. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий сигнальный домен CD137, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45.

**[00324]** Также в объем настоящего изобретения входят варианты любого из костимулирующих сигнальных доменов, описанных в данном документе, так что костимулирующий сигнальный домен способен модулировать иммунный ответ иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления костимулирующие сигнальные домены содержат до 10 вариаций аминокислотных остатков (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 8) по сравнению с аналогом дикого типа. Такие костимулирующие сигнальные домены, содержащие одну или более аминокислотных вариаций, могут называться вариантами. Мутация аминокислотных остатков костимулирующего сигнального домена может приводить к усилению сигнальной трансдукции и усилению стимуляции иммунных ответов по сравнению с костимулирующими сигнальными доменами, которые не содержат мутации. Мутация аминокислотных остатков костимулирующего сигнального домена может приводить к уменьшению сигнальной трансдукции и снижению стимуляции

иммунных ответов по сравнению с костимулирующими сигнальными доменами, которые не содержат мутации.

### 5.3.7. Пептидные линкеры

**[00325]** Различные однодоменные антитела в описанных в данном документе полиспецифических или поливалентных CAR могут быть слиты друг с другом посредством пептидных линкеров. В некоторых вариантах осуществления однодоменные антитела непосредственно слиты друг с другом без каких-либо пептидных линкеров. Пептидные линкеры, соединяющие разные однодоменные антитела (например, VHH), могут быть одинаковыми или разными. Различные домены CAR также могут быть слиты друг с другом через пептидные линкеры.

**[00326]** Каждый пептидный линкер в CAR может иметь одинаковую или разную длину и/или последовательность в зависимости от структурных и/или функциональных особенностей однодоменных антител и/или различных доменов. Каждый пептидный линкер может быть выбран и оптимизирован независимо. Длина, степень гибкости и/или другие свойства пептидного(-ых) линкера(-ов), используемых в CAR, могут иметь некоторое влияние на свойства, включая, но не ограничиваясь этим, аффинность, специфичность или авидность в отношении одного или более конкретных антигенов или эпитопов. Например, можно выбрать более длинные пептидные линкеры, чтобы гарантировать, что два соседних домена не будут оказывать стерических препятствий друг другу. В некоторых вариантах осуществления короткий пептидный линкер может быть расположен между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом CAR. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит гибкие остатки (такие как глицин и серин), так что соседние домены могут свободно перемещаться относительно друг друга. Например, подходящим пептидным линкером может быть глицин-сериновый дублет.

**[00327]** Пептидный линкер может иметь любую подходящую длину. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер имеет длину по меньшей мере около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 и более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер имеет длину не более чем около 100, 75, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или менее аминокислот. В некоторых вариантах осуществления длина пептидного линкера составляет от около 1 аминокислоты до около 10 аминокислот, от около 1 аминокислоты до около 20 аминокислот, от около 1 аминокислоты до около 30 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 15 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 25 аминокислот, от около 5 аминокислот до около 30 аминокислот, от около 10 аминокислот до около 30

аминокислот, от около 30 аминокислот до около 50 аминокислот, от около 50 аминокислот до около 100 аминокислот или от около 1 аминокислоты до около 100 аминокислот.

**[00328]** Пептидный линкер может иметь природную последовательность или неприродную последовательность. Например, в качестве линкера можно использовать последовательность, полученную из шарнирной области антител, состоящих только из тяжелых цепей. См., например, WO1996/34103. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой гибкий линкер. Примеры гибких линкеров включают, но не ограничиваются ими, глициновые полимеры, глицин-сериновые полимеры, глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники.

**[00329]** Другие линкеры, известные в данной области техники, например, как описано в WO2016014789, WO2015158671, WO2016102965, US20150299317, WO2018067992, US7741465, Colcher *et al.*, *J. Nat. Cancer Inst.* 82:1191-1197 (1990), и Bird *et al.*, *Science* 242:423-426 (1988), также могут быть включены в представленные в данном документе CAR, описание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки.

### **5.3.8. Иллюстративные CAR**

**[00330]** Иллюстративные моновалентные CAR получают, как показано в разделе 6 ниже, такие как C8-CAR, C12-CAR, C13-CAR, C15-CAR, C21-CAR, C27-CAR, C30-CAR и C31-CAR.

**[00331]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен CAR, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48.

**[00332]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен CAR, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 49.

**[00333]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен CAR, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50.

**[00334]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен CAR, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51.

**[00335]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен CAR, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52.

**[00336]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен CAR, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53.

**[00337]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен CAR, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54.

**[00338]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен CAR, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 55.

**[00339]** В определенных вариантах осуществления CAR, представленный в данном документе, включает аминокислотные последовательности с определенным процентом идентичности по отношению к любому из CAR, приведенных в качестве примеров в Разделе 6 ниже.

**[00340]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен CAR к GUCY2C, содержащий полипептид, имеющий по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 48.

**[00341]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен CAR к GUCY2C, содержащий полипептид, имеющий по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 49.

**[00342]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен CAR к GUCY2C, содержащий полипептид, имеющий по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 50.

**[00343]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен CAR к GUCY2C, содержащий полипептид, имеющий по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 51.

**[00344]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен CAR к GUCY2C, содержащий полипептид, имеющий по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 52.

**[00345]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен CAR к GUCY2C, содержащий полипептид, имеющий по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 53.

**[00346]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен CAR к GUCY2C, содержащий полипептид, имеющий по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 54.

**[00347]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен CAR к GUCY2C, содержащий полипептид, имеющий по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности

последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 55.

[00348] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любой из CAR к GUCY2C, представленных в данном документе. Более подробное описание последовательностей нуклеиновых кислот и векторов представлено ниже.

#### **5.4. Сконструированные иммунные эффекторные клетки**

[00349] В еще одном аспекте в данном документе предложены клетки-хозяева (такие как иммунные эффекторные клетки), содержащие любой из CAR, описанных в данном документе.

[00350] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая CAR, который содержит полипептид, содержащий: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий одно или более sdAb к GUCY2C; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, где sdAb к GUCY2C представляет собой sdAb к GUCY2C, как описано в разделе 5.2 выше, включая, например, домены VHH из таблицы 7 и домены, имеющие одну, две или все три CDR в любом из этих доменов VHH из таблицы 7. В частности, в некоторых вариантах осуществления sdAb к GUCY2C в CAR сконструированной иммунной эффекторной клетки по настоящему изобретению содержит (i) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35; (ii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36; (iii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; (iv) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; (v) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; (vi) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; и CDR3, включающую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; (vii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; или (viii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления sdAb к GUCY2C является sdAb верблюдовых, химерным, человеческим или гуманизированным sdAb. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен выбран из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен включает костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит от N-конца к С-концу: сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ .

**[00351]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая CAR, который содержит полипептид, содержащий: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий одно или более sdAb к GUCY2C; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, где sdAb к GUCY2C включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления

в данном документе предложена сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая CAR, который содержит полипептид, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий одно или более sdAb к GUCY2C; (b) трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен, где sdAb к GUCY2C включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен выбран из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен включает костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит от N-конца к С-концу: сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ .

**[00352]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая CAR, который включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая CAR, который содержит полипептид, имеющий по меньшей мере 75%,

80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 55.

**[00353]** В других вариантах осуществления предложена сконструированная иммунная эффекторная клетка (такая как Т-клетка), содержащая полиспецифический (такой как биспецифический или триспецифический) химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий полипептид, содержащий: (а) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий первое однодоменное антитело (sdAb), специфически связывающееся с GUCY2C и одним или более дополнительными антигенсвязывающими доменами; (b) трансмембранный домен; и (с) внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления первое sdAb и/или дополнительное sdAb является sdAb верблюдовых, химерным, человеческим или гуманизированным sdAb. В некоторых вариантах осуществления первое однодоменное антитело и дополнительное однодоменное антитело сливаются друг с другом посредством пептидной связи или пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер имеет длину не более около 50 (например, не более около 35, 25, 20, 15, 10, или 5) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен выбран из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка). В некоторых вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен получен из CD3 $\zeta$ . В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен включает костимулирующий сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления полиспецифический CAR дополнительно содержит шарнирный домен (такой как шарнирный домен CD8 $\alpha$ ), расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления полиспецифический CAR дополнительно содержит сигнальный пептид (такой как сигнальный пептид CD8 $\alpha$ ), расположенный на N-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит от N-конца к С-концу: сигнальный пептид CD8 $\alpha$ , внеклеточный антигенсвязывающий домен, шарнирный домен

CD8 $\alpha$ , трансмембранный домен CD8 $\alpha$ , костимулирующий сигнальный домен, полученный из CD137, и первичный внутриклеточный сигнальный домен, полученный из CD3 $\zeta$ .

[00354] В некоторых вариантах осуществления сконструированная иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, мононуклеарную клетку периферической крови (РВМС), гемопоэтическую стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления сконструированная иммунная эффекторная клетка является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления сконструированная иммунная эффекторная клетка является аллогенной.

[00355] Также предложены сконструированные иммунные эффекторные клетки, содержащие (или экспрессирующие) два или более различных CAR. Любые два или более из описанных в данном документе CAR могут быть экспрессированы в комбинации. CAR могут нацеливаться на разные антигены, тем самым обеспечивая синергетические или аддитивные эффекты. Два или более CAR могут быть закодированы в одном и том же векторе или в разных векторах.

[00356] Сконструированная иммунная эффекторная клетка может дополнительно экспрессировать один или более терапевтических белков и/или иммуномодуляторов, таких как ингибиторы иммунных контрольных точек. См., например, международные патентные заявки №№ PCT/CN2016/073489 и PCT/CN2016/087855, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

#### 5.4.1. Векторы

[00357] Настоящее раскрытие обеспечивает векторы для клонирования и экспрессии любого из описанных в данном документе CAR. В некоторых вариантах осуществления вектор подходит для репликации и интеграции в эукариотических клетках, таких как клетки млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. Примеры вирусных векторов включают, но не ограничиваются этим, аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, лентивирусные векторы, ретровирусные векторы, вектор на основе вируса осповакцины, вектор на основе вируса простого герпеса и их производные. Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области техники и описана, например, в Sambrook *et al.* (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), и других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии.

[00358] Для переноса генов в клетки млекопитающих был разработан ряд вирусных систем. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. Гетерологичную нуклеиновую кислоту можно вставлять в вектор и упаковывать в

ретровирусные частицы, используя известные в данной области техники методики. Затем рекомбинантный вирус можно выделять и доставлять в сконструированные клетки млекопитающих *in vitro* или *ex vivo*. В данной области техники известен ряд ретровирусных систем. В некоторых вариантах осуществления используют аденовирусные векторы. В данной области техники известен ряд аденовирусных векторов. В некоторых вариантах осуществления используют лентивирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления используют самоинактивирующиеся лентивирусные векторы. Например, самоинактивирующиеся лентивирусные векторы, несущие последовательность, кодирующую иммуномодулятор (такой как ингибитор контрольной точки иммунного ответа), и/или самоинактивирующиеся лентивирусные векторы, несущие химерные антигенные рецепторы, могут быть упакованы по протоколам, известным в данной области техники. Полученные лентивирусные векторы можно использовать для трансдукции клеток млекопитающих (таких как первичные Т-клетки человека) с использованием методов, известных в данной области техники. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются подходящими инструментами для достижения долгосрочного переноса генов, поскольку они обеспечивают долгосрочную стабильную интеграцию трансгена и его размножение в клетках-потомках. Лентивирусные векторы также обладают низкой иммуногенностью и могут трансдуцировать непролиферирующие клетки.

**[00359]** В некоторых вариантах осуществления вектор содержит любую из нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, описанный в данном документе. Нуклеиновую кислоту можно клонировать в вектор, используя любые известные в данной области техники методы молекулярного клонирования, включая, например, использование сайтов рестрикционной эндонуклеазы и один или более селективных маркеров. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота функционально связана с промотором. Были исследованы различные промоторы для экспрессии генов в клетках млекопитающих, и любой из промоторов, известных в данной области техники, может быть использован в настоящем изобретении. Промоторы можно в общих чертах отнести к категориям конститутивных промоторов или регулируемых промоторов, таких как индуцибельные промоторы.

**[00360]** В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, функционально связана с конститутивным промотором. Конститутивные промоторы обеспечивают возможность конститутивной экспрессии генов (также называемых трансгенами) в клетках-хозяевах. Иллюстративные конститутивные промоторы, рассматриваемые в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, промоторы цитомегаловируса (CMV), факторы элонгации человека-1 альфа (hEF1 $\alpha$ ), промотор

убиквитина С (UbiC), промотор фосфоглицерокиназы (PGK), ранний промотор обезьяньего вируса 40 (SV40) и промотор куриного  $\beta$ -актина в сочетании с ранним энхансером CMV (CAGG). В большом числе исследований проводили широкое сравнение эффективности таких конститутивных промоторов в отношении управления экспрессией трансгена. Например, в Michael C. Milone *et al* приведено сравнение эффективности CMV, hEF1 $\alpha$ , UbiC и PGK в отношении управления экспрессией химерного антигенного рецептора в первичных человеческих Т-клетках и сделано заключение, что промотор hEF1 $\alpha$  не только индуцировал наивысший уровень экспрессии трансгена, но также оптимальным образом сохранялся в CD4 и CD8 человеческих Т-клетках (Molecular Therapy, 17(8): 1453-1464 (2009)). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, функционально связана с промотором hEF1 $\alpha$ .

**[00361]** В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, функционально связана с индуцируемым промотором. Индуцибельные промоторы относятся к категории регулируемых промоторов. Индуцибельный промотор может быть индуцирован одним или более условиями, такими как физические условия, микроокружение сконструированной иммунной эффекторной клетки или физиологические условия сконструированной иммунной эффекторной клетки, индуктором (т. е. индуцирующим агентом) или их комбинацией.

**[00362]** В некоторых вариантах осуществления индуцирующие условия не индуцирует экспрессию эндогенных генов в сконструированной клетке млекопитающего и/или в организме субъекта, который получает фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления индуцирующие условия выбирают из группы, состоящей из индуктора, излучения (например, ионизирующего излучения, света), температуры (например, нагрева), окислительно-восстановительного статуса, опухолевого окружения и состояния активации сконструированной клетки млекопитающего.

**[00363]** В некоторых вариантах осуществления вектор также содержит селективный маркерный ген или репортерный ген для отбора клеток, экспрессирующих CAR, из популяции клеток-хозяев, трансфицированных лентивирусными векторами. Как гены селективных маркеров, так и репортерные гены могут фланкироваться подходящими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Например, вектор может содержать терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, пригодные для регуляции экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот.

**[00364]** В некоторых вариантах осуществления вектор содержит более одной нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит

нуклеиновую кислоту, содержащую первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый CAR, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй CAR, при этом первая нуклеиновая кислота функционально связана со второй нуклеиновой кислотой через третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую саморасщепляющийся пептид. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид выбран из группы, состоящей из T2A, P2A и F2A.

#### **5.4.2. Иммунные эффекторныe клетки**

**[00365]** «Иммунные эффекторныe клетки» представляют собой иммунные клетки, которые могут выполнять иммунные эффекторныe функции. В некоторых вариантах осуществления иммунные эффекторныe клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и выполняют эффекторную функцию АЗКЦ. Примеры иммунных эффекторных клеток, которые опосредуют АЗКЦ, включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMNC), натуральные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки, нейтрофилы и эозинофилы.

**[00366]** В некоторых вариантах осуществления иммунные эффекторныe клетки представляют собой Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки являются CD4+/CD8-, CD4-/CD8+, CD4+/CD8+, CD4-/CD8-, или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки продуцируют IL-2, TFN и/или TNF при экспрессии CAR и связывании с клетками-мишенями, такими как GUCY2C+ опухолевые клетки. В некоторых вариантах осуществления CD8+ Т-клетки лизируют антигенспецифические клетки-мишени при экспрессии CAR и связывании с клетками-мишенями.

**[00367]** В некоторых вариантах осуществления иммунные эффекторныe клетки представляют собой NK-клетки. В других вариантах осуществления иммунные эффекторныe клетки могут быть стабильными линиями клеток, например, клетками NK-92.

**[00368]** В некоторых вариантах осуществления иммунные эффекторныe клетки дифференцируются из стволовой клетки, такой как гемопоэтическая стволовая клетка, плюрипотентная стволовая клетка, iPS или эмбриональная стволовая клетка.

**[00369]** Сконструированные иммунные эффекторныe клетки получают путем введения CAR в иммунные эффекторныe клетки, такие как Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления CAR вводят в иммунные эффекторныe клетки путем трансфекции любой из выделенных нуклеиновых кислот или любого из векторов, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления CAR вводят в иммунные эффекторныe клетки путем введения белков в клеточную мембрану, пропуская при этом клетки через микрофлюидную систему, такую как CELL SQUEEZE® (см., например, публикацию заявки на патент США № 20140287509).

**[00370]** Способы введения векторов или выделенных нуклеиновых кислот в клетку млекопитающего известны в данной области техники. Описанные векторы могут быть перенесены в иммунную эффекторную клетку физическими, химическими или биологическими способами.

**[00371]** Физические способы введения вектора в иммунную эффекторную клетку включают осаждение фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и т.п. Методы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области техники. См., например, Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. В некоторых вариантах осуществления вектор вводят в клетку путем электропорации.

**[00372]** Биологические способы введения вектора в иммунную эффекторную клетку включают применение ДНК- и РНК-векторов. Вирусные векторы стали наиболее широко применяемым методом вставки генов в клетки млекопитающих, например, клетки человека.

**[00373]** Химические средства для введения вектора в иммунную эффекторную клетку включают системы коллоидной дисперсии, такие как комплексы макромолекул, нанокапсулы, микросферы, частицы и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Типовой коллоидной системой для применения в качестве средства доставки *in vitro* является липосома (например, искусственная мембранная везикула).

**[00374]** В некоторых вариантах осуществления молекулы РНК, кодирующие любой из САР, описанных в данном документе, могут быть получены при помощи традиционного метода (например, транскрипции *in vitro*) и затем введены в иммунные эффекторные клетки с помощью известных методов, таких как электропорация мРНК. См., например, Rabinovich *et al.*, *Human Gene Therapy* 17:1027-1035 (2006).

**[00375]** В некоторых вариантах осуществления трансдуцированную или трансфицированную иммунную эффекторную клетку размножают *ex vivo* после введения вектора или выделенной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления трансдуцированную или трансфицированную иммунную эффекторную клетку культивируют для размножения в течение по меньшей мере около 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 10 дней, 12 дней или 14 дней. В некоторых вариантах осуществления трансдуцированную или трансфицированную иммунную эффекторную клетку дополнительно оценивают или подвергают скринингу для отбора сконструированной клетки млекопитающего.

[00376] Репортерные гены могут применяться для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. В общем случае репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует в реципиентном организме или ткани или не экспрессируется ими и который кодирует полипептид, чья экспрессия проявляется в виде легко выявляемого свойства, например, ферментативной активности. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящее время после введения ДНК в реципиентные клетки. Подходящие репортерные гены могут включать гены, кодирующие ген люциферазы, бета-галактозидазы, хлорамфеникол-ацетилтрансферазы, секретлируемой щелочной фосфатазы или зеленого флуоресцентного белка (*например, Ui-Tei et al. FEBS Letters 479: 79-82 (2000)*). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены, используя известные методики, или приобретены на коммерческой основе.

Другие способы подтверждения присутствия нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, в сконструированной иммунной эффекторной клетке включают, например, молекулярно-биологические анализы, хорошо известные специалистам в данной области техники, такие как саузерн- и нозерн-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; биохимические анализы, такие как обнаружение присутствия или отсутствия определенного пептида, например, с помощью иммунологических методов (например, ИФА и вестерн-блоттинг).

### 5.4.3. Источники Т-клеток

[00377] В некоторых вариантах осуществления перед размножением и генетической модификацией Т-клеток источник Т-клеток получают от субъекта. Т-клетки можно получать из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань вилочковой железы, ткань из места инфекции, асциты, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли. В некоторых вариантах осуществления можно использовать любое количество линий Т-клеток, доступных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки можно получать из единицы крови, взятой у субъекта, используя любое количество методов, известных специалисту в данной области техники, таких как разделение FICOLL™. В некоторых вариантах осуществления клетки из циркулирующей крови индивида получают с помощью афереза. Продукт афереза, как правило, содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядерные белые кровяные клетки, красные кровяные клетки и тромбоциты. В некоторых вариантах осуществления клетки, собранные с помощью афереза, можно промывать для удаления фракции плазмы и помещать клетки в соответствующий буфер или среду для последующих этапов обработки. В некоторых вариантах осуществления клетки промывают фосфатно-

солевым буфером (ФСБ). В некоторых вариантах осуществления в промывочном растворе отсутствует кальций и может отсутствовать магний или могут отсутствовать многие, если не все, двухвалентные катионы. Начальные стадии активации в отсутствие кальция могут привести к усилению активации. Как понятно специалистам в данной области техники, этап промывки можно осуществлять методами, известными специалистам в данной области техники, например, используя полуавтоматической «проточную» центрифугу (например, устройство для обработки клеток Cobe 2991, Baxter CytoMate или Haemonetics Cell Saver 5) в соответствии с инструкциями производителя. После промывки клетки можно ресуспендировать в ряде биосовместимых буферов, таких как, например, не содержащем  $\text{Ca}^{2+}$ , не содержащем  $\text{Mg}^{2+}$  ФСБ, PlasmaLyte A или другом солевом растворе с буфером или без. В альтернативном варианте нежелательные компоненты образца после афереза можно удалять и непосредственно ресуспендировать клетки в культуральной среде.

