

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391713** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.09.26**

(22) Дата подачи заявки  
**2021.12.09**

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)  
**C07K 14/725** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 35/17** (2015.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИИ АГЕНТОВ, СВЯЗЫВАЮЩИХ АНТИГЕН ГУАНИЛАТЦИКЛАЗУ С (GCC), И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **63/123,331**

(32) **2020.12.09**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2021/000873**

(87) **WO 2022/123316 2022.06.16**

(71) Заявитель:

**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ  
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

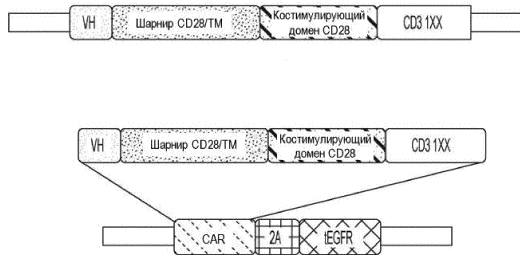
(72) Изобретатель:

**Шапиро Гэри, Чоитар Джохара, Хэ  
Синъюэ, Ын Мэй Роза (US)**

(74) Представитель:

**Нилова М.И. (RU)**

(57) Описаны антигенсвязывающие агенты (например, однодоменные антитела), которые связывают гуанилатциклазу С (GCC), и химерные антигенные рецепторы, содержащие домены, связывающие антиген GCC. Также описаны нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, клетки-хозяева, антигенсвязывающие фрагменты и фармацевтические композиции, содержащие эти антигенсвязывающие агенты и их фрагменты. В данном изобретении также представлены терапевтические способы применения антител и антигенсвязывающих молекул, предложенных в данном документе.



202391713

A1

A1

202391713

## **Композиции агентов, связывающих антиген гуанилатциклазу С (GCC), и способы их применения**

### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[0001] Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США, сер. № 63/123331, поданной 9 декабря 2020 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

[0002] Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронной форме в формате ASCII и в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 19 ноября 2021 г., называется MIL-005WO\_SL.txt и имеет размер 140478 байта.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[0003] Гуанилатциклаза С (GCC) представляет собой трансмембранный рецептор клеточной поверхности, который участвует в регуляции кишечного сока, электролитного гомеостаза и пролиферации клеток, см., например, Carrithers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3018-3020 (2003). GCC экспрессируется в клетках слизистой оболочки тонкой кишки, толстой кишки и прямой кишки (Carrithers et al., Dis Colon Rectum 39: 171-181 (1996)). Экспрессия GCC сохраняется при неопластической трансформации эпителиальных клеток кишечника с экспрессией во всех первичных и метастатических колоректальных опухолях (Carrithers et al., Dis Colon Rectum 39: 171-181 (1996); Buc et al. Eur J Cancer 41: 1618-1627 (2005); Carrithers et al., Gastroenterology 107: 1653-1661 (1994)). Существует потребность в новых и улучшенных способах нацеливания на GCC.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0004] Нарушения в сигнальных путях GCC связаны с многочисленными желудочно-кишечными нарушениями, включая колоректальный рак. В настоящем изобретении предложены, помимо прочего, новые антигенсвязывающие молекулы к GCC, (например, однодоменные антитела (sdAb)) и химерные антигенные рецепторы (CAR), которые включают антигенсвязывающие домены к GCC (например, sdAb). Кроме того, в

настоящем изобретении предложены клетки-хозяева (например, Т-клетки), экспрессирующие CAR, и молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие CAR или антигенсвязывающую молекулу к GCC. CAR клетки содержат молекулы CAR к GCC, экспрессированные на клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления CAR демонстрируют поверхностную экспрессию на высоком уровне на трансдуцированных Т-клетках с высокой степенью цитолиза и экспансии и персистенции трансдуцированных Т-клеток *in vivo*. Также предложены способы применения описанных CAR, клеток-хозяев и молекул нуклеиновых кислот, например, для лечения рака у субъекта.

**[0005]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен химерный антигенный рецептор (CAR) к гуанилатциклазе С (GCC), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с гуанилатциклазой С (GCC), трансмембранный домен и по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный домен.

**[0006]** В некоторых вариантах осуществления CAR к GCC содержит антигенсвязывающий домен, содержащий: переменную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) HYYWS (HCDR1) (SEQ ID NO: 8), RIYPSGSTSYNPSLKS (HCDR2) (SEQ ID NO: 11) и DRSTGWSEWNSDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 16); переменную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMS (HCDR1) (SEQ ID NO: 9), KIRHDGGEKYYVDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 12) и DYTRDV (HCDR3) (SEQ ID NO: 17); переменную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10), KIKYDGSEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 13) и DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18); переменную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10), KIRHDGGEKYYPDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 14) и DYNKDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 19), или переменную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10), KIRHDGGEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 15) и DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18).