**[00378]** В некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови посредством лизиса красных кровяных клеток и истощения моноцитов, например, посредством центрифугирования в градиенте PERCOLL™ или посредством проточного элютриационного центрифугирования. Специфическую субпопуляцию Т-клеток, таких как CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и CD45RO+ Т-клетки, можно дополнительно выделять методами положительного или отрицательного отбора. Например, в некоторых вариантах осуществления Т-клетки выделяют посредством инкубации с анти-CD3/анти-CD28 (т. е. 3×28)-конъюгированными частицами, такими как DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, в течение периода времени, достаточного для позитивного отбора необходимых Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления период времени составляет около 30 минут. В дополнительном варианте осуществления период времени находится в диапазоне от 30 минут до 36 часов или более, включая все промежуточные значения. В дополнительном варианте осуществления период времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 часов. В некоторых вариантах осуществления период времени составляет от 10 до 24 часов. В некоторых вариантах осуществления период времени инкубации составляет 24 часа. Для выделения Т-клеток у пациентов с лейкозом применение большего времени инкубации, например, 24 часа, может повысить выход клеток. Большие времена инкубации можно использовать для выделения Т-клеток в любой ситуации, в которой количество Т-клеток невелико по сравнению с другими типами клеток, например, при выделении опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) из опухолевой ткани или от индивидов с ослабленным иммунитетом. Кроме того, применение большего времени инкубации может повышать эффективность захвата CD8+ Т-клеток. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, простым уменьшением или

увеличением времени связывания Т-клеток с частицами с антителами к CD3/CD28 и/или увеличением или уменьшением соотношения частиц к Т-клеткам можно предпочтительно проводить положительный или отрицательный отбор субпопуляций Т-клеток в начале культивирования или в другие моменты времени в течение процесса. Кроме того, повышая или понижая соотношение антител к CD3 и/или к CD28 на частицах или другой поверхности, можно предпочтительно проводить положительный или отрицательный отбор субпопуляций Т-клеток в начале культивирования или в другие желаемые моменты времени. Специалисту в данной области техники понятно, что также можно использовать несколько раундов отбора. В некоторых вариантах осуществления может существовать необходимость проведения процедуры отбора и использования «неотобранных» клеток в процессе активации и размножения. «Неотобранные» клетки также можно подвергать дополнительным раундам отбора.

**[00379]** Обогащение популяции Т-клеток посредством негативного отбора можно осуществлять с помощью комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для негативно отбираемых клеток. Одним из методов является сортировка и/или отбор клеток с помощью негативной магнитной иммунной адгезии или проточной цитометрии, в которых используется коктейль моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на негативно отбираемых клетках. Например, для обогащения CD4<sup>+</sup> клеток посредством отрицательной селекции, смесь моноклональных антител, как правило, включает антитела к CD14, GUCY2C, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8. В определенных вариантах осуществления может существовать необходимость обогащения или позитивного отбора в отношении регуляторных Т-клеток, которые обычно экспрессируют CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD62Lhi, GITR<sup>+</sup> и FoxP3<sup>+</sup>. Альтернативно, в определенных аспектах регуляторные Т-клетки деплецируют посредством частиц, конъюгированных с антителом к C25, или другим аналогичным способом селекции.

**[00380]** Для выделения необходимой популяции клеток посредством позитивного или негативного отбора концентрация клеток и поверхности (например, частиц, таких как гранулы) может варьироваться. В определенных вариантах осуществления может существовать необходимость существенного уменьшения объема, в котором смешивают вместе частицы и клетки (т. е. повышения концентрации клеток), чтобы обеспечить максимальный контакт клеток и частиц. Например, в одном варианте осуществления используют концентрацию 2 миллиарда клеток/мл. В другом варианте осуществления используют концентрацию 1 миллиард клеток/мл. В дополнительном варианте осуществления используют более 100 миллионов клеток/мл. В другом варианте осуществления используют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50

миллионов клеток/мл. В еще одном варианте осуществления используют концентрацию клеток от 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных вариантах осуществления можно использовать концентрацию 125 или 150 миллионов клеток/мл. Применение высоких концентраций может приводить к повышению выхода клеток, активации клеток и размножения клеток. Кроме того, применение высоких концентраций клеток может обеспечить более эффективный захват клеток, которые могут слабо экспрессировать представляющие интерес антигены-мишени, таких как CD28-отрицательные Т-клетки, или из образцов, в которых присутствует много опухолевых клеток (т. е. лейкозной крови, опухолевой ткани, и т. д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическое значение и их может быть желательно получать. В некоторых вариантах осуществления применение высокой концентрации клеток обеспечивает более эффективный отбор CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые, как правило, имеют более слабую экспрессию CD28.

**[00381]** В некоторых вариантах осуществления может существовать необходимость применения более низких концентраций клеток. За счет существенного разведения смеси Т-клеток и поверхности (например, частиц, таких как гранулы) минимизируются взаимодействия между частицами и клетками. Это обеспечивает отбор в отношении клеток, которые экспрессируют высокие количества необходимых антигенов для связывания с частицами. Например, CD4<sup>+</sup> Т-клетки экспрессируют более высокие уровни CD28 и захватываются более эффективно, чем CD8<sup>+</sup> Т-клетки при разведенных концентрациях. В некоторых вариантах осуществления используемая концентрация клеток составляет  $5 \times 10^6$ /мл. В некоторых вариантах осуществления используемая концентрация может составлять от около  $1 \times 10^5$ /мл до  $1 \times 10^6$ /мл и любое промежуточное целочисленное значение.

**[00382]** В некоторых вариантах осуществления клетки можно инкубировать на ротационном устройстве в течение разного времени при разных скоростях при 2–10°C или при комнатной температуре.

**[00383]** Т-клетки для стимуляции также можно замораживать после этапа промывки. Не ограничиваясь какой-либо теорией, этап замораживания и последующего оттаивания может обеспечить более однородный продукт за счет удаления гранулоцитов и в некоторой степени моноцитов из популяции клеток. После этапа промывки, который обеспечивает удаление плазмы и тромбоцитов, клетки можно суспендировать в замораживающем растворе. Хотя многие замораживающие растворы и параметры известны в данной области техники и будут применимы в этом контексте, один способ включает использование PBS, содержащего 20% ДМСО и 8% человеческого сывороточного альбумина, или культуральной среды, содержащей 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% человеческого

сывороточного альбумина и 7,5% ДМСО или 31,25% плазмалита-А, 31,25% декстрозы 5%, 0,45% NaCl, 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% человеческого сывороточного альбумина и 7,5% ДМСО, или другой подходящей среды для замораживания клеток, содержащей, например, Неспан и плазмалит А. Затем клетки замораживают до  $-80^{\circ}\text{C}$  при скорости  $1^{\circ}$  в минуту и хранят в паровой фазе в емкости для хранения жидкого азота. Можно использовать другие методы контролируемого замораживания, а также неконтролируемое мгновенное замораживание при  $-20^{\circ}\text{C}$  или в жидком азоте.

**[00384]** В некоторых вариантах осуществления криоконсервированные клетки размораживают и промывают, как описано в данном документе, и оставляют отстаиваться в течение одного часа при комнатной температуре перед активацией.

**[00385]** Также в настоящем изобретении предусмотрен сбор образцов крови или продукта афереза от субъекта в период времени, предшествующий тому, когда могут понадобиться описанные в данном документе размноженные клетки. Следовательно, источник подлежащих размножению клеток можно получать в любой необходимый момент времени, а необходимые клетки, такие как Т-клетки, выделять и замораживать для последующего применения в Т-клеточной терапии для любого числа заболеваний или патологических состояний, при которых Т-клеточная терапия приносила бы пользу, например, для описанных в данном документе. В одном варианте осуществления образец крови или аферез берут от в целом здорового субъекта. В определенных вариантах осуществления образец крови или аферез берут от в целом здорового субъекта, который подвержен риску развития заболевания, но у которого еще не развилось заболевание, а представляющие интерес клетки выделяют и замораживают для последующего применения. В определенных вариантах осуществления Т-клетки можно размножать, замораживать и использовать позже. В определенных вариантах осуществления образцы получают от пациента вскоре после диагноза конкретного заболевания, описанного в данном документе, но до какого-либо лечения. В дополнительном варианте осуществления клетки выделяют из образца крови или афереза от субъекта до применения любого количества методов лечения, включая но не ограничиваясь этим, лечение такими агентами, как натализумаб, эфализумаб, противовирусные агенты, химиотерапия, лучевая терапия, иммуносупрессивные агенты, такие как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антитела или другие иммунодеструктивные агенты, такие как САМРАТН, анти-CD3 антитела, цитоксан, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, FR901228 и облучение. Эти препараты ингибируют кальцийзависимую фосфатазу кальциневрин (циклоспорин и FK506) или ингибируют киназу p70S6, важную для индуцированного фактором роста сигналинга (рапамицин) (Liu et al., Cell 66:807-815 (1991));

Henderson et al., *Immun* 73:316-321 (1991); Bierer et al., *Curr. Opin. Immun.* 5:763-773 (1993)). В дополнительном варианте осуществления клетки выделяют от пациента и замораживают для последующего применения в сочетании с (например, до, одновременно или после) трансплантацией костного мозга или стволовых клеток, Т-клеточной аблятивной терапией с применением химиотерапевтических агентов, таких как флударабин, наружной дистанционной лучевой терапией (ХРТ), циклофосфамидом или антителами, такими как ОКТ3 или САМРАТН. В другом варианте осуществления клетки выделяют до и могут замораживать для последующего применения для лечения после В-клеточной абляционной терапии, например, агентами, которые вступают в реакцию с GUCY2C, например, ритуксаном.

**[00386]** В некоторых вариантах осуществления Т-клетки получают от пациента непосредственно после лечения. В связи с этим наблюдалось, что после определенных вариантов лечения рака, в частности при лечении препаратами, которые повреждают иммунную систему, вскоре после лечения в течение периода, когда пациенты обычно должны восстанавливаться от лечения, качество получаемых Т-клеток может быть оптимальным или улучшенным в отношении их способности к экспансии *ex vivo*. Аналогичным образом, после манипуляций *ex vivo* с использованием способов, описываемых в данном документе, эти клетки могут находиться в предпочтительном состоянии для повышенного прививания и экспансии *in vivo*. Таким образом, в контексте настоящего изобретения предусмотрен сбор клеток крови, включая Т-клетки, дендритные клетки или другие клетки гемопоэтической линии, во время этой фазы восстановления. Кроме того, в определенных вариантах осуществления можно использовать режимы мобилизации (например, мобилизации с помощью GM-CSF) и кондиционирования для создания условий в организме субъекта, при которых преимущественной является репопуляция, рециркуляция, регенерация и/или экспансия конкретных типов клеток, в особенности во время определенного окна времени после терапии. Иллюстративные типы клеток включают Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и другие клетки иммунной системы.

#### **5.4.4. Активация и экспансия Т-клеток**

**[00387]** В некоторых вариантах осуществления до или после генетической модификации Т-клеток с помощью CAR, описанных в данном документе, Т-клетки можно активировать и размножать, как правило, с использованием способов, описанных, например, в патентах США. №№ 6352694; 6534055; 6905680; 6692964; 5858358; 6887466; 6905681; 7144575; 7067318; 7172869; 7232566; 7175843; 5883223; 6905874; 6797514; 6867041; и публикации заявки на патент США № 20060121005.

**[00388]** В общем случае Т-клетки можно размножать посредством контакта с поверхностью с присоединенным к ней агентом, который стимулирует ассоциированный с комплексом CD3/TCR сигнал, и лигандом, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В частности, популяции Т-клеток можно стимулировать, как описано в данном документе, например, посредством контакта с анти-CD3 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или анти-CD2 антителом, иммобилизованным на поверхности, или посредством контакта с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с кальциевым ионофором. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток используют лиганд, который связывает вспомогательную молекулу. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с анти-CD3 антителом и анти-CD28 антителом в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток. Для стимуляции пролиферации CD4<sup>+</sup> Т-клеток или CD8<sup>+</sup> Т-клеток используют анти-CD3 антитело и анти-CD28 антитело. Примеры антитела к анти-CD3 включают UCНТ1, ОКТ3, НІТ3а (BioLegend, Сан-Диего, США), которые можно использовать, как и другие методы, широко известные в данной области техники (Graves J, et al., *J. Immunol.* 146:2102 (1991); Li B, et al., *Immunology* 116:487 (2005); Rivollier A, et al., *Blood* 104:4029 (2004)). Можно использовать примеры антитела к анти-CD28, включающие 9.3, В-Т3, XR-CD28 (Diaclone, Безансон, Франция), как и другие методы, общеизвестные в данной области техники (Berg et al., *Transplant Proc.* 30(8):3975-3977 (1998); Naanen et al., *J. Exp. Med.* 190(9):1319-1328 (1999); Garland et al., *J. Immunol Meth.* 227(1-2):53-63 (1999)).

**[00389]** В некоторых вариантах осуществления первичный стимулирующий сигнал и костимулирующий сигнал для Т-клетки могут быть обеспечены разными протоколами. Например, агенты, обеспечивающие каждый сигнал, могут находиться в растворе или быть сопряжены с поверхностью. В случае сопряжения с поверхностью агенты могут быть сопряжены с одной поверхностью (т. е. в «цис»-форме) или с отдельными поверхностями (т. е. в «транс»-форме). В альтернативном варианте один агент может быть сопряжен с поверхностью, а другой агент находится в растворе. В одном варианте осуществления агент, обеспечивающий костимулирующий сигнал, связан с клеточной поверхностью, а агент, обеспечивающий первичный сигнал активации, находится в растворе или сопряжен с поверхностью. В определенных вариантах осуществления оба агента могут находиться в растворе. В другом варианте осуществления агенты могут находиться в растворимой форме, а затем быть сшиты с поверхностью, такой как клетка, экспрессирующая Fc-рецепторы, или антитело или другой связывающий агент, который будет связываться с агентами. В этом отношении смотрите, например, публикации заявок на патенты США №№

20040101519 и 20060034810 в отношении искусственных антигенпрезентирующих клеток (аАРС), которые в настоящем изобретении предусмотрены для применения при активации и размножении Т-клеток.

**[00390]** В некоторых вариантах осуществления Т-клетки комбинируют с покрытыми агентами частицами, после чего гранулы и клетки разделяют и затем культивируют клетки. В альтернативном варианте осуществления перед культивированием покрытые агентами частицы и клетки не разделяют, а культивируют вместе. В дополнительном варианте осуществления частицы и клетки сначала концентрируют путем приложения силы, такой как магнитная сила, что приводит к повышенному лигированию маркеров клеточной поверхности, тем самым индуцируя стимуляцию клеток.

**[00391]** В качестве примера белки клеточной поверхности можно лигировать с помощью парамагнитных частиц, к которым присоединены анти-CD3 и анти-CD28 ( $3 \times 28$  частиц), для контакта с Т-клетками. В одном варианте осуществления клетки (например, от  $10^4$  до  $4 \times 10^8$  Т-клеток) и частицы (например, частицы MACSiBead с антителом к CD3/CD28 с рекомендуемым титром 1:100) объединяют в буфере, предпочтительно PBS (без двухвалентных катионов, таких как кальций и магний). Для специалистов в данной области техники понятно, что можно использовать любую концентрацию клеток. Например, клетка-мишень может присутствовать в очень малом количестве в образце и составлять лишь 0,01 % образца или же весь образец (т. е. 100 %) может состоять из представляющей интерес клетки-мишени. Соответственно, контекст настоящего изобретения предусматривает любое количество клеток. В определенных вариантах осуществления может существовать необходимость существенного уменьшения объема, в котором смешивают вместе частицы и клетки (т. е. повышения концентрации клеток), чтобы обеспечить максимальный контакт клеток и частиц. Например, в одном варианте осуществления используют концентрацию около 2 миллиардов клеток/мл. В другом варианте осуществления используют более 100 миллионов клеток/мл. В другом варианте осуществления используют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В еще одном варианте осуществления используют концентрацию клеток от 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных вариантах осуществления можно использовать концентрацию 125 или 150 миллионов клеток/мл. Применение высоких концентраций может приводить к повышению выхода клеток, активации клеток и размножения клеток. Кроме того, применение высоких концентраций может обеспечивать более эффективный захват клеток, которые могут слабо экспрессировать представляющие интерес антигены-мишени, например, CD28-отрицательных Т-клеток. Такие популяции клеток могут иметь терапевтическое значение и их может быть желательно получать в определенных вариантах

осуществления. Например, применение высоких концентраций клеток обеспечивает более эффективный отбор CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые обычно имеют более слабую экспрессию CD28.

**[00392]** В некоторых вариантах осуществления смесь можно культивировать в течение от нескольких часов (около 3 часов) до около 14 дней, или любое промежуточное целочисленное часовое значение. В другом варианте осуществления смесь можно культивировать в течение 21 дня. В одном варианте осуществления частицы и Т-клетки культивируют вместе в течение примерно восьми дней. В другом варианте осуществления частицы и Т-клетки культивируют вместе в течение 2–3 дней. Также может быть желательно несколько циклов стимуляции, так что время культивирования Т-клеток может составлять 60 суток или более. Условия, подходящие для культуры Т-клеток, включают подходящие среды (*например*, минимальные питательные среды или среды RPMI 1640 или X-vivo 15 (Lonza)), которые могут содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (*например*, эмбриональную бычью или человеческую сыворотку), интерлейкин-2 (IL-2), инсулин, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF $\beta$ , и TNF- $\alpha$  или любые другие добавки для роста клеток известны специалисту в данной области техники. Другие добавки для роста клеток включают, но не ограничиваются ими, сурфактант, плазманат и восстановители, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол. Среда могут включать RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -MEM, F-12, X-Vivo 15 и X-Vivo 20, Optimizer, с добавлением аминокислот, пирувата натрия и витаминов, быть бессывороточными или дополненными соответствующим количеством сыворотки (или плазмы) или определенным набором гормонов, и/или количеством цитокинов, достаточным для роста и размножения Т-клеток. Антибиотики, например, пенициллин и стрептомицин, включают только в экспериментальные культуры клеток, которые предназначены для инфузии субъекту. Клетки-мишени поддерживают в условиях, необходимых для поддержки роста, например, при соответствующей температуре (*например*, 37 °C) и атмосфере (*например*, воздух плюс 5 % CO<sub>2</sub>). Т-клетки, которые подвергали стимуляции в течение разного времени, могут демонстрировать разные характеристики. Например, типичные продукты мононуклеарных клеток крови или продукты мононуклеарных клеток периферической крови после афереза содержат популяцию хелперных Т-клеток (TH, CD4<sup>+</sup>), которая больше, чем популяция цитотоксических или супрессорных Т-клеток (TC, CD8). *Ex vivo* экспансия Т-клеток посредством стимуляции рецепторов CD3 и CD28 позволяет получать популяцию Т-клеток, которая приблизительно до 8–9 дня состоит преимущественно из TH-клеток, а приблизительно после 8–9 дня популяция Т-клеток содержит возрастающую популяцию

ТС-клеток. Соответственно, в зависимости от цели лечения, предпочтительной может быть инфузия субъекту популяции Т-клеток, содержащей преимущественно ТН-клетки. Аналогично, если была выделена антиген-специфическая субпопуляция ТС-клеток, может быть полезно размножение этой субпопуляции до большего количества.

**[00393]** Более того, в дополнение к маркерам CD4 и CD8 во время процесса экспансии клеток значительно изменяются другие фенотипические маркеры, но в значительной степени воспроизводимо. Таким образом, воспроизводимость обеспечивает возможность подбирать активированный продукт Т-клеток для конкретных целей.

### **5.5. Полинуклеотиды**

**[00394]** В определенных вариантах осуществления в изобретении предложены полинуклеотиды, кодирующие однодоменные антитела, которые связываются с GUCY2C, и слитые белки, содержащие однодоменные антитела, которые связываются с GUCY2C, описанные в данном документе. Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут быть в форме РНК или в форме ДНК. ДНК включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК; и может быть двухцепочечной или одноцепочечной, и если одноцепочечная может быть кодирующей цепью или некодирующей (антисмысловой) цепью. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид находится в форме кДНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой синтетический полинуклеотид.

**[00395]** В иллюстративных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, представленная в данном документе, содержит последовательность, которая кодирует однодоменное антитело, имеющее последовательность SEQ ID NO: 3, такую как нуклеиновая кислота, имеющая SEQ ID NO: 11.

**[00396]** В иллюстративных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, представленная в данном документе, содержит последовательность, которая кодирует однодоменное антитело, имеющее последовательность SEQ ID NO: 4, такую как нуклеиновая кислота, имеющая SEQ ID NO: 12.

**[00397]** В иллюстративных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, представленная в данном документе, содержит последовательность, которая кодирует однодоменное антитело, имеющее последовательность SEQ ID NO: 5, такую как нуклеиновая кислота, имеющая SEQ ID NO: 13.

**[00398]** В иллюстративных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, представленная в данном документе, содержит последовательность, которая кодирует однодоменное антитело, имеющее последовательность SEQ ID NO: 6, такую как нуклеиновая кислота, имеющая SEQ ID NO: 14.

**[00399]** В иллюстративных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, представленная в данном документе, содержит последовательность, которая кодирует однодоменное антитело, имеющее последовательность SEQ ID NO: 7, такую как нуклеиновая кислота, имеющая SEQ ID NO: 15.

**[00400]** В иллюстративных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, представленная в данном документе, содержит последовательность, которая кодирует однодоменное антитело, имеющее последовательность SEQ ID NO: 8, такую как нуклеиновая кислота, имеющая SEQ ID NO: 16.

**[00401]** В иллюстративных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, представленная в данном документе, содержит последовательность, которая кодирует однодоменное антитело, имеющее последовательность SEQ ID NO: 9, такую как нуклеиновая кислота, имеющая SEQ ID NO: 17.

**[00402]** В иллюстративных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, представленная в данном документе, содержит последовательность, которая кодирует однодоменное антитело, имеющее последовательность SEQ ID NO: 10, такую как нуклеиновая кислота, имеющая SEQ ID NO: 18.

**[00403]** В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены полинуклеотиды, кодирующие CAR к GUCY2C, представленный в данном документе. Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут быть в форме РНК или в форме ДНК. ДНК включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК; и может быть двухцепочечной или одноцепочечной, и если одноцепочечная может быть кодирующей цепью или не кодирующей (антисмысловой) цепью. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид находится в форме кДНК. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой синтетический полинуклеотид.

**[00404]** В иллюстративных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, представленная в данном документе, содержит последовательность, кодирующую CAR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 48, такую как нуклеиновая кислота, имеющая SEQ ID NO: 56.

**[00405]** В иллюстративных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, представленная в данном документе, содержит последовательность, кодирующую CAR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 49, такую как нуклеиновая кислота, имеющая SEQ ID NO: 57.

**[00406]** В иллюстративных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, представленная в данном документе, содержит последовательность, кодирующую CAR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 50, такую как нуклеиновая кислота, имеющая

SEQ ID NO: 58.

**[00407]** В иллюстративных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, представленная в данном документе, содержит последовательность, кодирующую CAR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 51, такую как нуклеиновая кислота, имеющая SEQ ID NO: 59.

**[00408]** В иллюстративных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, представленная в данном документе, содержит последовательность, кодирующую CAR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 52, такую как нуклеиновая кислота, имеющая SEQ ID NO: 60.

**[00409]** В иллюстративных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, представленная в данном документе, содержит последовательность, кодирующую CAR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 53, такую как нуклеиновая кислота, имеющая SEQ ID NO: 61.

**[00410]** В иллюстративных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, представленная в данном документе, содержит последовательность, кодирующую CAR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 54, такую как нуклеиновая кислота, имеющая SEQ ID NO: 62.

**[00411]** В иллюстративных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, представленная в данном документе, содержит последовательность, кодирующую CAR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 55, такую как нуклеиновая кислота, имеющая SEQ ID NO: 63.

**[00412]** Настоящее изобретение также относится к вариантам полинуклеотидов, описанных в данном документе, где вариант кодирует, например, фрагменты, аналоги и/или производные однодоменного антитела или CAR, которые связывают GUCY2C по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность с по меньшей мере около 75% идентичности, по меньшей мере около 80% идентичности, по меньшей мере около 85% идентичности, по меньшей мере около 90% идентичности, по меньшей мере около 95% идентичности, а в некоторых вариантах осуществления, с по меньшей мере около 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с полинуклеотидом, кодирующим однодоменное антитело или CAR, которые связывают GUCY2C по настоящему изобретению. В контексте данного документа фраза «полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность с по меньшей мере, например, 95% «идентичности» с эталонной нуклеотидной последовательностью» означает, что нуклеотидная последовательность полинуклеотида идентична эталонной

последовательности, за исключением того, что полинуклеотидная последовательность может включать до пяти точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов эталонной нуклеотидной последовательности. Другими словами, для получения полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную эталонной нуклеотидной последовательности, до 5% нуклеотидов в эталонной последовательности могут быть удалены или заменены другим нуклеотидом, или количество нуклеотидов до 5% всех нуклеотидов в эталонной последовательности могут быть вставлены в эталонную последовательность. Эти мутации эталонной последовательности могут происходить в 5'- или 3'-концевых положениях эталонной нуклеотидной последовательности или в любом месте между этими концевыми положениями, с введением либо отдельно среди нуклеотидов в эталонной последовательности, либо в одной или более смежных группах в эталонной последовательности.

**[00413]** Полинуклеотидные варианты могут содержать изменения в кодирующих областях, некодирующих областях или в обоих типах областей. В некоторых вариантах осуществления вариант полинуклеотида содержит изменения, которые приводят к молчащим заменам, добавлениям или делециям, но не изменяют свойства или активности кодируемого полипептида. В некоторых вариантах осуществления вариант полинуклеотида содержит молчащие замены, которые не приводят к изменению аминокислотной последовательности полипептида (из-за вырожденности генетического кода). Варианты полинуклеотидов могут быть получены по разным причинам, например, для оптимизации экспрессии кодонов для конкретного хозяина (т.е. замена кодонов в мРНК человека на кодоны, предпочтительные для бактериального хозяина, такого как *E. coli*). В некоторых вариантах осуществления вариант полинуклеотида содержит по меньшей мере одну молчащую мутацию в некодирующей или кодирующей области последовательности.

**[00414]** В некоторых вариантах осуществления получают вариант полинуклеотида для модулирования или изменения экспрессии (или уровней экспрессии) кодируемого полипептида. В некоторых вариантах осуществления получают вариант полинуклеотида для увеличения экспрессии кодируемого полипептида. В некоторых вариантах осуществления получают вариант полинуклеотида для снижения экспрессии кодируемого полипептида. В некоторых вариантах осуществления вариант полинуклеотида имеет повышенную экспрессию кодируемого полипептида по сравнению с исходной полинуклеотидной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления вариант полинуклеотида имеет сниженную экспрессию кодируемого полипептида по сравнению с исходной полинуклеотидной последовательностью.

**[00415]** Также предложены векторы, содержащие описанные в данном документе молекулы нуклеиновых кислот. В одном варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты могут быть включены в рекомбинантный вектор экспрессии. Настоящее изобретение обеспечивает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из нуклеиновых кислот по данному изобретению. В контексте данного документа термин «рекомбинантный вектор экспрессии» означает генетически модифицированную олигонуклеотидную или полинуклеотидную конструкцию, которая обеспечивает экспрессию мРНК, белка, полипептида или пептида клеткой-хозяином, когда конструкция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую мРНК, белок, полипептид или пептид, а вектор приводят в контакт с клеткой в условиях, достаточных для экспрессии мРНК, белка, полипептида или пептида внутри клетки. Описанные в данном документе векторы в целом не встречаются в природе; однако части векторов могут быть природного происхождения. Описанные рекомбинантные векторы экспрессии могут содержать нуклеотиды любого типа, включая, без ограничений, ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, синтезированными или частично полученными из природных источников и которые могут содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды. Рекомбинантные векторы экспрессии могут содержать межнуклеотидные связи природного происхождения или неприродного происхождения или оба типа связей. Неприродные или измененные нуклеотиды или межнуклеотидные связи не препятствуют транскрипции или репликации вектора.

**[00416]** В одном варианте осуществления рекомбинантный вектор экспрессии по данному изобретению может быть любым подходящим рекомбинантным вектором экспрессии и может использоваться для трансформации или трансфекции любого подходящего хозяина. Подходящие векторы включают векторы, предназначенные для размножения и экспансии или для экспрессии, или и того, и другого, такие как плазмиды и вирусы. Вектор можно выбрать из группы, состоящей из серии pUC (Fermentas Life Sciences, Глен Берни, штат Мэриленд, США), серии pBluescript (Stratagene, г. Ла-Холья, штат Калифорния, США), серии pET (Novagen, г. Мэдисон, штат Висконсин, США), серии pGEX (Pharmacia Biotech, г. Уппсала, Швеция) и серии pEX (Clontech, г. Пало-Альто, штат Калифорния, США). Можно использовать векторы бактериофагов, такие как  $\lambda$ GT10,  $\lambda$ GT11,  $\lambda$ EMBL4 и  $\lambda$ NM1149,  $\lambda$ ZapII (Stratagene). Примеры векторов экспрессии растений включают pBI01, pBI01.2, pBI121, pBI101.3 и pBIN19 (Clontech). Примеры векторов экспрессии на животных включают pEUK-CI, pMAM и pMAMneo (Clontech). Рекомбинантный вектор экспрессии может быть вирусным вектором, *например*, ретровирусным вектором, *например*, гамма-ретровирусным вектором.

**[00417]** В одном варианте осуществления рекомбинантные векторы экспрессии получают с использованием стандартных методов рекомбинантных ДНК, описанных, например, в Sambrook et al., см. выше, и Ausubel et al., см. выше. Конструкции векторов экспрессии, которые являются кольцевыми или линейными, могут быть приготовлены таким образом, чтобы содержать систему репликации, функционирующую в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Системы репликации могут быть получены, например, из ColE1, SV40, 2 мкм плазмиды,  $\lambda$ , бычьего вируса папилломы и т. п.

**[00418]** Рекомбинантный вектор экспрессии может содержать регуляторные последовательности, такие как иницирующие и терминирующие кодоны транскрипции и трансляции, которые специфичны для типа хозяина (например, бактерии, растения, гриба или животного), в который должен быть введен вектор, при необходимости, с учетом того, основан ли вектор на ДНК или РНК.

**[00419]** Рекомбинантный вектор экспрессии может включать один или более маркерных генов, которые позволяют отобрать трансформированных или трансфицированных хозяев. Маркерные гены включают гены устойчивости к биоцидам, *например*, гены устойчивости к антибиотикам, тяжелым металлам и т. д., комплементации в ауксотрофном хозяине для обеспечения прототрофности и т. п. Подходящие маркерные гены для описанных векторов экспрессии включают, например, гены устойчивости к неомицину/G418, гены устойчивости к гистидинолу х, гены устойчивости к гистидинолу, гены устойчивости к тетрациклину и гены устойчивости к ампициллину.

**[00420]** Рекомбинантный вектор экспрессии может содержать нативный или ненативный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью по данному изобретению. Выбор промоторов, *например*, сильных, слабых, тканеспецифичных, индуцируемых и специфичных для развития промоторов находится в рамках обычного специалиста в данной области техники. Аналогичным образом, комбинирование нуклеотидной последовательности с промотором также находится в рамках квалификации специалиста в данной области техники. Промотор может представлять собой невирусный промотор или вирусный промотор, например, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор RSV, промотор SV40 или промотор, присутствующий в длинном концевом повторе вируса мышинных стволовых клеток.

**[00421]** Рекомбинантные векторы экспрессии могут быть разработаны либо для транзientной экспрессии, либо для стабильной экспрессии, либо для обоих. Кроме того, рекомбинантные векторы экспрессии могут быть получены для конститутивной экспрессии или для индуцируемой экспрессии.

**[00422]** Дополнительно могут быть созданы рекомбинантные векторы экспрессии,

включающие суицидальный ген. В контексте данного документа термин «суицидальный ген» относится к гену, который заставляет клетку, экспрессирующую суицидальный ген, погибать. Суицидальный ген может быть геном, который придает чувствительность к агенту, *например*, лекарственному препарату, клетке, в которой экспрессируется ген, и заставляет клетку погибать, когда клетка контактирует с агентом или подвергается его воздействию. Суицидальные гены известны в данной области техники и включают, например, ген тимидинкиназы (ТК) вируса простого герпеса (HSV), цитозиндиаминазу, пуридиннуклеозидфосфорилазу и нитроредуктазу.

**[00423]** В некоторых вариантах осуществления выделяют полинуклеотид. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид является по существу чистым.

**[00424]** Также предложены клетки-хозяева, содержащие описанные в данном документе молекулы нуклеиновой кислоты. Клеткой-хозяином может быть любая клетка, содержащая гетерологичную нуклеиновую кислоту. Гетерологичная нуклеиновая кислота может представлять собой вектор (например, вектор экспрессии). Например, клетка-хозяин может быть клеткой любого организма, которую выбирают, модифицируют, трансформируют, выращивают, используют или подвергают манипуляциями любым способом для продукции клеткой субстанции, например, для экспрессии клеткой гена, последовательности ДНК или РНК, белка или фермента. Можно определить подходящего хозяина. Например, клетка-хозяин может быть выбрана на основе векторного остова и желаемого результата. Например, плазида или космида может быть введена в прокариотическую клетку-хозяина для репликации нескольких типов векторов. Бактериальные клетки, такие как, но не ограничиваясь ими, DH5 $\alpha$ , JM109 и KCB, компетентные клетки SURE® и SOLOPACK Gold Cells, можно использовать в качестве клеток-хозяев для репликации и/или экспрессии вектора. Кроме того, бактериальные клетки, такие как *E. coli* LE392, могут быть использованы в качестве клеток-хозяев для фаговых вирусов. Эукариотические клетки, которые можно использовать в качестве клеток-хозяев, включают, но не ограничиваются ими, дрожжи (например, YPH499, YPH500 и YPH501), насекомых и млекопитающих. Примеры эукариотических клеток-хозяев млекопитающих для репликации и/или экспрессии вектора включают, но не ограничиваются ими, HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, COS, Saos, PC12, мышинные линии клеток SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), Манассас, штат Вирджиния, CRL-1581), NS0 (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC), Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580). Иллюстративной линией клеток миеломы человека является U266 (ATCC CRL-TIB-196). Другие пригодные линии клеток включают линии, полученные из клеток яичника китайского хомяка (CHO), такие как CHO-K1SV (Lonza

Biologics, Уолкерсвилл, штат Мэриленд), CHO-K1 (ATCC CRL-61) или DG44.

### **5.6. Фармацевтические композиции**

**[00425]** В одном аспекте настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, содержащим однодоменное антитело, связывающую молекулу или терапевтическую молекулу, содержащую однодоменное антитело, или сконструированную иммунную эффекторную клетку по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество однодоменного антитела, связывающую молекулу или терапевтическую молекулу, содержащую однодоменное антитело, или сконструированную иммунную эффекторную клетку по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый эксципиент.

**[00426]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество однодоменного антитела, представленного в данном документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

**[00427]** В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество терапевтической молекулы (такой как слитый белок, иммуноконъюгат и полиспецифическая связывающая молекула), содержащей однодоменное антитело, представленное в данном документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

**[00428]** В других вариантах осуществления в данном документе представлена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество CAR, содержащего однодоменное антитело, представленное в данном документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

**[00429]** В других вариантах осуществления в данном документе представлена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество сконструированных иммунных эффекторных клеток, представленных в данном документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

**[00430]** В других вариантах осуществления в данном документе представлена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество нуклеиновой кислоты, представленной в данном документе, например, в векторе, и фармацевтически приемлемый эксципиент, например, подходящий для генной терапии.

**[00431]** В конкретном варианте осуществления термин «эксципиент» может также относиться к разбавителю, адъюванту (например, адъюванту Фрейнда (полному или

неполному), носителю или наполнителю. Фармацевтические эксципиенты могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут быть использованы в качестве жидких эксципиентов. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Композиция, при необходимости, может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульсифицирующих агентов или рН-забуференных агентов. Эти композиции могут находиться в форме растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и т.п. Примеры подходящих фармацевтических эксципиентов описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA. Такие композиции будут содержать профилактически или терапевтически эффективное количество активного ингредиента, представленного в данном документе, например, в очищенной форме, вместе с подходящим количеством эксципиента, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения пациенту. Состав должен соответствовать способу введения.

**[00432]** В некоторых вариантах осуществления выбор эксципиента частично определяется конкретной клеткой, связывающей молекулой и/или антителом и/или способом введения. Соответственно, существует множество подходящих составов.

**[00433]** Как правило, приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту, метионин, витамин Е, метабисульфит натрия; консерванты, изотонирующие добавки, стабилизаторы, комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); хелатирующие агенты, такие как ЭДТА, и/или неионные поверхностно-активные вещества.

**[00434]** Буферы можно использовать для регулирования рН в диапазоне, который оптимизирует терапевтическую эффективность, особенно если стабильность зависит от рН. Подходящие буферные агенты для применения в настоящем изобретении включают как органические, так и неорганические кислоты и их соли. Например, это цитрат, фосфат, сукцинат, тартрат, фумарат, глюконат, оксалат, лактат, ацетат. Дополнительно буферы могут содержать гистидин и соли триметиламина, такие как Трис.

**[00435]** Консерванты могут быть добавлены для замедления роста микробов. Подходящие

консерванты для применения с настоящим изобретением включают хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония (например, хлорид, бромид, йодид), хлорид бензетония; тимеросал, фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол.

**[00436]** Регулирующие тоничность агенты, иногда называемые «стабилизаторами», могут присутствовать для регулирования или поддержания тонуса жидкости в композиции. При применении с крупными заряженными биомолекулами, такими как белки или антитела, их часто называют «стабилизаторами», поскольку они могут взаимодействовать с заряженными группами аминокислотных боковых цепей, тем самым уменьшая потенциал для меж- и внутримолекулярных взаимодействий. Примеры регулирующих тоничность агентов включают многоатомные сахарные спирты, трехатомные или высшие сахарные спирты, такие как глицерин, эритрит, арабит, ксилит, сорбит и маннит.

**[00437]** Дополнительные иллюстративные эксципиенты включают: (1) объемообразующие агенты, (2) усилители растворимости, (3) стабилизаторы и (4) агенты, предотвращающие денатурацию или прилипание к стенке контейнера. Такие эксципиенты включают: многоатомные сахарные спирты (перечисленные выше); аминокислоты, такие как аланин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин, лизин, орнитин, лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота, треонин и т.д.; органические сахара или сахарные спирты, такие как сахароза, лактоза, лактитол, трегалоза, стахиоза, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, рибитол, миоинизитоза, миоинизитол, галактоза, галактитол, глицерин, циклитолы (например, инозитол), полиэтиленгликоль; серосодержащие восстановители, такие как мочевины, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин,  $\alpha$ -монотиоглицерин и тиосульфат натрия; белки с низкой молекулярной массой, такие как сывороточный альбумин человека, бычий сывороточный альбумин, желатин или другие иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; моносахариды (например, ксилоза, манноза, фруктоза, глюкоза; дисахариды (например, лактоза, мальтоза, сахароза); трисахариды, такие как рафиноза; и полисахариды, такие как декстрин или декстран.

**[00438]** Неионные поверхностно-активные вещества или детергенты (также известные как «смачивающие агенты») могут присутствовать, чтобы способствовать сольюбилизации терапевтического агента, а также для защиты терапевтического белка от индуцированной встряхиванием агрегации, что также позволяет подвергать состав сдвиговому поверхностному напряжению, не вызывая денатурации активного терапевтического белка или антитела. Подходящие неионные поверхностно-активные вещества включают,

например, полисорбаты (20, 40, 60, 65, 80 и т.д.), полиоксамеры (184, 188 и т.д.), полиолы PLURONIC®, TRITON®, моноэфиры полиоксиэтиленсорбитана (TWEEN®-20, TWEEN®-80 и др.), лауромакрогол-400, полиоксил 40 стеарат, полиоксиэтилен гидрогенизированного касторового масла 10, 50 и 60, моностеарат глицерина, сложный эфир сахарозы и жирной кислоты, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу. Анионные детергенты, которые можно использовать, включают лаурилсульфат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия и диоктилсульфонат натрия. Катионные детергенты включают хлорид бензалкония или хлорид бензетония.