**[0007]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR к GCC содержит переменную область тяжелой цепи (VH), которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 20.

**[0008]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR к GCC содержит переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, включающую

аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 21; переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 26; переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 27; или переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 28.

**[0009]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR к GCC включает антигенсвязывающий домен к GCC только переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина.

**[0010]** В некоторых вариантах осуществления внеклеточному антигенсвязывающему домену к GCC из CAR к GCC предшествует лидерная нуклеотидная последовательность, кодирующая лидерный пептид.

**[0011]** В некоторых вариантах осуществления лидерный пептид содержит SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 42.

**[0012]** В некоторых вариантах осуществления CAR к GCC дополнительно содержит шарнирный домен.

**[0013]** В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает шарнирный домен CD28.

**[0014]** В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен CD28 включает SEQ ID NO: 29.

**[0015]** В некоторых вариантах осуществления CAR к GCC содержит шарнирный домен, слитый с трансмембранным доменом.

**[0016]** В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает трансмембранный домен белка, выбранного из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD8, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD83, CD86, CD134, CD137, CD154, и TNFRSF19, и любой их комбинации.

**[0017]** В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD28.

**[0018]** В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD28 включает SEQ ID NO: 30.

**[0019]** В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий домен и первичный сигнальный домен.

**[0020]** В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен содержит функциональный сигнальный домен OX40, CD70, CD27, CD28, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), DAP10, DAP12, и 4-1BB (CD137), или любую их комбинацию.

**[0021]** В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен содержит функциональный сигнальный домен CD28.

**[0022]** В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен CD28 включает SEQ ID NO: 32.

**[0023]** В некоторых вариантах осуществления первичный сигнальный домен включает сигнальный домен CD3-дзета.

**[0024]** В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен CD3-дзета включает SEQ ID NO: 33.

**[0025]** В одном аспекте CAR к GCC включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 47-52.

**[0026]** В некоторых вариантах осуществления CAR к GCC включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления CAR к GCC включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 48. В некоторых вариантах осуществления CAR к GCC включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления CAR к GCC включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления CAR к GCC включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления CAR

к GCC включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 52.

**[0027]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий CAR к GCC, описанный в данном документе.

**[0028]** В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид, кодирующий CAR к GCC, описанный в данном документе, дополнительно содержит укороченную последовательность рецептора эпидермального фактора роста (tEGFR).

**[0029]** В некоторых вариантах осуществления tEGFR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 43.

**[0030]** В некоторых вариантах осуществления tEGFR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, которая идентична SEQ ID NO: 43.

**[0031]** В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид, кодирующий CAR к GCC, описанный в данном документе, дополнительно содержит сайт распознавания фурином и расположенную ниже последовательность саморасщепляющегося пептида 2A, предназначенную для одновременной бицистронной экспрессии последовательности метки и последовательности CAR.

**[0032]** В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид 2A выбран из F2A, P2A, E2A и T2A.

**[0033]** В некоторых вариантах осуществления саморасщепляющийся пептид 2A представляет собой P2A.

**[0034]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий выделенный полинуклеотид, кодирующий CAR к GCC, описанный в данном документе.

**[0035]** В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой аденовирусный вектор, вектор на основе аденовирус-ассоциированного вируса, ДНК-вектор, лентивирусный вектор, плазмиду, ретровирусный вектор или РНК-вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой ретровирусный вектор.

**[0036]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена клетка с выделенным полинуклеотидом, кодирующим CAR к GCC, описанный в данном документе.

**[0037]** В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует CAR к GCC, описанный в данном документе

**[0038]** В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку, аллогенную Т-клетку, аутологичную Т-клетку или инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL).

**[0039]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток, экспрессирующих или способных экспрессировать описанный в данном документе CAR к GCC. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит популяцию клеток, при этом более 70%, 80%, 90% или 95% клеток в популяции экспрессируют CAR к GCC.

**[0040]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложении способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, фармацевтической композиции, содержащей описанный в данном документе CAR к GCC.

**[0041]** В некоторых вариантах осуществления рак выбран из рака желудочно-кишечного тракта, колоректального рака, колоректальной аденокарциномы, колоректальной лейомиосаркомы, колоректальной лимфомы, колоректальной меланомы, колоректальной нейроэндокринной опухоли, метастатического рака толстой кишки, рака желудка, аденокарциномы желудка, лимфомы желудка, саркомы желудка, рака пищевода, плоскоклеточной карциномы, аденокарциномы пищевода или рака поджелудочной железы.