**[00439]** Для того чтобы фармацевтические композиции можно было использовать для введения *in vivo*, они предпочтительно должны быть стерильными. Фармацевтической композиции можно придать стерильность путем фильтрации через стерильные фильтровальные мембраны. Фармацевтические композиции по данному документу в общем случае могут быть помещены в контейнер, имеющий стерильный порт доступа, например, пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, прокалываемую гиподермической иглой для инъекций.

**[00440]** Путь введения соответствует известным и принятым способам, например, это один или несколько болюсов или инфузий, осуществляемых подходящим образом в течение длительного периода времени, например, инъекция или инфузия подкожным, внутривенным, внутрибрюшинным, внутримышечным, внутриартериальным, внутриочаговым или интраартериальными путями, местным введением, ингаляцией или с помощью средств замедленного высвобождения или продолжительного высвобождения.

**[00441]** В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция может быть предоставлена в виде системы с контролируемым или замедленным высвобождением. В одном варианте осуществления для обеспечения контролируемого или замедленного высвобождения можно использовать насос (см., например, Sefton, Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201-40 (1987); Buchwald *et al.*, Surgery 88:507-16 (1980); и Saudek *et al.*, N. Engl. J. Med. 321:569-74 (1989)). В еще одном варианте осуществления полимерные материалы можно использовать для достижения контролируемого или замедленного высвобождения профилактического или терапевтического агента (например, слитого белка, как описано в данном документе) или композиции, представленной в данном документе, (см., например, Medical Applications of Controlled Release (Langer and Wise eds., 1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (Smolen and Ball eds., 1984); Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61-126 (1983); Levy *et al.*, Science 228:190-92 (1985); During *et al.*, Ann. Neurol. 25:351-56 (1989); Howard *et al.*, J. Neurosurg. 71:105-12 (1989); патенты США №№ 5679377; 5916597; 5912015; 5989463; и 5128326; публикацию

РСТ №№ WO 99/15154 и WO 99/20253). Примеры полимеров, используемых в составах для замедленного высвобождения, включают, но не ограничиваются этим, поли2-гидроксиэтилметакрилат, полиметилметакрилат, полиакриловую кислоту, сополимер этилена с винилацетатом, полиметакриловую кислоту, полигликолиды (PLG), полиангидриды, поли-N-винилпирролидон, поливиниловый спирт, полиакриламид, полиэтиленгликоль, полилактиды (PLA), сополимер лактида с гликолидом (PLGA) и сложные полиортоэфиры. В одном варианте осуществления полимер, используемый в составе для замедленного высвобождения, является инертным, не содержит щелочных примесей, стабильным при хранении, стерильным и биоразлагаемым. В еще одном варианте осуществления систему для контролируемого или замедленного высвобождения можно размещать вблизи конкретной целевой ткани, например, носовых проходов или легких, что делает необходимым только часть системной дозы (см., например, Goodson, Medical Applications of Controlled Release Vol. 2, 115-38 (1984)). Системы для контролируемого высвобождения обсуждаются, например, в Langer, *Science* 249:1527-33 (1990). Любой метод, известный специалисту в данной области техники, может быть использован для получения составов с замедленным высвобождением, содержащих один или более агентов, как описано в данном документе (см., например, патент США № 4526938, публикации РСТ №№ WO 91/05548 и WO 96/20698, Ning *et al.*, *Radiotherapy & Oncology* 39:179-89 (1996); Song *et al.*, *PDA J. of Pharma. Sci. & Tech.* 50:372-97 (1995); Cleek *et al.*, *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-54 (1997); и Lam *et al.*, *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-60 (1997)).

**[00442]** Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут также содержать более одного активного соединения или агента, если это необходимо для лечения конкретной патологии. Альтернативно или дополнительно композиция может содержать цитотоксический агент, химиотерапевтический агент, цитокин, иммунодепрессант или ингибирующий рост агент. Такие молекулы предпочтительно присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для предполагаемой цели.

**[00443]** Активные ингредиенты могут также быть заключены в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или межфазной полимеризации, например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатиновые микрокапсулы и полиметилметакрилатные микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и нанокапсулах) или в макроэмульсиях. Такие методики описаны в *Remington's Pharmaceutical Sciences* 18th edition.

**[00444]** Известны различные композиции и системы доставки, которые можно

использовать с терапевтическими агентами, представленными в данном документе, включая, помимо прочего, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать однодоменное антитело или терапевтическую молекулу, представленные в данном документе, конструирование нуклеиновых кислот в виде части ретровирусного или другого вектора и т.д.

**[00445]** В некоторых вариантах осуществления предлагаемая в данном документе фармацевтическая композиция содержит связывающие молекулы и/или клетки в количествах, эффективных для лечения или профилактики заболевания или нарушения, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное количество. Терапевтическую или профилактическую эффективность в некоторых вариантах осуществления контролируют путем периодической оценки субъектов, получающих лечение. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение повторяют до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Однако другие режимы дозирования могут быть полезны и могут быть определены.

### **5.7. Способы и применения**

**[00446]** В еще одном аспекте в данном документе предусмотрены способы использования и применения связывающих GUCY2C молекул, представленных в данном документе, включая VHH к GUCY2C, химерные антигенные рецепторы (CAR) и/или сконструированные клетки, экспрессирующие рекомбинантные рецепторы.

#### **5.7.1. Терапевтические способы и применения**

**[00447]** Такие способы и применения включают терапевтические способы и применения, например, включающие введение молекул, клеток или композиций, содержащих их, субъекту, страдающему заболеванием, патологическим состоянием или нарушением, при котором экспрессируется или которое ассоциировано с экспрессией GUCY2C, и/или при котором клетки или ткани экспрессируют GUCY2C. В некоторых вариантах осуществления молекулу, клетку и/или композицию вводят в количестве, эффективном для лечения заболевания или нарушения. Применение включает применение антител и клеток в таких способах и лечении, а также при получении лекарственного препарата для осуществления таких терапевтических способов. В некоторых вариантах осуществления способы осуществляют путем введения антител или клеток, или композиций, содержащих их, субъекту, имеющему или подозреваемому в наличии заболевания или патологического состояния. В некоторых вариантах осуществления способы таким образом лечат заболевание или нарушение у субъекта.

**[00448]** В некоторых вариантах осуществления лечение, предусмотренное в данном

документе, вызывает полное или частичное облегчение или ремиссию заболевания или нарушения, или связанного с ним симптома, неблагоприятного эффекта или исхода, или фенотипа. Желаемые эффекты лечения включают предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение состояния болезни, и ремиссию или улучшенный прогноз, но не ограничиваются ими. Термины включают, но не подразумевают, полное излечение заболевания или полное устранение любого симптома или воздействия(-й) на все симптомы или исходы.

**[00449]** В контексте данного документа, в некоторых вариантах осуществления лечение, предусмотренное в данном документе, задерживает развитие заболевания или нарушения, например, задержку, препятствование, замедление, торможение, стабилизацию, подавление и/или откладывание развития заболевания (такого как злокачественное новообразование). Эта задержка может быть различной продолжительности в зависимости от истории болезни и/или индивида, который подлежит лечению. Как очевидно для специалиста в данной области техники, достаточная или значительная задержка может, по сути, включать предотвращение, поскольку у индивида не развивается заболевание или нарушение. Например, поздняя стадия злокачественного новообразования, такая как развитие метастазирования, может быть отсрочена. В других вариантах осуществления способ или применение, предусмотренные в данном документе, предотвращают заболевание или нарушение.

**[00450]** В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой ассоциированное с GUCY2C заболевание или нарушение. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой колоректальный рак, рак желудка или рак пищевода.

**[00451]** В некоторых вариантах осуществления способы включают адоптивную клеточную терапию, при которой субъекту вводят генетически модифицированные клетки, экспрессирующие предложенные CAR, нацеленные на GUCY2C. Такое введение может стимулировать активацию клеток (например, активацию Т-клеток) направленным на GUCY2C образом, так что клетки, связанные с заболеванием или нарушением, становятся мишенью для уничтожения.

**[00452]** В некоторых вариантах осуществления способы включают введение клеток или композиции, содержащей клетки, субъекту, ткани или клетке, например, имеющему, подверженному риску или подозреваемому в наличии заболевания или нарушения. В

некоторых вариантах осуществления клетки, популяции и композиции вводят субъекту, страдающему конкретным заболеванием или нарушением, которое необходимо лечить, например, с помощью адоптивной клеточной терапии, такой как адоптивная Т-клеточная терапия. В некоторых вариантах осуществления клетки или композиции вводят субъекту, такому как субъект, имеющий заболевание или нарушение или подверженный риску его развития. В некоторых вариантах осуществления способы таким образом обеспечивают лечение, например, облегчают один или более симптомов заболевания или нарушения, например, путем уменьшения опухолевой массы при злокачественном новообразовании, экспрессирующем GUCY2C.

**[00453]** Способы введения клеток для адоптивной клеточной терапии известны, как описано, например, в публикации заявки на патент США № 2003/0170238; патенте США № 4690915; Rosenberg, *Nat Rev Clin Oncol.* 8 (10):577-85 (2011); Themeli et al., *Nat Biotechnol.* 31(10): 928-933 (2013); Tsukahara et al., *Biochem Biophys Res Commun* 438(1): 84-9 (2013); и Davila et al., *PLoS ONE* 8(4): e61338 (2013). Эти способы могут быть использованы в связи со способами и композициями, представленными в данном документе.

**[00454]** В некоторых вариантах осуществления клеточную терапию (например, адоптивную Т-клеточную терапию) проводят путем аутологичного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, который должен получить клеточную терапию, или из образца, полученного от такого субъекта. Таким образом, в некоторых аспектах клетки получают от субъекта, нуждающегося в лечении, и клетки после выделения и обработки вводят тому же субъекту. В других вариантах осуществления клеточную терапию (например, адоптивную Т-клеточную терапию) проводят путем аллогенного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают от субъекта, отличного от субъекта, который должен получить или который в конечном итоге получит клеточную терапию, например, от первого субъекта. В таких вариантах осуществления клетки затем вводят другому субъекту, например, второму субъекту того же вида. В некоторых вариантах осуществления первый и второй субъекты генетически идентичны. В некоторых вариантах осуществления первый и второй субъекты генетически сходны. В некоторых вариантах осуществления второй субъект экспрессирует тот же класс или супертип HLA, что и первый субъект.

**[00455]** В некоторых вариантах осуществления субъект, которому вводят клетки, клеточные популяции или композиции, представляет собой примата, такого как человек. Субъект может быть мужчиной или женщиной и может быть любого подходящего возраста, включая младенцев, подростков, юношей, взрослых и пожилых людей. В некоторых примерах субъект представляет собой утвержденную модель животного заболевания,

восприимчивую к адоптивной клеточной терапии и/или для оценки токсических воздействий.

**[00456]** Молекулы, связывающие GUCY2C, такие как VHN и химерные рецепторы, содержащие VHN, и клетки, экспрессирующие их, можно вводить любым подходящим способом, например, путем инъекции, например, внутривенной или подкожной инъекции, внутриглазной инъекции, периокулярной инъекции, субретинальной инъекции, интравитреальной инъекции, трансептальной инъекции, субсклеральной инъекции, интрахориоидальной инъекции, интракамеральной инъекции, субконъюнктивной инъекции, субконъюнктивальной инъекции, инъекции в субтеноново пространство, ретробульбарной инъекции, перибульбарной инъекции или инъекции в заднее окологсклеральное пространство. В некоторых вариантах осуществления их вводят парентерально, внутрилегочно и интраназально, и, при необходимости местного лечения, внутриочаго. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение.

**[00457]** Количество предлагаемого в данном документе профилактического или терапевтического агента, которое будет эффективным для предотвращения и/или лечения заболевания или патологического состояния, можно определить стандартными клиническими методами. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных в тест-системах *in vitro* или на животных моделях. Для профилактики или лечения заболевания подходящая доза связывающей молекулы или клетки может зависеть от типа заболевания или нарушения, подлежащего лечению, типа связывающей молекулы, степени тяжести и течения заболевания или нарушения, от того, является ли терапевтический агент в профилактических или терапевтических целях, предыдущей терапии, истории болезни пациента и реакции на агент, а также на усмотрение лечащего врача. Композиции, молекулы и клетки в некоторых вариантах осуществления целесообразно вводить пациенту за один раз или в течение ряда курсов.

**[00458]** Например, в зависимости от типа и степени тяжести заболевания дозы антител могут составлять от около 10 мкг/кг до 100 мг/кг или более. Несколько доз можно вводить с перерывами. Может быть введена начальная более высокая нагрузочная доза, за которой следует одна или несколько более низких доз. В некоторых вариантах осуществления, где фармацевтическая композиция содержит любое из однодоменных антител, описанных в данном документе, фармацевтическую композицию вводят в дозе от около 10 нг/кг до около 100 мг/кг массы тела индивида или более в день, например, от около 1 мг/кг/день до 10 мг/кг/день, в зависимости от пути введения. Рекомендации относительно конкретных дозировок и способов доставки приведены в литературе (см., например, патенты США №№

4657760, 5206344 и 5225212).

**[00459]** В контексте генетически сконструированных клеток, содержащих связывающие молекулы, в некоторых вариантах осуществления субъекту можно вводить от около одного миллиона до около 100 миллиардов клеток и/или такое количество клеток на килограмм массы тела. В некоторых вариантах осуществления, где фармацевтическая композиция содержит любую из сконструированных иммунных клеток, описанных в настоящем документе, фармацевтическую композицию вводят в дозе от около  $10^4$  до  $10^9$  клеток/кг массы тела индивида. Дозировки могут варьироваться в зависимости от признаков, характерных для заболевания или нарушения и/или пациента, и/или других видов лечения.

**[00460]** В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят один раз. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят некоторое количество раз (например, 2, 3, 4, 5, 6 или более раз). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят один или более раз в течение цикла дозирования. Цикл дозирования может составлять, например, 1, 2, 3, 4, 5 или более недель или 1, 2, 3, 4, 5 или более месяцев. Специалист в области медицины может определить оптимальную дозировку и схему лечения для конкретного пациента путем наблюдения пациента в отношении признаков заболевания и соответствующей корректировки лечения.

**[00461]** В некоторых вариантах осуществления клетки или антитела вводят как часть комбинированного лечения, например, одновременно или последовательно, в любом порядке, с другим терапевтическим вмешательством, например, применением другого антитела или сконструированной клетки, или рецептора, или агента, такого как цитотоксический или терапевтический агент.

**[00462]** В некоторых вариантах осуществления клетки или антитела вводят совместно с одним или более дополнительными терапевтическими агентами или в связи с другим терапевтическим вмешательством либо одновременно, либо последовательно в любом порядке. В некоторых контекстах клетки вводят совместно с другой терапией, достаточно близкой по времени, так что клеточные популяции усиливают эффект одного или более дополнительных терапевтических агентов или наоборот. В некоторых вариантах осуществления клетки или антитела вводят до введения одного или более дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления клетки или антитела вводят после одного или более дополнительных терапевтических агентов.

**[00463]** В некоторых вариантах осуществления после введения клеток млекопитающему (например, человеку) биологическую активность сконструированных клеточных популяций и/или антител измеряют любым из ряда известных способов. Параметры для оценки включают специфическое связывание сконструированной или природной Т-клетки

или другой иммунной клетки с антигеном *in vivo*, например, с помощью визуализации, или *ex vivo*, например, с помощью ИФА или проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления способность сконструированных клеток разрушать клетки-мишени можно определить с помощью любого подходящего метода, известного в данной области техники, такого как анализы цитотоксичности, описанные, например, в Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009), и Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004). В некоторых вариантах осуществления биологическую активность клеток также можно измерить с помощью анализа экспрессии и/или секреции определенных цитокинов, таких как CD107a, IFN $\gamma$ , IL-2 и TNF. В некоторых аспектах биологическую активность измеряют путем оценки клинического исхода, такого как уменьшение опухолевого бремени или нагрузки.

**[00464]** В некоторых конкретных вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающий введение субъекту связывающей молекулы, содержащей однодоменное антитело, которое связывается с GUCY2C, как описано в разделе 5.2 выше, включая, например, те, которые имеют CDR из таблицы 7, например, sdAb к GUCY2C содержит (i) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35; (ii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36; (iii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; (iv) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; (v) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; (vi) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; (vii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; CDR2, включающую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; или (viii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления sdAb содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, или SEQ ID NO: 10, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, или SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой ассоциированное с GUCY2C заболевание или нарушение. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой колоректальный рак, рак желудка или рак пищевода.

**[00465]** В других вариантах осуществления в данном документе предложен способ лечения заболевания или нарушения, включающий введение субъекту сконструированной иммунной эффекторной клетки (такой как Т-клетка), как описано в разделе 5.4, включая, например, клетки, содержащие CAR, представленные в разделе 5.3. В некоторых вариантах осуществления сконструированная иммунная клетка, вводимая субъекту, содержит CAR, содержащий полипептид, содержащий: (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий одно или более sdAb к GUCY2C; (b) трансмембранный домен; и (c) внутриклеточный сигнальный домен, где sdAb к GUCY2C является таким, как описано в разделе 5.2 выше, включая, например, те, которые имеют CDR из таблицы 7, например sdAb к GUCY2C содержит (i) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35; (ii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36; (iii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37; (iv) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; CDR2, включающую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; (v) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39; (vi) CDR1 включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40; (vii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; или (viii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42. sdAb в CAR сконструированных по настоящему изобретению клеток также включают те, которые содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, и те, которые содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления сконструированная иммунная клетка, вводимая субъекту, содержит CAR, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 55, или содержащий полипептид, имеющий по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой ассоциированное с GUCY2C заболевание или нарушение. В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой колоректальный рак, рак желудка или рак пищевода.

### 5.7.2. Способы диагностики и обнаружения и их применение

**[00466]** В еще одном аспекте в данном документе предложены способы, включающие применение связывающих молекул, представленных в данном документе, например, VHH, которые связывают GUCY2C, и молекул (таких как конъюгаты и комплексы), содержащих такие VHH, для обнаружения, прогнозирования, диагностики, определения стадии, определения связывания конкретного средства для лечения с одной или более тканями или типами клеток и/или информирование субъекта о решениях относительно лечения, например, путем обнаружения GUCY2C и/или присутствия его эпитопа, распознаваемого антителом.

**[00467]** В некоторых вариантах осуществления предложено антитело к GUCY2C (такое как любое однодоменное антитело к GUCY2C, описанное в данном документе) для применения в способе диагностики или обнаружения. В дополнительном аспекте предложен способ обнаружения присутствия GUCY2C в биологическом образце. В определенных вариантах осуществления способ включает определение присутствия белка GUCY2C в биологическом образце. В определенных вариантах осуществления GUCY2C представляет собой GUCY2C человека. В некоторых вариантах осуществления способы представляют собой диагностические и/или прогностические способы в отношении заболевания или нарушения, экспрессирующего GUCY2C. Способы в некоторых вариантах осуществления включают инкубацию и/или исследование биологического образца с использованием антитела и/или введение антитела субъекту. В некоторых вариантах осуществления биологический образец включает клетку или ткань или их часть, например, опухоль или раковую ткань, или биоптат, или ее участок. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт осуществляют в условиях, допускающих связывание антитела к GUCY2C с GUCY2C, присутствующим в образце. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают определение того, образуется ли комплекс между антителом к GUCY2C и GUCY2C в образце, например, определение наличия или отсутствия или уровня такого связывания. Такой способ может представлять собой способ *in vitro* или *in vivo*. В одном варианте осуществления антитело к GUCY2C используется для отбора субъектов, подходящих для терапии антителом к GUCY2C или сконструированным антигенным рецептором, например, где GUCY2C является биомаркером для отбора пациентов.

**[00468]** В некоторых вариантах осуществления образец, такой как клетка, образец ткани, лизат, композиция или другой полученный из него образец, приводят в контакт с антителом к GUCY2C и определяют или обнаруживают связывание или образование комплекса между антителом и образцом (например, GUCY2C в образце). Когда связывание в тестируемом образце продемонстрировано или обнаружено по сравнению с эталонной клеткой того же

типа ткани, это может указывать на наличие ассоциированного заболевания или нарушения и/или на то, что терапевтический агент, содержащий антитело, будет специфически связываться с тканью или клеткой, которая является такой же или того же типа, что и ткань, клетка или другой биологический материал, из которого получен образец. В некоторых вариантах осуществления образец получен из тканей человека и может быть из пораженной и/или нормальной ткани, например, от субъекта, имеющего заболевание или нарушение, подлежащее лечению, и/или от субъекта того же вида, что и данный субъект, но не имеющий заболевания или нарушения, подлежащего лечению. В некоторых случаях нормальная ткань или клетка получена от субъекта, имеющего заболевание или нарушение, подлежащее лечению, но сама по себе не является пораженной клеткой или тканью, например, нормальной тканью из того же или другого органа, отличного от того, в котором присутствует злокачественное новообразование у данного субъекта.

**[00469]** Можно использовать различные способы, известные в данной области техники для обнаружения специфического связывания антитело-антиген. Иллюстративные иммуноанализы включают флуоресцентный поляризационный иммуноанализ (FPIA), флуоресцентный иммуноанализ (FIA), иммуноферментный анализ (EIA), нефелометрический иммуноанализ ингибирования (NIA), твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) и радиоиммуноанализ (РИА). Индикаторный фрагмент или группа в виде метки могут быть использованы таким образом, чтобы удовлетворить потребности различных применений способа, которые часто диктуются наличием оборудования для анализа и совместимых процедур иммунологического анализа. Примеры меток включают радионуклиды (*например*,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ , или  $^{32}\text{P}$  и/или хром ( $^{51}\text{Cr}$ ), кобальт ( $^{57}\text{Co}$ ), фтор ( $^{18}\text{F}$ ), гадолиний ( $^{153}\text{Gd}$ ,  $^{159}\text{Gd}$ ), германий ( $^{68}\text{Ge}$ ), гольмий ( $^{166}\text{Ho}$ ), индий ( $^{115}\text{In}$ ,  $^{113}\text{In}$ ,  $^{112}\text{In}$ ,  $^{111}\text{In}$ ), йод ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{121}\text{I}$ ), лантан ( $^{140}\text{La}$ ), лютеций ( $^{177}\text{Lu}$ ), марганец ( $^{54}\text{Mn}$ ), молибден ( $^{99}\text{Mo}$ ), палладий ( $^{103}\text{Pd}$ ), фосфор ( $^{32}\text{P}$ ), празеодим ( $^{142}\text{Pr}$ ), прометий ( $^{149}\text{Pm}$ ), рений ( $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ), родий ( $^{105}\text{Rh}$ ), рутений ( $^{97}\text{Ru}$ ), самарий ( $^{153}\text{Sm}$ ), скандий ( $^{47}\text{Sc}$ ), селен ( $^{75}\text{Se}$ ), ( $^{85}\text{Sr}$ ), сера ( $^{35}\text{S}$ ), технеций ( $^{99}\text{Tc}$ ), таллий ( $^{201}\text{Tl}$ ) олово ( $^{113}\text{Sn}$ ,  $^{117}\text{Sn}$ ), тритий ( $^3\text{H}$ ), ксенон ( $^{133}\text{Xe}$ ), иттербий ( $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ), иттрий ( $^{90}\text{Y}$ ), ферменты (*например*, щелочную фосфатазу, пероксидазу хрена, люциферазу или  $\beta$ -лактозидазу), флуоресцентные фрагменты или белки (*например*, флуоресцеин, родамин, фикоэритрин, GFP или BFP) или люминесцентные фрагменты (*например*, наночастицы Qdot™, поставляемые Quantum Dot Corporation, Palo Alto, штат Калифорния). Известны различные общие методики, используемые при проведении различных иммунологических анализов, упомянутых выше.

**[00470]** В некоторых вариантах осуществления предложены меченые антитела (такие как однодоменные антитела к GUCY2C). Метки включают, но не ограничиваются ими, метки

или фрагменты, которые обнаруживаются напрямую (такие как флуоресцентные, хромофорные, электронно-плотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), а также фрагменты, такие как ферменты или лиганды, которые обнаруживаются косвенно, *например*, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия. В других вариантах осуществления антитела не мечены, и их присутствие можно обнаружить с помощью меченого антитела, которое связывается с любым из антител.

### **5.8. Наборы и промышленные изделия**

**[00471]** Кроме того, предложены наборы, стандартные дозы и промышленные изделия, содержащие любое из однодоменных антител, химерных антигенных рецепторов или сконструированных иммунных эффекторных клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления предложен набор, который содержит любые из описанных в данном документе фармацевтических композиций, предпочтительно с инструкциями по применению.

**[00472]** Наборы по настоящему изобретению находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает, но не ограничивается ими, флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и тому подобное. Наборы могут необязательно содержать дополнительные компоненты, такие как буферы, и пояснительную информацию. Таким образом, в настоящей заявке также предложены готовые изделия, которые включают флаконы (такие как герметично закрываемые флаконы), бутылки, банки, гибкую упаковку и т. п.

**[00473]** Готовое изделие может включать контейнер и этикетку или листок-вкладыш на контейнере или связанный с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и т.д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Как правило, контейнер содержит композицию, которая эффективна для лечения заболевания или нарушения (такого как злокачественное новообразование), описанного в данном документе, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для растворов для внутривенного введения или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). На этикетке или листке-вкладыше указано, что композицию используют для лечения конкретного патологического состояния у индивида. Этикетка или листок-вкладыш дополнительно содержит инструкции по введению композиции индивиду. На этикетке могут быть приведены указания по восстановлению и/или применению. Контейнер, содержащий фармацевтическую композицию, может представлять собой многоразовый флакон, который позволяет осуществлять повторные введения (например, 2–6 повторных введения) восстановленного состава. Листок-вкладыш относится к

инструкциям, обычно включаемым в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, противопоказаниях и/или предостережениях относительно применения таких терапевтических продуктов. Кроме того, готовое изделие может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (БВДИ), фосфатно-солевой буферный раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он может дополнительно содержать другие материалы, необходимые с коммерческой и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

**[00474]** Наборы или готовые изделия могут содержать многодозовые дозы фармацевтической композиции и инструкции по применению, упакованные в количестве, достаточном для хранения и применения в аптеках, например, аптеках при больницах и рецептурных аптеках.

**[00475]** В целях краткости в данном документе используются определенные аббревиатуры. Одним из примеров является однобуквенное обозначения для представления аминокислотных остатков. Аминокислоты и их соответствующие трехбуквенные и однобуквенные обозначения представлены следующим образом:

<b>Аминокислота</b>	<b>Трехбуквенный код</b>	<b>Однобуквенный код</b>
аланин	Ala	(A)
аргинин	Arg	(R)
аспарагин	Asn	(N)
аспарагиновая кислота	Asp	(D)
цистеин	Cys	(C)
глутаминовая кислота	Glu	(E)
глутамин	Gln	(Q)
глицин	Gly	(G)
гистидин	His	(H)
изолейцин	Ile	(I)
лейцин	Leu	(L)
лизин	Lys	(K)
метионин	Met	(M)
фенилаланин	Phe	(F)
пролин	Pro	(P)
серин	Ser	(S)

треонин	Thr	(T)
триптофан	Trp	(W)
тирозин	Tyr	(Y)
валин	Val	(V)

**[00476]** Данное изобретение, как правило, раскрыто в данном документе с использованием утверждений для описания многочисленных вариантов осуществления. Данное изобретение также явным образом включает варианты осуществления, в которых исключен конкретный объект, полностью или частично, такой как вещества или материалы, этапы и условия способа, протоколы, процедуры, методы оценки или анализа. Таким образом, даже несмотря на то, что изобретение, как правило, не выражено в данном документе в тех терминах, которые изобретение не включает, аспекты, которые явно не включены в изобретение, тем не менее раскрыты в данном документе.

**[00477]** Был описан ряд вариантов осуществления изобретения. Тем не менее понятно, что можно осуществлять различные модификации, не выходя за рамки сути и объема изобретения. Тем не менее понятно, что можно осуществлять различные модификации, не выходя за рамки сути и объема изобретения.

## **6. ПРИМЕРЫ**

**[00478]** Нижеследующее представляет собой описание различных методов и материалов, использованных в исследованиях, и представлено для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как осуществить и использовать данное изобретение, и не предназначено для того, чтобы ограничить объем того, что изобретатели считают своим изобретением, а также они не предназначены для представления того, что эксперименты, описанные ниже, были проведены и являются всеми экспериментами, которые могут быть выполнены. Следует понимать, что примерные описания, написанные в настоящем времени, не обязательно выполнялись, а скорее описания могут выполняться для генерирования данных и т.п., связанных с принципами настоящего изобретения. Были приняты меры для сохранения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, процентов и *т. д.*), однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения.

### **6.1. Пример 1 — Получение VHH к GUCY2C**

#### **Иммунизация альпаки**

**[00479]** Внеклеточная область искусственно синтезированного белка GUCY2C была синтезирована компанией Nanjing GenScript Biotechnology Co., Ltd. (последовательность UniProtKB: P25092, Ser24-Gln430) для иммунизации альпаки. Он включает

последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (см. таблицу 1). Каждый раз 100 мкг белка GUCY2C смешивали с адьювантом в равных объемах. Полный адьювант Фрейнда использовали только при первичной иммунизации, в то время как в остальных используют неполные адьюванты Фрейнда. Альпаку иммунизировали семь раз в неделю для стимуляции В-клеток к экспрессии антигенспецифических наноантител. В период иммунизации у альпаки отбирали небольшое количество периферической крови для определения титра антител. После иммунизации отбирали 200 мл периферической крови альпаки и экстрагировали тотальную РНК тризолом.

**Таблица 1. Последовательности пептидов GUCY2C**

Описание	Последовательность	SEQ ID NO.
Белок GUCY2C (Ser24-Gln430) (Нуклеиновая кислота)	TCTCAAGTGTCCCAGAACTGCCACAACGGCA GCTACGAGATCAGCGTGCTGATGATGGGCAA CAGCGCCTTTGCCGAGCCTCTGAAGAACCTG GAAGATGCCGTGAACGAAGGCCTGGAAATCG TGCGAGGCAGACTGCAGAATGCCGGCCTGAA CGTGACCGTGAACGCCACCTTTATGTACAGC GACGGCCTGATCCACAACAGCGGCGACTGTA GAAGCAGCACCTGTGAAGGACTGGACCTGCT GCGGAAGATCAGCAACGCCAGAGAATGGG CTGTGTGCTGATCGGCCCTAGCTGCACCTACA GCACCTTCCAGATGTACCTGGACACCGAGCT GAGCTACCCCATGATCAGCGCCGGATCTTTC GGCCTGAGCTGCGACTACAAAGAGACACTGA CCCGGCTGATGAGCCCCGCCAGAAAGCTGAT GTA CTTCCTGGTCAACTTCTGGAAAACGAAC GACCTGCCTTTCAAGACCTACAGCTGGTCCAC CAGCTACGTGTACAAGAACGGCACCGAGACA GAGGACTGCTTCTGGTATCTGAACGCCCTGG AAGCCAGCGTGTCTACTTTTCTCACGAGCTG GGCTTCAAGGTGGTGCTGCGGCAGGACAAAG AGTTCCAGGACATCCTGATGGACCACAACCG GAAGTCCAACGTGATCATCATGTGCGGCGGA CCCGAGTTCCTGTACAAGCTGAAAGGCGATA	SEQ ID NO: 1

	GAGCCGTGGCCGAGGACATCGTGATCATTCT GGTGGATCTGTTCAACGACCAGTACTTCGAG GACAATGTGACAGCCCCTGACTACATGAAGA ACGTGCTGGTGCTGACACTGAGCCCCGGCAA CAGTCTGCTGAACAGCAGCTTCAGCCGGAAT CTGAGCCCCACCAAGAGAGATTTTCGCCCTGG CCTACCTGAACGGCATCCTGCTGTTTGGCCAC ATGCTGAAGATCTTTCTCGAAAACGGCGAGA ACATCACGACCCCTAAGTTCGCCCACGCCTTC CGGAACCTGACCTTCGAGGGATATGACGGCC CCGTGACACTGGATGACTGGGGAGATGTGGA CAGCACAATGGTGCTGCTGTACACCAGCGTG GACACCAAAAAGTACAAAGTGCTGCTGACCT ACGACACCCACGTGAACAAGACATACCCCGT GGACATGAGCCCTACCTTCACATGGAAGAAC AGCAAGCTGCCCAACGACATCACCGGCAGAG GACCTCAG	
Белок GUCY2C (Ser24-Gln430) (Аминокислотная)	SQVSNCHNGSYEISVLMMGNSAFAEPLKNLE DAVNEGLEIVRGLQNAGLNVTVNATFMYS DG LIHNSGDCRSSTCEGLDLLRKISNAQRMGCVLI GPSCTYSTFQMYLDTELSYPMISAGSFGLSCDY KETLTRLMS PARKLMYFLVNFWKTN DL PFKTY SWSTSYVYKNGTETEDCFWYLNAL EASVSYFS HELGFKV VLRQDKEFQDILMDHNRKSNVIIMC GGPEFLYKLG DRAVAEDIV IILVDLFNDQYFE DNVTAPDYMKNVLVLTLSPGNSLLNSSFSRNLS PTKRDFALAYLNGILLFGHMLKIFLENGENITTP KFAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDVDSTMV LLYTSVDTKKYKVLLTYDTHVNKTYPVDMSP T FTWKNSKLPNDITGRGPQ	SEQ ID NO: 2

#### Создание библиотеки фагов наноантител

[00480] Экстрагированную тотальную РНК использовали для синтеза кДНК с помощью набора для обратной транскрипции PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara), а цепь V<sub>H</sub>H амплифицировали с помощью двухэтапной ПЦР. Ген тяжелой цепи антитела получали с помощью первой ПЦР. Используя кДНК в качестве матрицы ПЦР, в систему

ПЦР добавляли прямые и обратные праймеры, покрывающие иммуноглобулин IgG, для амплификации различных подтипов IgG, а затем гены IgG2 и IgG3 выделяли с помощью набора TaKaRa MiniBEST для выделения ДНК из агарозного геля. Ген VHH с сайтом рестрикции получали с помощью второй ПЦР. Фрагмент гена, восстановленный с помощью первой ПЦР, использовали в качестве матрицы. Праймеры, охватывающие последовательность VHH областей тяжелой цепи IgG2 и IgG3 с сайтами рестрикции SacI и SpeI, добавляли в систему ПЦР для амплификации большого количества ДНК VHH для фаговой библиотеки. Наконец, продукты ПЦР очищали с помощью набора для очистки ДНК.

### **Рестрикционное расщепление, лигирование, электротрансформация и идентификация фаговой библиотеки гена VHH и pComb3XSS**

[00481] Последовательность гена VHH, полученную во второй ПЦР, и фазмиду pComb3XSS (addgene) расщепляли рестрикционными ферментами SacI (NEB) и SpeI (NEB) и помещали на водяную баню при 37°C на 4 часа. После очистки и восстановления образцы инкубировали в течение ночи при 4°C с ДНК-лигазой T4. Затем 200 мкг рекомбинантной плазмиды добавляли в компетентные клетки *E.coli* TG1 и подвергали электропорации с помощью электропоратора. Затем добавляли среду SOC и смесь вращали в инкубаторе при 37 °C в течение 1 часа. 200 мкл раствора бактерий брали с 10-кратным градиентным разведением для выскабливания чашек с твердой средой 2×YT, и бактерии культивировали в течение ночи в инкубаторе при 37 °C. На следующий день вместимость библиотеки рассчитывали как  $1 \times 10^8$  КОЕ исходя из количества колоний на чашке. Двадцать три клона были выбраны случайным образом, и прямые и обратные праймеры, сконструированные для pComb3XSS, были добавлены в систему ПЦР для ПЦР для отбора колоний. Было определено, что частота вставки для фаговой библиотеки превышает 95% (Фиг. 1). Были отобраны случайным образом 100 клонов и отправлены в Anhui Generalbio Co., Ltd. для секвенирования. Эффективная частота вставок превышала 90%, что доказывает, что библиотека была успешно сконструирована.

### **Скрининг наноантител в отношении белка GUCY2C**

[00482] Белок GUCY2C растворяли в 0,1 mM pH 7,2 PBS, 5 мкг белка наносили на планшет для высокоаффинного ИФА и инкубировали при 4 °C в течение ночи. Покрывающий белок удаляли на следующий день и добавляли 5% BSA для запечатывания планшета для ИФА при комнатной температуре в течение 2 часов. Блокирующий раствор удаляли, а затем  $1 \times 10^{11}$  КОЕ фага добавляли в планшет для ИФА и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Несвязавшиеся фаги 8 раз промывали PBST (PBS+0,05% Tween20). Связанные фаги элюировали 0,1 M раствором глицина с pH 2,0 в течение 8 минут

и добавляли 2 М Трис для остановки реакции. Элюированные фаги инфицировали бактериями TG1 в логарифмической фазе роста, фаги амплифицировали и очищали от бактерий TG1 для следующего раунда скрининга. Тот же метод скрининга повторяли 3 раза, и повторно выявляемые фаги использовали для выявления положительных клонов с помощью ИФА.

**[00483]** Фаги 3 раундов скрининга трансфицировали в бактерии HB2151, и 100 мкл инфицированных бактерий HB2151 отбирали для соскоба с поверхности чашки для культивирования с твердой средой 2×YT-AG. Отбирали 96 отдельных клонов и добавляли их в среду 2×YT, затем культивировали в 96-луночной планшете с глубокими лунками. 0,8 mM IPTG добавляли в среду, когда бактерии достигали логарифмической фазы, и культивировали в течение ночи при 25 °C. Супернатант среды добавляли в планшет для ИФА, покрытый 1 мкг/мл GUCY2C, который содержался в двух контрольных лунках. После инкубации в течение 2 часов при 37°C, планшет промывали 3 раза PBST. Конъюгированный с пероксидазой козий домен VHH к IgG альпаки AffiniPure (Jackson Immuno Research) добавляли в планшет для ИФА, инкубировали при 37°C в течение 1 часа и промывали 3 раза PBST. Добавляли раствор ТМВ на 20 минут, затем реакцию останавливали 2М серной кислоты. Значение поглощения при длине волны 450 нм считывали на устройстве для микропланшетного ридера (**Фиг. 2**). Клоны со значением поглощения в 2,1 раза выше, чем в отрицательном контроле, считались положительными клонами и отправлялись на секвенирование.

**[00484]** Аминокислотные и нуклеиновые последовательности иллюстративных доменов VHH показаны в таблице 2, а иллюстративные последовательности CDR (в соответствии с системой нумерации Kabat) этих иллюстративных доменов VHH показаны в таблице 3 ниже. Выравнивание этих иллюстративных доменов VHH показано на **Фиг. 3**, которая показывает высокий процент общих аминокислот среди этих полных последовательностей, а также областей CDR. CDR1 имеет консенсусную последовательность  $X_1YGMX_2$ , где  $X_1$  представляет собой A, I или V, а  $X_2$  представляет собой D или G (SEQ ID NO: 64). CDR2 имеет консенсусную последовательность  $X_3IX_4LSGRX_5X_6YX_7DAVX_8G$ , где  $X_3$  представляет собой A, S или T;  $X_4$  представляет собой F, W или Y;  $X_5$  представляет собой S или T;  $X_6$  представляет собой E, N или T;  $X_7$  представляет собой A, S или T; и  $X_8$  представляет собой K или Q (SEQ ID NO: 65). CDR3 имеет консенсусную последовательность  $GX_9X_{10}TAX_{11}SX_{12}RQY$ , где  $X_9$  представляет собой A, E или P;  $X_{10}$  представляет собой P или T;  $X_{11}$  представляет собой S или T; и  $X_{12}$  представляет собой G или V (SEQ ID NO: 66).

**Таблица 2. Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот иллюстративных доменов VHH**

Описание	Последовательность	SEQ ID NO.
C08(аминокислотная)	MEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSNIFRA YGMGWYRQAPGKQREMVAAIWLSGRTEYA DAVQGRFTVSRDNAKNTVYLMNSLKPEDT AVYYCNAGPPTATSVRQYWGGGTQVTVSSE PKTPKP	SEQ ID NO: 3
C12(аминокислотная)	MQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSNIFR AYGMDWYRQAPGKQREMVATIWLSSGRSTYT DAVKGRFTISRDNKNTVYLMNNLKPEDTA VYYCNAGPTTASSVRQYWGGGTQVTVSSEP KTPKP	SEQ ID NO: 4
C13(аминокислотная)	MQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSNIFR AYGMDWYRQAPGKQREMVATIWLSSGRSTYT DAVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTA VYYCNAGAPTASSGRQYWGGGTQVTVSSEP KTPKP	SEQ ID NO: 5
C15(аминокислотная)	MQVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASSNIFR AYGMDWYRQAPGKQREMVATIWLSSGRSTYT DAVQGRFTISRDNKNTVYLMNNLKPEDTA VYYCNAGPTTASSVRQYWGGGTQVTVSSEP KTPKP	SEQ ID NO: 6
C21(аминокислотная)	MQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSSNIFRI YGMWYRQAPGKQREIVATIYLSGRTTYSDA VKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVY YCNAGEPTASSVRQYWGGGTQVTVSSEP KTPKP	SEQ ID NO: 7
C27(аминокислотная)	MEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTSSSNIFKI YGMWYRQAPGKQREIVATIYLSGRTTYSDA VKGRFTISRDNKNTVYLMNTLKPEDTAVY YCNAGETTASSVRQYWGGGTQVTVSSEP KTPKP	SEQ ID NO: 8

С30(аминокислотная)	MQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFR VYGMDWYRQAPGKQRELVASIFLSGRTNYA DAVKGRFTLSRDNAKNTMYLQMNSLKPEDT AVYYCNAGETTASSVRQYWGGGTQVTVSSE PKTPKP	SEQ ID NO: 9
С31(аминокислотная)	MAVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFR VYGMDWYRQAPGKQRELVASIWLSGRTNYA DAVKGRFTLSRDNAKNTMYLQMNSLKPEDT AVYYCNAGETTASSVRQYWGGGTQVTISSEP KTPKP	SEQ ID NO: 10
С08 (нуклеиновая кислота)	ATGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGTTTGGTGCAACCTGGGGGGTCTCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTTCAAACATCTTCA GAGCCTATGGCATGGGGTGGTACCGCCAGG CTCCAGGGAAGCAGCGCGAAATGGTCGCGG CTATTTGGCTCAGTGGTCGCACAGAGTATG CTGACGCCGTGCAGGGCCGATTACCGTCT CCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATC TGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACA CGGCCGTCTATTA CTGTAATGCAGGTCCCC TACAGCAACTTCCGTCCGTCAATACTGGGG CCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGA ACCCAAGACACCAAAACCA	SEQ ID NO: 11
С12 (нуклеиновая кислота)	ATGCAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGTTTGGTGCAACCTGGGGGGTCTCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTTCAAACATCTTCA GAGCCTATGGCATGGATTGGTACCGCCAGG CTCCAGGAAAGCAGCGCGAAATGGTCGCGA CTATCTGGCTGAGTGGTCGCTCAACGTATA CTGACGCCGTGAAGGGCCGATTACCATCT CCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATC TGCAAATGAACAACCTGAAACCTGAGGACA CGGCCGTCTATTA CTGTAATGCAGGTCCCA CTACGGCAAGTTCCGTCCGTCAATACTGGG	SEQ ID NO: 12

	GCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAG AACCCAAGACACCAAAAACCA	
C13(нуклеиновая кислота)	ATGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGTTTGGTGCAACCTGGGGGGTCTCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTTCAAACATCTTCA GAGCCTATGGCATGGACTGGTACCGCCAGG CTCCAGGGAAGCAGCGCGAAATGGTCGCGA CTATCTGGCTTAGTGGTCGCACAACGTATA CTGACGCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCT CCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATC TGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACA CGGCCGTCTATTACTGTAATGCAGGTGCC CTACGGCAAGTTCCGGCCGTCAATACTGGG GCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAG AACCCAAGACACCAAAAACCA	SEQ ID NO: 12
C15(нуклеиновая кислота)	ATGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGGGTGGTGCAACCTGGGGGGTCTCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTTCAAATATCTTTA GAGCCTATGGCATGGATTGGTACCGCCAGG CTCCAGGAAAGCAGCGCGAAATGGTCGCGA CTATCTGGCTGAGTGGTCGCTCAACGTATA CTGACGCCGTACAGGGCCGATTCACCATCT CCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATC TGCAAATGAACAACCTGAAACCTGAGGACA CGGCCGTCTATTACTGTAATGCAGGTCCCA CTACGGCAAGTTCCGTCCGTCAATACTGGG GCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAG AACCCAAGACACCAAAAACCA	SEQ ID NO: 14
C21(нуклеиновая кислота)	ATGCAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGTTTGGTGCAACCTGGGGGGTCTCTGAGA CTCTCCTGTACAAGCTCTTCAAACATCTTCA GAATCTATGGCATGGACTGGTACCGCCAGG CTCCAGGGAAGCAGCGCGAAATAGTCGCGA CTATCTATCTTAGTGGTCGCACAACGTATAG	SEQ ID NO: 15

	TGACGCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTC CAGAGACAACGCCAAGGACACGGTGTATCT GCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACAC GGCCGTCTATTACTGTAATGCAGGTGAAAC TACGGCAAGTTCCGTCCGTCACTACTGGGG CCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGA ACCCAAGACACCAAAAACCA	
C27(нуклеиновая кислота)	ATGGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGTTTGGTGCAACCTGGGGGGTCTCTGAGA CTCTCCTGTACAAGCTCTTCAAACATCTTCA AAATCTATGGCATGGACTGGTACCGCCAGG CTCCAGGGAACAGCGCGAAATAGTCGCGA CTATCTATCTTAGTGGTCGCACAACGTATAG TGACGCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTC CAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCT GCAAATGAACACCCTGAAACCTGAGGACAC GGCCGTCTATTACTGTAATGCAGGTGAAAC TACGGCAAGTTCCGTCCGTCAATACTGGGG CCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGA ACCCAAGACACCAAAAACCA	SEQ ID NO: 16
C30(нуклеиновая кислота)	ATGCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCA GAGTCTATGGCATGGACTGGTACCGCCAGG CTCCAGGGAAGCAGCGCGAGTTGGTCGCGT CTATTTTCTTAGTGGTAGGACAAACTATGC AGACGCCGTGAAGGGCCGATTCACGCTCTC CAGAGATAACGCCAAGAATACTATGTATCT GCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACAC GGCCGTCTATTATTGTAATGCAGGTGAAAC TACGGCAAGTTCCGTCCGTCAATACTGGGG CCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCAGA ACCCAAGACACCAAAAACCA	SEQ ID NO: 17

C31(нуклеиновая кислота)	ATGGCGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGA CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCA GAGTCTATGGCATGGACTGGTACCGCCAGG CTCCAGGGAAGCAGCGCGAGTTGGTCGCGT CTATTTGGCTTAGTGGTAGGACAACTATG CAGACGCCGTGAAGGGCCGATTCACGCTCT CCAGAGATAACGCCAAGAATACGATGTATC TGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACA CGGCCGTCTATTATTGTAATGCAGGTGAAA CTACGGCAAGTTCCGTCCGTCAATACTGGG GCCAGGGGACCCAGGTCACCATCTCCTCGG AACCCAAGACACCAAAAACCA	SEQ ID NO: 18
--------------------------	---	---------------

**Таблица 3. Аминокислотные последовательности CDR иллюстративных доменов VHH**

Описание	Последовательность	SEQ ID NO.
C08-CDR1	AYGMG	SEQ ID NO: 19
C12-CDR1	AYGMD	SEQ ID NO: 20
C13-CDR1	AYGMD	SEQ ID NO: 21
C15-CDR1	AYGMD	SEQ ID NO: 22
C21-CDR1	IYGMD	SEQ ID NO: 23
C27-CDR1	IYGMD	SEQ ID NO: 24
C30-CDR1	VYGMD	SEQ ID NO: 25
C31-CDR1	VYGMD	SEQ ID NO: 26
C08-CDR2	AIWLSGRTEYADAVQG	SEQ ID NO: 27
C12-CDR2	TIWLSGRSTYTDVAVKG	SEQ ID NO: 28
C13-CDR2	TIWLSGRTTYTDVAVKG	SEQ ID NO: 29
C15-CDR2	TIWLSGRSTYTDVAVQG	SEQ ID NO: 30
C21-CDR2	TIYLSGRTTYSDAVKG	SEQ ID NO: 31
C27-CDR2	TIYLSGRTTYSDAVKG	SEQ ID NO: 32
C30-CDR2	SIFLSGRRTNYADAVKG	SEQ ID NO: 33
C31-CDR2	SIWLSGRRTNYADAVKG	SEQ ID NO: 34
C08-CDR3	GPPTATSVRQY	SEQ ID NO: 35
C12-CDR3	GPTTASSVRQY	SEQ ID NO: 36

C13-CDR3	GAPTASSGRQY	SEQ ID NO: 37
C15-CDR3	GPTTASSVRQY	SEQ ID NO: 38
C21-CDR3	GEPTASSVRQY	SEQ ID NO: 39
C27-CDR3	GETTASSVRQY	SEQ ID NO: 40
C30-CDR3	GETTASSVRQY	SEQ ID NO: 41
C31-CDR3	GETTASSVRQY	SEQ ID NO: 42

### 6.2. Пример 2 — Конструирование химерного антигенного рецептора

**[00485]** Вектор pLVX-WT-G1 модифицировали с использованием вектора pLVX-Puro в качестве матрицы, в котором промотор CMV в векторе pLVX-Puro трансформировали в промотор EF1a, а частичную последовательность химерного антигенного рецептора встраивали в Ef1a вслед за промотором. Последовательность состоит из шарнира CD8, трансмембранной области CD8, 4-1BB и CD3z, аминокислотные последовательности которых представляют собой SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46, соответственно, как показано в таблице 4 ниже. Трансформированный вектор показан на **Фиг. 3А**. Оптимизированную последовательность, содержащую сигнальный пептид CD8, и VHH к GUCY2C вставляли после шарнира CD8 вектора pLVX-WT-G1 путем лигирования для конструирования вектора химерного антигенного рецептора на основе VHH к GUCY2C pLVX-WT-G1-VHH-CAR. Сигнальный пептид CD8 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47 (см. таблицу 4).

**[00486]** Аминокислотные и нуклеиновые последовательности иллюстративного сконструированного химерного антигенного рецептора показаны в таблице 5.

**Таблица 4. Последовательности областей в иллюстративных CAR**

Описание	Последовательность	SEQ ID NO.
Шарнир CD8	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACD	SEQ ID NO: 43
CD8 TM	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	SEQ ID NO: 44
4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL	SEQ ID NO: 45
CD3z	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQK DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGHDGLYQGLSTA TKDITYDALHMQALPPR	SEQ ID NO: 46

Сигнальный пептид CD8	MALPVTALLLPLALLLHAARP	SEQ ID NO: 47
-----------------------	-----------------------	---------------

Таблица 5. Последовательности иллюстративных CAR

Описание	Последовательность	SEQ ID NO.
C08-CAR (аминокислотная)	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASSNIFRAYGMGWYRQAPGKQ REMVAAIWLSGRTEYADAVQGRFTVSRDNAKN TVYLMNSLKPEDTAVYYCNAGPPTATSVRQY WGQGTQVTVSSEPKTPKPTSTTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQUALPPR	SEQ ID NO: 48
C12-CAR (аминокислотная)	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASSNIFRAYGMDWYRQAPGKQ REMVATIWLSGRSTYTDVKGRTISRDNANKNT VYLMNMLKPEDTAVYYCNAGPTTASSVRQY WGQGTQVTVSSEPKTPKPTSTTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQUALPPR	SEQ ID NO: 49
C13-CAR (аминокислотная)	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASSNIFRAYGMDWYRQAPGKQ REMVATIWLSGRTTYTDVKGRTISRDNANKNT VYLMNSLKPEDTAVYYCNAGAPTASSGRQYW GQGTQVTVSSEPKTPKPTSTTTPAPRPPTPAPTIA	SEQ ID NO: 50

	SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYW APLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQP FMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFS RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQUALPPR	
C15-CAR (аминокислотная)	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGV VQPGGSLRLSCAASSNIFRAYGMDWYRQAPGK QREMVATIWLSSGRSTYTDAVQGRFTISRDNAKN TVYLQMNNLKPEDTAVYYCNAGPTTASSVRQY WGQGTQVTVSSEPKTPKPTSTTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQUALPPR	SEQ ID NO: 51
C21-CAR (аминокислотная)	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCTSSSNIFRIYGMDWYRQAPGKQR EIVATIYLSGRTTYSDAVKGRFTISRDNADTVY LQMNSLKPEDTAVYYCNAGEPTASSVRQYWGQ GTQVTVSSEPKTPKPTSTTTPAPRPPTPAPTIASQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSA DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQUALPPR	SEQ ID NO: 52
C27-CAR (аминокислотная)	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCTSSSNIFKIYGMDWYRQAPGKQR EIVATIYLSGRTTYSDAVKGRFTISRDNADTVY	SEQ ID NO: 53

	LQMNTLKPEDTAVYYCNAGETTASSVRQYWGQ GTQVTVSSEPKTPKPTSTTTPAPRPPTPAPTIASQ PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSA DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQUALPPR	
С30-CAR (аминокислотная)	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGSIFRVYGM DWYRQAPGKQ RELVASIFLSGRTNYADAVKGRFTLSRDNAKNT MYLQMNSLKPEDTAVYYCNAGETTASSVRQY WGQGTQVTVSSEPKTPKPTSTTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQUALPPR	SEQ ID NO: 54
С31-CAR (аминокислотная)	MALPVTALLLPLALLLHAARPAVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGSIFRVYGM DWYRQAPGKQ RELVASIWLSGRTNYADAVKGRFTLSRDNAKNT MYLQMNSLKPEDTAVYYCNAGETTASSVRQY WGQGTQVTISSEPKTPKPTSTTTPAPRPPTPAPTI ASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFK QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQUALPPR	SEQ ID NO: 55

C08-CAR (нуклеиновая кислота)	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCC GCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGG AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTT GGTGCAACCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTTCAAACATCTTCAGAGCCTAT GGCATGGGGTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGA AGCAGCGCGAAATGGTCGCGGCTATTTGGCTC AGTGGTCGCACAGAGTATGCTGACGCCGTGCA GGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGACAACGCCA AGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCT GAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTA CTGTA ATGCAGGTCCCCCTACAGCAACTTCCGTCCGT CAATACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCG TCTCCTCAGAACCCAAGACACCAAAACCAACT AGTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAA CACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTG TCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGC GGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGAC TTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTT GGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTAC TGGTTATCACCCCTTACTGCAAACGGGGCAGA AAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATT TATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAA GATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGA AGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTC AGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGC AGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAA TCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAAGA AGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAG ATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGA AAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGA TGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA	SEQ ID NO: 56
-------------------------------------	--	---------------

	AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC CTGCCCCCTCGCTAA	
C12-CAR (нуклеиновая кислота)	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCC GCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGC AGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTT GGTGCAACCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTTCAAACATCTTCAGAGCCTAT GGCATGGATTGGTACCGCCAGGCTCCAGGAA AGCAGCGCGAAATGGTCGCGACTATCTGGCTG AGTGGTCGCTCAACGTATACTGACGCCGTGAA GGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCA AGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAACCT GAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTA ATGCAGGTCCCACACTACGGCAAGTTCCGTCCGT CAATACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCG TCTCCTCAGAACCCAAGACACCAAAACCAACT AGTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAA CACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTG TCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGC GGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGGCTGGAC TTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTT GGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCAC TGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGA AAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATT TATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAA GATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGA AGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTC AGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGC AGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAA TCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG GGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAAGA AGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAG ATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGA	SEQ ID NO: 57

	AAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGA TGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC CTGCCCCCTCGCTAA	
С13-CAR (нуклеиновая кислота)	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCC GCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGC AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTT GGTGCAACCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTTCAAACATCTTCAGAGCCTAT GGCATGGACTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGA AGCAGCGCGAAATGGTCGCGACTATCTGGCTT AGTGGTCGCACAACGTATACTGACGCCGTGAA GGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCA AGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCT GAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTA ATGCAGGTGCCCTACGGCAAGTCCGGCCGT CAATACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCG TCTCCTCAGAACCCAAGACACCAAAACCAACT AGTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAA CACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTG TCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGC GGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGAC TTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTT GGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCAC TGGTTATCACCCCTTACTGCAAACGGGGCAGA AAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATT TATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAA GATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGA AGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTC AGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGC AGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAA TCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG GGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAAGA	SEQ ID NO: 58

	AGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAG ATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGA AAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGA TGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC CTGCCCCCTCGCTAA	
C15-CAR (нуклеиновая кислота)	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCC GCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCAGGCCGC AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGGT GGTGCAACCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTTCAAATATCTTTAGAGCCTAT GGCATGGATTGGTACCGCCAGGCTCCAGGAA AGCAGCGCGAAATGGTCGCGACTATCTGGCTG AGTGGTCGCTCAACGTATACTGACGCCGTACA GGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCA AGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAACCT GAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTA ATGCAGGTCCCCTACGGCAAGTTCCGTCCGT CAATACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCG TCTCCTCAGAACCCAAGACACCAAAACCAACT AGTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAA CACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTG TCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGC GGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGAC TTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTT GGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCAC TGGTTATCACCCCTTTACTGCAAACGGGGCAGA AAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATT TATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAA GATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGA AGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTC AGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGC AGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAA TCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG	SEQ ID NO: 59

	<p>GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG  GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAAGA  AGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAG  ATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGA  AAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGA  TGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA  AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC  CTGCCCCCTCGCTAA</p>	
<p>C21-CAR  (нуклеиновая  кислота)</p>	<p>ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCC  GCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCAGGCCGC  AGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTT  GGTGCAACCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCT  GTACAAGCTCTTCAAACATCTTCAGAATCTAT  GGCATGGACTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGA  AGCAGCGCGAAATAGTCGCGACTATCTATCTT  AGTGGTCGCACAACGTATAGTGACGCCGTGA  AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC  AAGGACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCC  TGAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTA CTGT  AATGCAGGTGAACCTACGGCAAGTTCCGTCCG  TCAGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACC  GTCTCCTCAGAACCCAAGACACCAAAACCAA  CTAGTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACC  AACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCC  TGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCG  GCGGGGGGCGCAGTGACACAGAGGGGGCTGG  ACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCC  TTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTC  ACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCA  GAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCA  TTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGA  AGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAG  AAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTT  CAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAG</p>	<p>SEQ ID NO: 60</p>

	<p>CAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCA  ATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT  GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATG  GGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAAG  AAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAA  GATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATG  AAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACG  ATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACC  AAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGC  CCTGCCCCCTCGCTAA</p>	
<p>C27-CAR  (нуклеиновая  кислота)</p>	<p>ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCC  GCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGG  AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTT  GGTGCAACCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCT  GTACAAGCTCTTCAAACATCTTCAAATCTAT  GGCATGGACTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGA  AACAGCGCGAAATAGTCGCGACTATCTATCTT  AGTGGTCGCACAACGTATAGTGACGCCGTGA  AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC  AAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACACCCT  GAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTA  ATGCAGGTGAAACTACGGCAAGTTCCGTCCGT  CAATACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCG  TCTCCTCAGAACCCAAGACACCAAACCAACT  AGTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAA  CACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTG  TCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGC  GGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGAC  TTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTT  GGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCAC  TGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGA  AAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATT  TATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAA  GATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGA</p>	<p>SEQ ID NO: 61</p>

	<p>AGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTC  AGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGC  AGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAA  TCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG  GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG  GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAAGA  AGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAG  ATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGA  AAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGA  TGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA  AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC  CTGCCCCCTCGCTAA</p>	
<p>C30-CAR  (нуклеиновая  кислота)</p>	<p>ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCC  GCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGC  AGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT  GGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCT  GTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGAGTCTAT  GGCATGGACTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGA  AGCAGCGCGAGTTGGTCGCGTCTATTTTTCTT  AGTGGTAGGACAACTATGCAGACGCCGTGA  AGGGCCGATTCACGCTCTCCAGAGATAACGCC  AAGAATACTATGTATCTGCAAATGAACAGCCT  GAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTATTGTA  ATGCAGGTGAACTACGGCAAGTTCCGTCCGT  CAATACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCG  TCTCCTCAGAACCCAAGACACCAAAACCAACT  AGTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAA  CACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTG  TCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGC  GGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGAC  TTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTT  GGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCAC  TGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCAGA  AAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATT</p>	<p>SEQ ID NO: 62</p>

	<p>TATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAA  GATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGA  AGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTC  AGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGC  AGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAA  TCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG  GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG  GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAAGA  AGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAG  ATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGA  AAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGA  TGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA  AGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCC  CTGCCCCCTCGCTAA</p>	
<p>С31-CAR  (нуклеиновая  кислота)</p>	<p>ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCC  GCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGG  CGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT  GGTGCAGCCTGGGGGGTCTCTGAGACTCTCCT  GTGCAGCCTCTGGAAGCATCTTCAGAGTCTAT  GGCATGGACTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGA  AGCAGCGCGAGTTGGTCGCGTCTATTTGGCTT  AGTGGTAGGACAACTATGCAGACGCCGTGA  AGGGCCGATTCACGCTCTCCAGAGATAACGCC  AAGAATACGATGTATCTGCAAATGAACAGCCT  GAAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTATTGTA  ATGCAGGTGAACTACGGCAAGTTCCGTCCGT  CAATACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCA  TCTCCTCGGAACCCAAGACACCAAACCAACT  AGTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAA  CACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTG  TCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGC  GGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGAC  TTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTT  GGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCAC</p>	<p>SEQ ID NO: 63</p>

	<p>TGGTTATCACCCCTTTACTGCAAACGGGGCAGA  AAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATT  TATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAA  GATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGA  AGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTC  AGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGC  AGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAA  TCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG  GACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGG  GGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAAGA  AGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAG  ATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGA  AAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGA  TGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA  AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC  CTGCCCCCTCGCTAA</p>	
--	--	--

### **Лентивирусная упаковка**

**[00487]** Клетки 293Т выделяли с использованием DMEM/10% FBS в качестве среды и культивировали в инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. За день до упаковки вируса клетки расщепляли и культивировали в колбах объемом 25 см<sup>2</sup> при 50% конфлюэнтности. При заражении клеток вектор pLVX-WT-G1-VHH-CAR смешивали с хелперным вектором VSVG и GAG-pol в пропорции и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Инфекционный реагент PEI MAX и смесь плазмид смешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут с образованием соединения ДНК-инфекционный реагент, которое добавляли в среду для культивирования клеток 293Т. После 6 часов инкубации в инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub>, 37°C супернатант заменяли полной средой и инкубировали в инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub>, 37°C. Через 48 часов и 72 часа вирус собирали один раз. Затем вирус концентрировали путем центрифугирования и использовали для проверки титра вируса.

### **Получение CAR-T-клеток**

**[00488]** Мононуклеарные клетки экстрагировали из периферической крови человека с использованием реагента Ficoll, а CD3<sup>+</sup> клетки сортировали с помощью набора EasySep™ Human T Cell Isolation Kit (StemCell). Количество клеток доводили до максимума 5×10<sup>7</sup> клеток/мл, 0,5 мл/пробирка, и в каждую пробирку добавляли 25 мкл RapidSpheres. После

перемешивания при комнатной температуре образец помещали в магнитную подставку и инкубировали 3 минуты при комнатной температуре. Эффлюент собирали и центрифугировали для получения CD3<sup>+</sup> клеток. Отсортированные CD3<sup>+</sup> клетки инкубировали после ресуспендирования в среде x-vivo15. Клетки культивировали в 24-луночном планшете в количестве  $0,5-1 \times 10^6$  клеток/лунка и добавляли среду x-vivo15 до 0,5 мл. Частицы с антителами к CD3/CD28 добавляли к сортируемым клеткам в соотношении 1:1 и добавляли IL2 до конечной концентрации 100 МЕ/мл, затем инкубировали в течение ночи в инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub>, 37°C.

**[00489]** Затем использовали свежую среду и  $1 \times 10^6$  Т-клеток культивировали в 96-луночном планшете в течение ночи. На следующий день в Т-клетки добавляли концентрированный вирус VHH-CAR и совместно культивировали в течение 6 часов. Свежую среду x-vivo15 заменяли средой после центрифугирования и добавляли IL2 до конечной концентрации 100 МЕ/мл, затем продолжали культивирование в инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub>, 37°C. После нескольких субкультивирований частоту положительных событий в виде CAR-Т-клеток определяли с помощью проточной цитометрии.

#### **Положительный уровень обнаружения CAR-Т-клеток**

**[00490]** Различные CAR-Т-клетки после сбора и подсчета ресуспендировали в PBS. После двукратной промывки PBS в реакционную систему добавляли разбавленное 1:1000 конъюгированный с Alexa Fluor 647 вторичный козий домен VHH к IgG альпаки AffiniPure (Jackson ImmunoResearch) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, дважды промывали PBS. и затем выявляли с помощью проточной цитометрии (см. **Фиг. 4В**). Как показано, частота положительных событий для C08, C12, C13, C15, C21, C27, C30 и C31 составляла 91,86%, 20,32%, 23,62%, 46,41%, 30,61%, 90,28%, 86,89% и 67,78%, соответственно.

#### **Получение клеток T84-Luci-eGFP**

**[00491]**  $1 \times 10^5$  клеток/100 мкл клеток T84 высевали в 24-луночный планшет. На следующий день 100 мл вируса pLVX-Luci-eGFP (титр вируса:  $0,5-1 \times 10^8$  единиц трансдукции/мл) вносили в клетки T84, когда клетки достигли 60%-70% роста в каждой лунке. Затем добавляли 300 мкл полной среды и клетки выращивали в инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub>, 37°C. Плотность клеток наблюдали каждый день, и клетки пересевали, когда плотность клеток достигала 80%-90%. Когда частота положительных событий достигает более 95%, клетки T84 используют для анализов цитотоксичности и экспериментов на животных.

### **6.3. Пример 3 — Анализы цитотоксичности CAR-Т-клеток**

**[00492]**  $1 \times 10^5$ /мл клеток-мишеней помещали в 96-луночный планшет и выращивали в течение ночи в инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub>, 37°C. Т-клетки (отрицательный контроль) и

различные CAR-T-клетки смешивали с клетками-мишенями в соотношении E:T (эффекторная клетка:клетка-мишень) = 2:1. Объем среды для культивирования клеток доводили до 200 мкл/лунку, затем инкубировали в течение 24 ч в инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub>, 37°C. Среду для культивирования клеток удаляли и клетки однократно промывали PBS. В каждую лунку добавляли 100 мкл субстрата люциферазы Bright-Glo, инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. 100 мкл супернатанта, который переносили на белый планшет, определяли с помощью микропланшетного ридера (см. **Фиг. 5** и **Фиг. 6**). Результаты продемонстрировали цитотоксичность для всех протестированных CAR-T-клеток, экспрессирующих C8-CAR, C12-CAR, C13-CAR, C15-CAR, C21-CAR, C27-CAR, C30-CAR и C31-CAR.

#### **6.4. Пример 4— Активность *in vivo* CAR-T-клеток**

**[00493]** Способность T-клеток с CAR к GUCY2C устранять рак толстой кишки тестировали *in vivo* на NCG-мышинной модели. Клетки T84-Luci-eGFP в хороших условиях роста размножали до концентрации  $1 \times 10^8$  клеток/мл и вводили подкожно в подкожную впадину правой передней конечности самкам мышей NCG. Каждой мыши вводили  $5 \times 10^6$  клеток, а объем инъекции составлял 0,05 мл. Примерно через 2 недели после инъекции клеток объем опухоли составил около 100-150 мм<sup>3</sup>. Каждой мыши вводили  $3 \times 10^6$  клеток CAR-T через хвостовую вену. Размер опухоли измеряли с помощью штангенциркуля каждые 2–3 дня. Флуоресцентную визуализацию мышей *in vivo* проводили один раз в неделю. 0,1 мл субстрата люциферина вводили в подкожный слой живота мыши, и через 8 минут мышь подвергали анестезии. Анестезированных мышей помещали в систему оптической визуализации PerkinElmer для мелких животных *in vivo* (IVIS Lumina LT) для фотографирования. После инъекции CAR-T-клеток каждую неделю отбирали 100 мкл мышинной крови и контролировали остаточные CAR-T-клетки у мышей с помощью проточной цитометрии и количественной ПЦР. Результаты показаны на **Фиг. 7А-7С**, как показано, протестированные иллюстративные CAR-T-клетки, представленные в данном документе, экспрессирующие C8-CAR, C12-CAR, C13-CAR, C15-CAR и C21-CAR, продемонстрировали превосходную противораковую активность *in vivo*.

**[00494]** Содержание всех патентов, опубликованных заявок и ссылок, цитируемых в данном документе, полностью включены посредством ссылки. Несмотря на то, что иллюстративные варианты осуществления были конкретно показаны и описаны, специалистам в данной области техники будет понятно, что могут быть внесены различные изменения в форму и деталях без отклонения от объема вариантов осуществления, охватываемых прилагаемой формулой изобретения.

**[00495]** Из вышеизложенного следует понимать, что, хотя конкретные варианты

осуществления были описаны в данном документе в иллюстративных целях, могут быть сделаны различные модификации без отклонения от сущности и объема предложенного в данном документе. Все ссылки, упомянутые выше, полностью включены в данный документ посредством ссылки.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Однодоменное антитело к GUCY2C (sdAb), содержащее:
  - (i) CDR1, включающую аминокислотную последовательность  $X_1YGMX_2$ , где  $X_1$  представляет собой A, I или V, и  $X_2$  представляет собой D или G (SEQ ID NO: 64);
  - (ii) CDR2, включающую аминокислотную последовательность  $X_3IX_4LSGRX_5X_6YX_7DAVX_8G$ , где  $X_3$  представляет собой A, S или T;  $X_4$  представляет собой F, W или Y;  $X_5$  представляет собой S или T;  $X_6$  представляет собой E, N или T;  $X_7$  представляет собой A, S или T; и  $X_8$  представляет собой K или Q (SEQ ID NO: 65); и
  - (iii) CDR3, включающую аминокислотную последовательность  $GX_9X_{10}TAX_{11}SX_{12}RQY$ , где  $X_9$  представляет собой A, E или P;  $X_{10}$  представляет собой P или T;  $X_{11}$  представляет собой S или T; и  $X_{12}$  представляет собой G или V (SEQ ID NO: 66).
2. sdAb к GUCY2C по п. 1, отличающееся тем, что CDR1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19–26; CDR2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27–34; и CDR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, и SEQ ID NO: 10.
3. sdAb к GUCY2C по п. 1 или п. 2, содержащее:
  - (i) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35;
  - (ii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36;
  - (iii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37;
  - (iv) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38;

(v) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39;

(vi) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40;

(vii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41; или

(viii) CDR1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; CDR2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; и CDR3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

4. Однодоменное антитело к GUCY2C (sdAb), содержащее:

(i) CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, указанные в SEQ ID NO: 3;

(ii) CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, указанные в SEQ ID NO: 4;

(iii) CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, указанные в SEQ ID NO: 5;

(iv) CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 соответственно, указанные в SEQ ID NO: 6;

(v) CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, указанные в SEQ ID NO: 7;

(vi) CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, указанные в SEQ ID NO: 8;

(vii) CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, указанные в SEQ ID NO: 9; или

(viii) CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, указанные SEQ ID NO: 10.

5. sdAb к GUCY2C по п. 4, отличающееся тем, что CDR1, CDR2 или CDR3 определяют в соответствии со схемой нумерации Kabat, схемой нумерации IMGT, схемой нумерации AbM, схемой нумерации Chothia, схемой нумерации Contact или их комбинацией.

6. sdAb к GUCY2C по любому из пп. 1–5, дополнительно содержащее одну или более областей FR, указанных в любой из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, и SEQ ID NO: 10.
7. sdAb к GUCY2C по любому из пп. 1–6, содержащее аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, и SEQ ID NO: 10.
8. sdAb к GUCY2C по любому из пп. 1–6, отличающееся тем, что sdAb к GUCY2C содержит или состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, и SEQ ID NO: 10.
9. sdAb к GUCY2C по любому из пп. 1–5, отличающееся тем, что sdAb к GUCY2C представляет собой sdAb верблюдовых.
10. sdAb к GUCY2C по любому из пп. 1–5, отличающееся тем, что sdAb к GUCY2C представляет собой гуманизованное sdAb.
11. sdAb к GUCY2C по любому из пп. 1–10, отличающееся тем, что sdAb к GUCY2C генетически слито или химически конъюгировано с агентом.
12. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий:
  - (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий sdAb к GUCY2C по любому из пп. 1–10;
  - (b) трансмембранный домен; и
  - (c) внутриклеточный сигнальный домен.
13. CAR по п. 12, отличающийся тем, что внеклеточный антигенсвязывающий домен дополнительно содержит один или более дополнительных антигенсвязывающих доменов.
14. CAR по п. 12 или п. 13, отличающийся тем, что трансмембранный домен получен из молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD8 $\alpha$ , CD4, CD28, CD137, CD80, CD86, CD152 и PD1.
15. CAR по п. 14, отличающийся тем, что трансмембранный домен получен из CD8 $\alpha$ .
16. CAR по любому из пп. 12–15, отличающийся тем, что внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен иммунной эффекторной клетки.
17. CAR по п. 16, отличающийся тем, что первичный внутриклеточный сигнальный

домен получен из CD3 $\zeta$ .

18. CAR по п. 16 или п. 17, отличающийся тем, что внутриклеточный сигнальный домен дополнительно содержит костимулирующий сигнальный домен.

19. CAR по п. 18, отличающийся тем, что костимулирующий сигнальный домен получен из костимулирующей молекулы, выбранной из группы, состоящей из CD27, CD28, CD137 (4-1BB), OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лигандов CD83 и их комбинаций.

20. CAR по п. 20, отличающийся тем, что костимулирующий сигнальный домен получен из CD137.

21. CAR по любому из пп. 12–20, дополнительно содержащий шарнирный домен, расположенный между С-концом внеклеточного антигенсвязывающего домена и N-концом трансмембранного домена.

22. CAR по п. 21, отличающийся тем, что шарнирный домен получен из CD8 $\alpha$ .

23. CAR по любому из пп. 12–22, дополнительно содержащий сигнальный пептид, расположенный на N-конце полипептида.

24. CAR по п. 23, отличающийся тем, что сигнальный пептид получен из CD8 $\alpha$ .

25. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий (i) аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, и SEQ ID NO: 55; или (ii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с последовательностью любой из SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, и SEQ ID NO: 55.

26. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую sdAb к GUCY2C по любому из пп. 1–10.

27. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 26, отличающаяся тем, что содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 11–18.

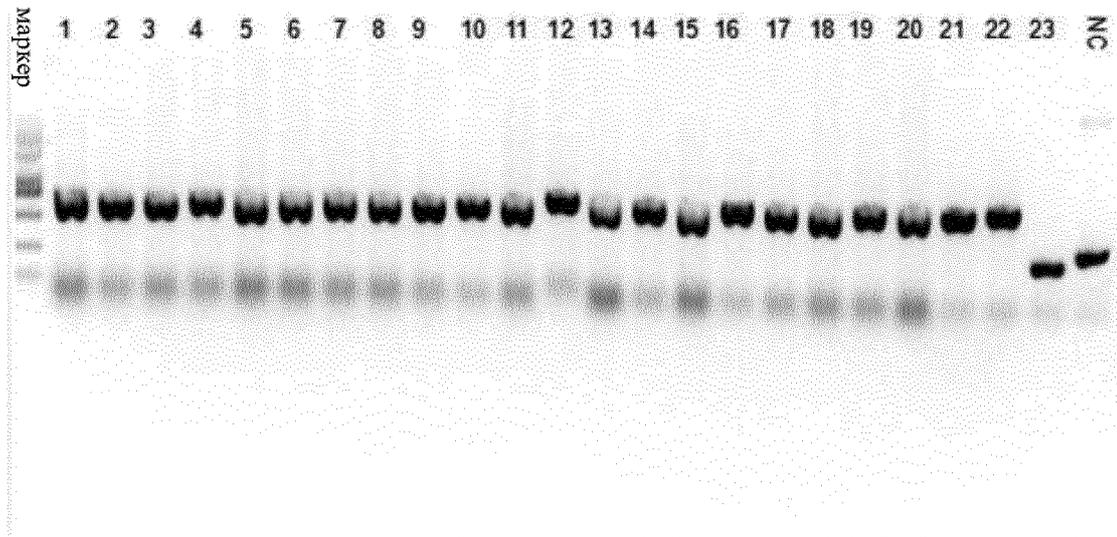
28. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 27.

29. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR по любому из пп. 14–25.

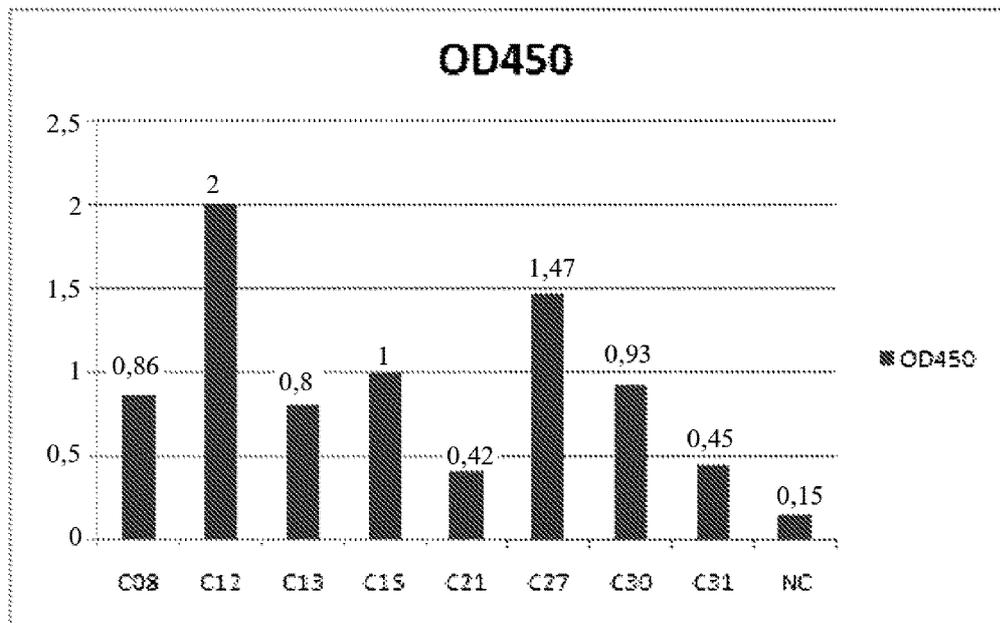
30. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 29, отличающаяся тем, что содержит

последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 56–63.

31. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 30.
32. Сконструированная иммунная эффекторная клетка, содержащая CAR по любому из пп. 14–25, выделенную нуклеиновую кислоту по п. 29 или п. 30 или вектор по п. 31.
33. Сконструированная иммунная эффекторная клетка по п. 32, отличающаяся тем, что представляет собой Т-клетку.
34. Фармацевтическая композиция, содержащая sdAb к GUCY2C по любому из пп. 1–10, сконструированную иммунную эффекторную клетку по п. 32 или п. 33 или вектор по п. 28 или п. 31 и фармацевтически приемлемый эксципиент.
35. Способ лечения заболевания или нарушения у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества sdAb к GUCY2C по любому из пп. 1–10, сконструированной иммунной эффекторной клетки по п. 32 или п. 33 или фармацевтической композиции по п. 34.
36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что заболевание или нарушение представляет собой ассоциированное с GUCY2C заболевание или нарушение.
37. Способ по п. 35, отличающийся тем, что заболевание или нарушение представляет собой злокачественное новообразование.
38. Способ по п. 36, отличающийся тем, что заболевание или нарушение представляет собой колоректальный рак.
39. Способ по п. 36, отличающийся тем, что заболевание или нарушение представляет собой рак желудка.
40. Способ по п. 36, отличающийся тем, что заболевание или нарушение представляет собой рак пищевода.



Фиг. 1



Фиг. 2

FIG. 3

	* * * * * * * *	* * * * * * * *	* **	***	* * * * * * * *	**	* * * * *	* * * * *
C08	MEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASSNIFRAYGMGWYRQAPGKQREMVAAIWL	SGRTEYADAVQG					
C12	MQVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASSNIFRAYGMDWYRQAPGKQREMVATIWL	SGRSTYTDVAVKG					
C13	MQVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASSNIFRAYGMDWYRQAPGKQREMVATIWL	SGRTTYTDVAVKG					
C15	MQVQLVESGGGVVQPGGSLRLS	CAASSNIFRAYGMDWYRQAPGKQREMVATIWL	SGRSTYTDVAVQG					
C21	MQVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CTSSSNIFRIYGMGWYRQAPGKQREIVATIYL	SGRTTYSDAVKG					
C27	MEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CTSSSNIFKIYGMGWYRQAPGKQREIVATIYL	SGRTTYSDAVKG					
C30	MQVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGSIFRVYGMGWYRQAPGKQRELVASIFL	SGRTNYADAVKG					
C31	MAVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGSIFRVYGMGWYRQAPGKQRELVASIW	LSGRTNYADAVKG					

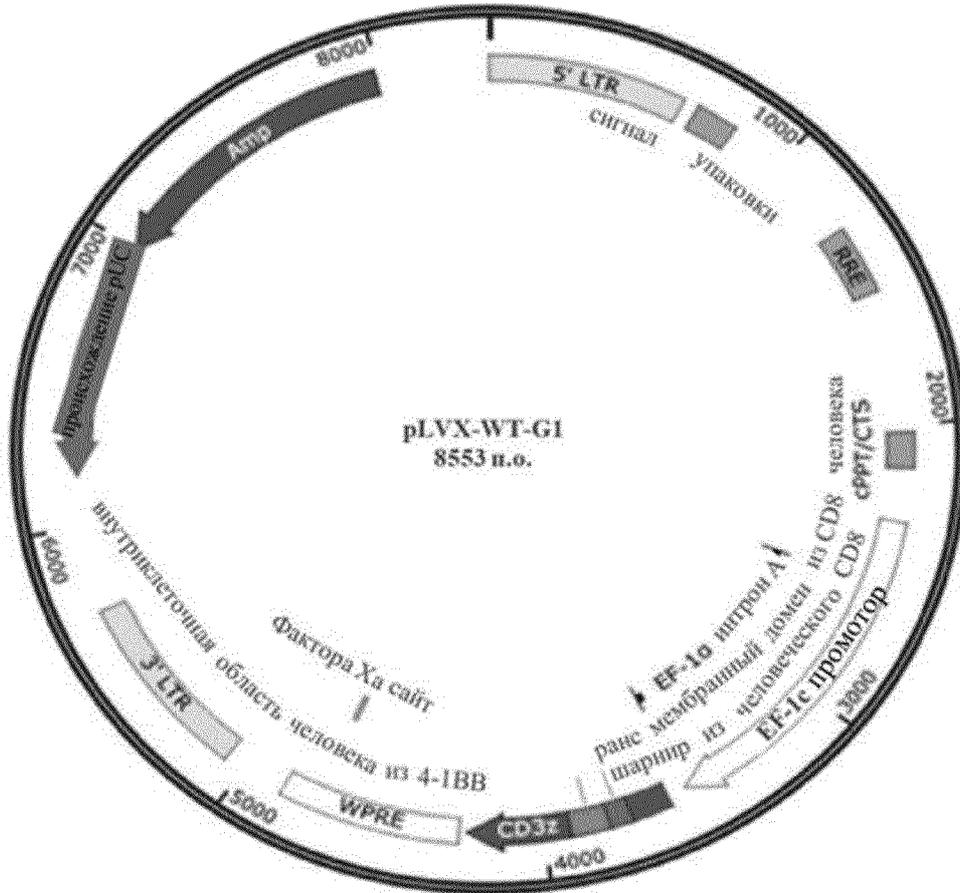
CDR1

CDR2

CDR3

RFTISRDNAKNTVYLGQMN	SLKPEDTAVYYCNAGPPTATS	VRQYWGQGTQVTVSSEPKTPKP
RFTISRDNAKNTVYLGQMN	NLKPEDTAVYYCNAGPTTASS	VRQYWGQGTQVTVSSEPKTPKP
RFTISRDNAKNTVYLGQMN	SLKPEDTAVYYCNAGAPTASS	GRQYWGQGTQVTVSSEPKTPKP
RFTISRDNAKNTVYLGQMN	NLKPEDTAVYYCNAGPTTASS	VRQYWGQGTQVTVSSEPKTPKP
RFTISRDNAKNTVYLGQMN	SLKPEDTAVYYCNAGEPTASS	VRQYWGQGTQVTVSSEPKTPKP
RFTISRDNAKNTVYLGQMN	TLKPEDTAVYYCNAGETTASS	VRQYWGQGTQVTVSSEPKTPKP
RFTLSRDNAKNTMYLGQMN	SLKPEDTAVYYCNAGETTASS	VRQYWGQGTQVTVSSEPKTPKP
RFTLSRDNAKNTMYLGQMN	SLKPEDTAVYYCNAGETTASS	VRQYWGQGTQVTISSEPKTPKP

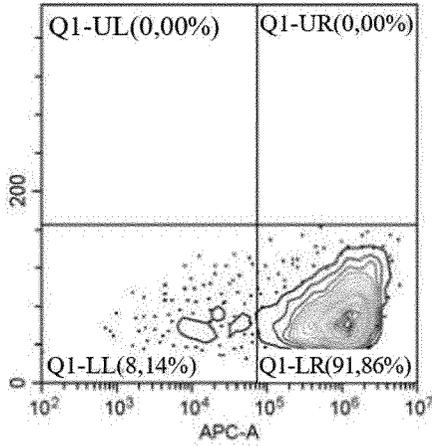
CDR3



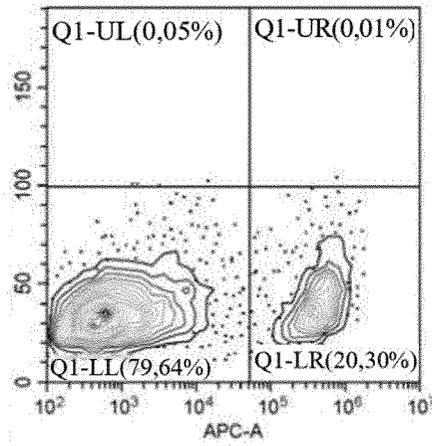
Фиг. 4А

ΦΠΠ. 4B

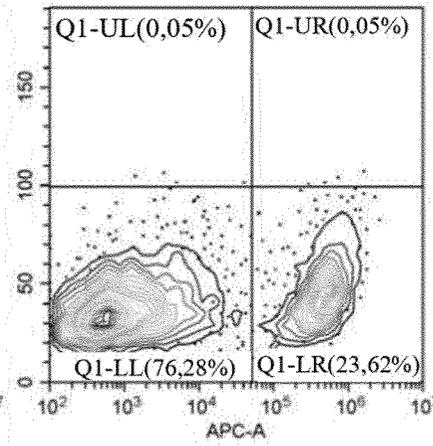
**C08**



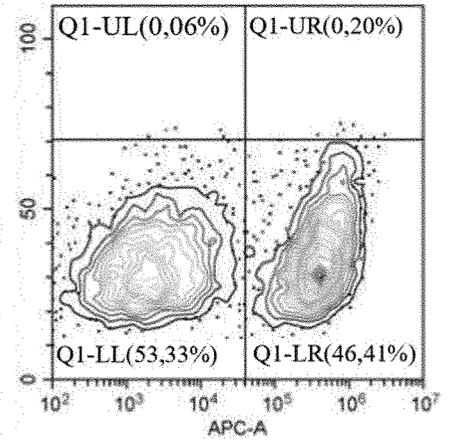
**C12**



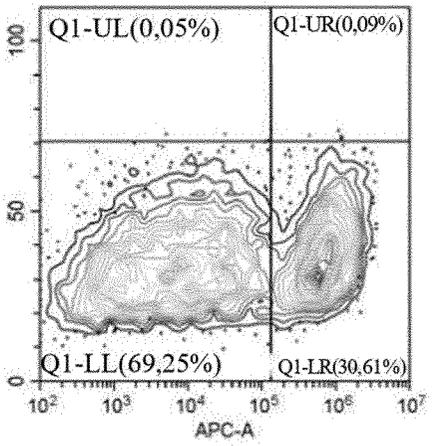
**C13**



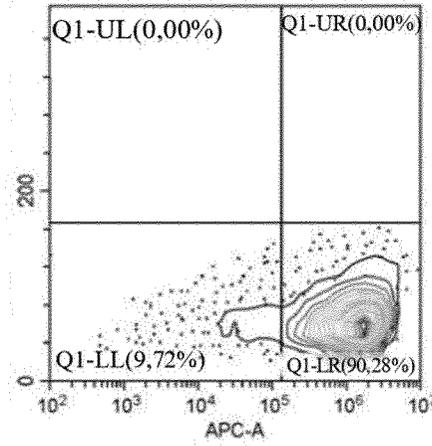
**C15**



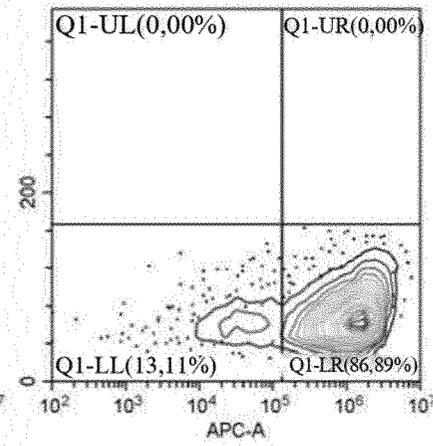
**C21**



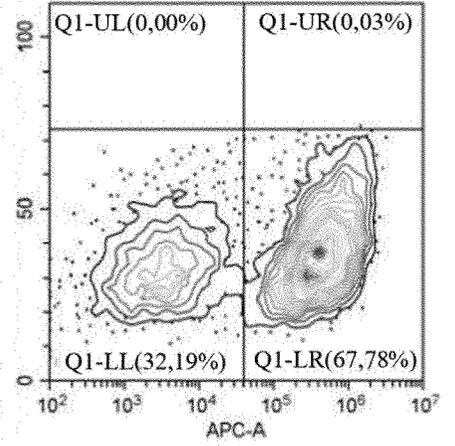
**C27**

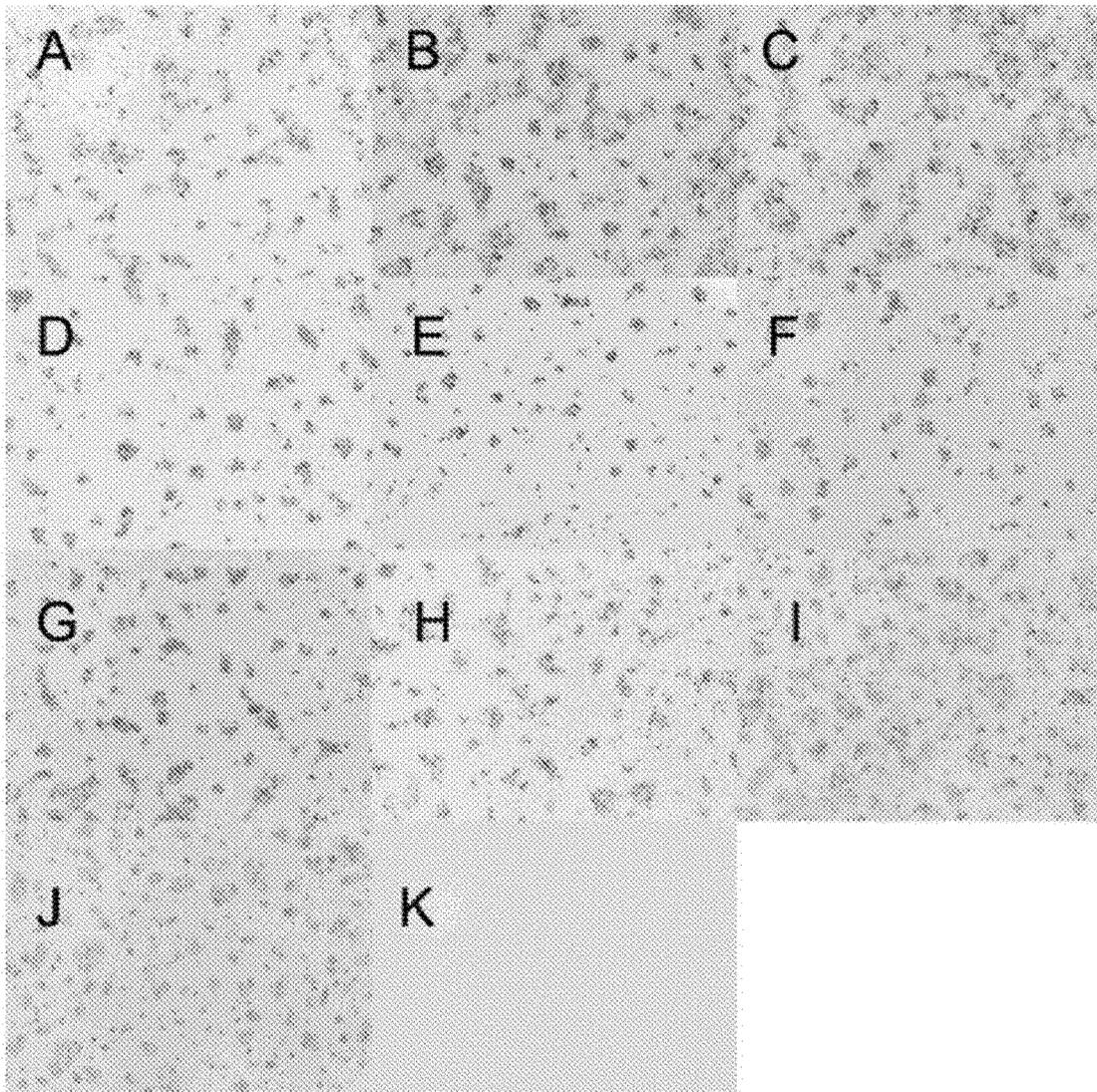


**C30**



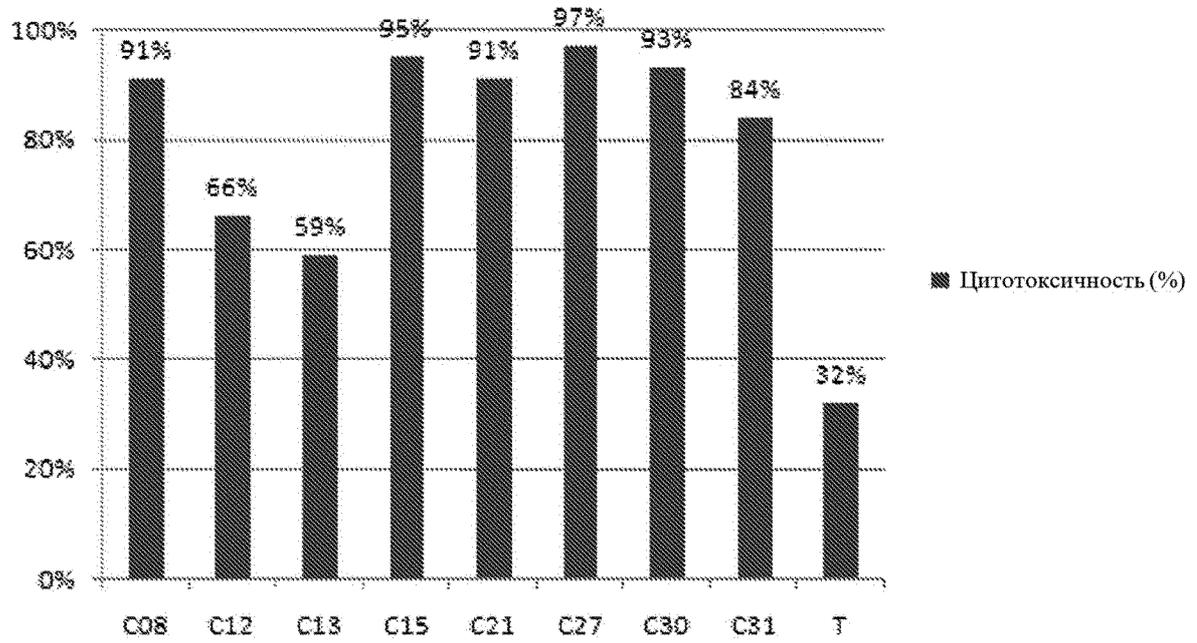
**C31**





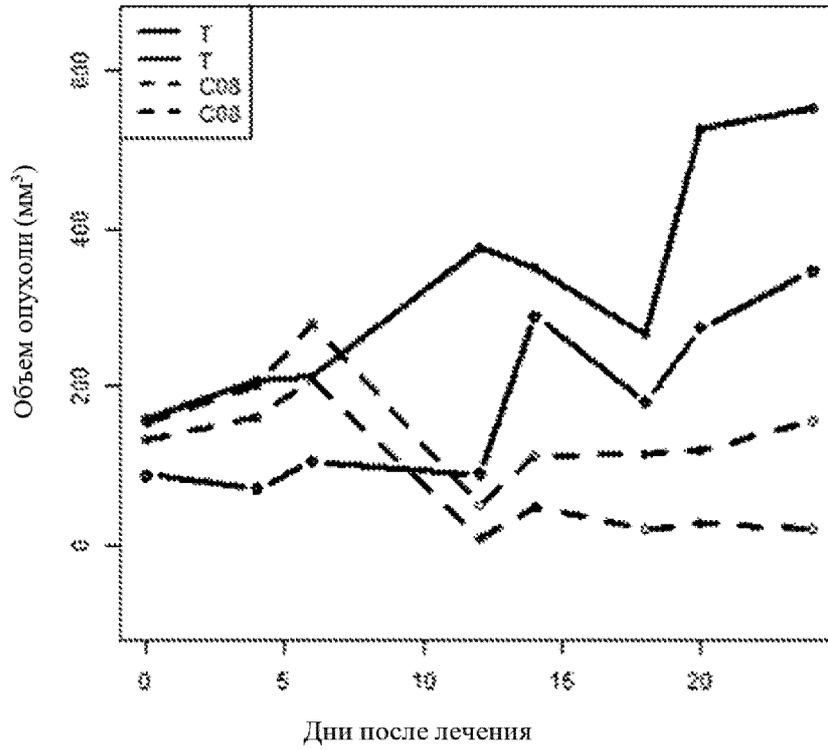
Фиг. 5

## Цитотоксичность (%)



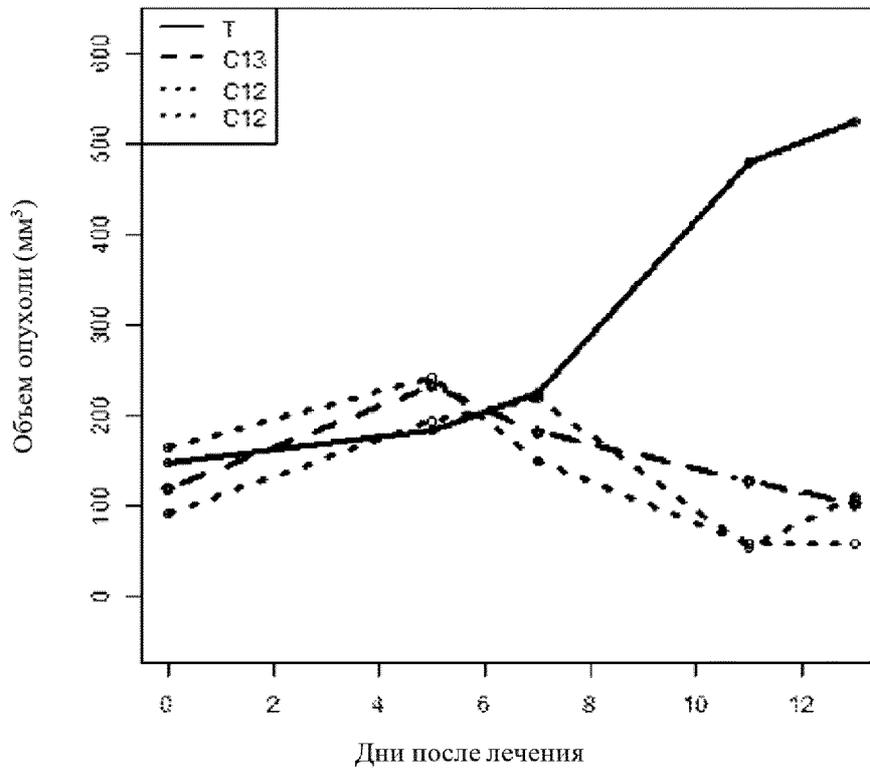
Фиг. 6

## Объем опухоли в зависимости от времени



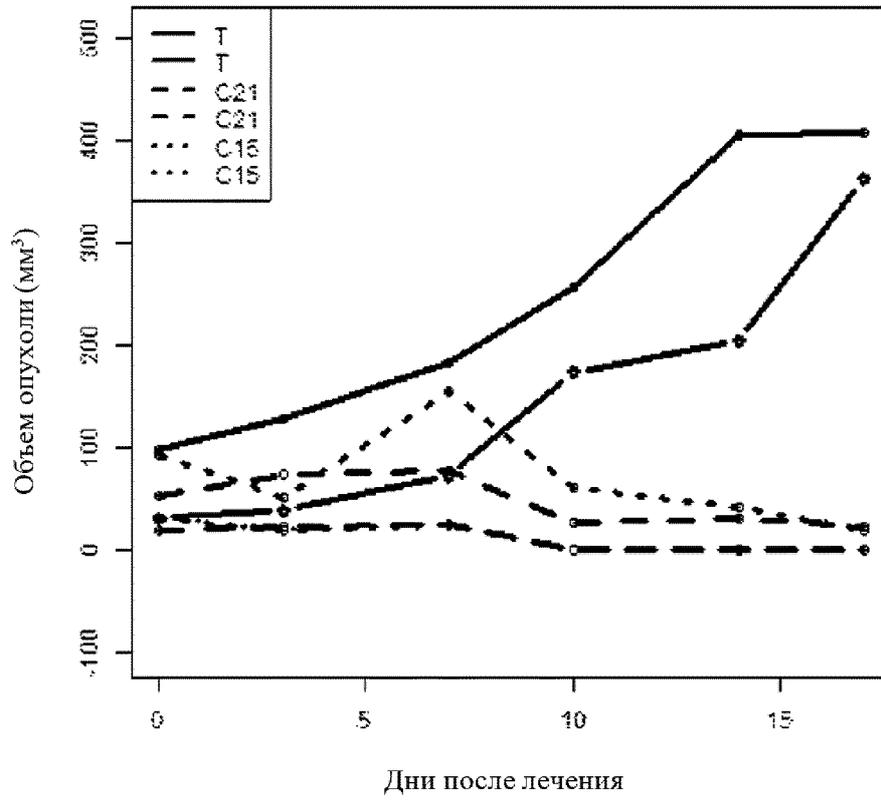
Фиг. 7А

## Объем опухоли в зависимости от времени



Фиг. 7В

## Объем опухоли в зависимости от времени



Фиг. 7С