**[0042]** В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

**[0043]** В некоторых вариантах осуществления рак желудочно-кишечного тракта представляет собой рак толстой кишки, колоректальный рак, рак желудка или рак пищевода.

**[0044]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ уменьшения роста опухоли или размера опухоли путем введения фармацевтической композиции, содержащей CAR к GCC, описанный в данном документе.

**[0045]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу C (GCC), содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) HYYWS (HCDR1) (SEQ ID NO: 8), RIYPSGSTSYNPSLKS (HCDR2 ) (SEQ ID NO: 11) и DRSTGWSEWNSDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 16).

**[0046]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу C (GCC), содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMS

(HCDR1) (SEQ ID NO: 9), KIRHDGGEKYYVDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 12) и DYTRDV (HCDR3) (SEQ ID NO: 17).

**[0047]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10), KIKYDGSEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 13) и DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18).

**[0048]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10), KIRHDGGEKYYPDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 14) и DYNKDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 19)

**[0049]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), содержащий вариабельную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10), KIRHDGGEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 15) и DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18).

**[0050]** В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 20.

**[0051]** В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 21.

**[0052]** В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 26.

**[0053]** В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 27.



**[0054]** В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент содержит переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 28.

**[0055]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу C (GCC), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 20.

**[0056]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу C (GCC), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 21.

**[0057]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу C (GCC), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 26.

**[0058]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу C (GCC), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 27.

**[0059]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу C (GCC), содержащий переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 28.

**[0060]** В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент содержит область VH, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1, 20, 21, 26, 27 или 28.

**[0061]** В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент содержит область VH, включающую аминокислотную последовательность, которая идентична любой из SEQ ID NO: 1, 20, 21, 26, 27 или 28.

**[0062]** В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент выбран из группы, состоящей из антитела IgA, антитела IgG, антитела IgE, антитела IgM, би- или полиспецифического антитела, фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента F(ab')<sub>2</sub>,

фрагмента Fd', фрагмента Fd, выделенных CDR или их наборов; одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), слитой молекулы полипептид-Fc, однодоменного антитела (sdAb), VH, верблюжьего антитела; маскированного антитела, малых модульных иммунофармацевтических препаратов («SMIP™»), одноцепочечного, тандемного диатела, VHH, антикалина, наноантитела, Humabody, миниантитела, BiTE, белков с анкириновыми повторами, DARPIN, авимера, DART, TCR-подобного антитела, аднектина, аффилина, транс-тела; аффитела, TrimerX, микропротеина, финомера, центирина; и KALBITOR.

**[0063]** В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент представляет собой однодоменное антитело (sdAb).

**[0064]** В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент представляет собой антитело, состоящее только из тяжелых цепей, (VH).

**[0065]** В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент связывает GCC с KD от около 0,3 наномоль/л (нМ) до около 10 нМ.

**[0066]** В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент связывает GCC на клетках-мишенях с EC50 от около 0,5 нМ до около 8 нМ.

**[0067]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ лечения рака, включающий введение связывающего GCC агента, описанного в данном документе, субъекту, нуждающемуся в лечении.

**[0068]** В некоторых вариантах осуществления рак выбран из рака желудочно-кишечного тракта, колоректального рака, колоректальной аденокарциномы, колоректальной лейомиосаркомы, колоректальной лимфомы, колоректальной меланомы, колоректальной нейроэндокринной опухоли, метастатического рака толстой кишки, рака желудка, аденокарциномы желудка, лимфомы желудка, саркомы желудка, рака пищевода, плоскоклеточной карциномы, аденокарциномы пищевода или рака поджелудочной железы.

**[0069]** В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

**[0070]** В некоторых вариантах осуществления рак желудочно-кишечного тракта представляет собой рак толстой кишки, колоректальный рак, рак желудка или рак пищевода.

**[0071]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая связывающий GCC агент и фармацевтически приемлемый

носитель, где связывающий GCC агент содержит: переменную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) HYYWS (HCDR1) (SEQ ID NO: 8), RIYPSGSTSYNPSLKS (HCDR2) (SEQ ID NO: 11) и DRSTGWSEWNSDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 16); переменную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMS (HCDR1) (SEQ ID NO: 9), KIRHDGGEKYYVDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 12) и DYTRDV (HCDR3) (SEQ ID NO: 17); переменную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10), KIKYDGSEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 13) и DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18); переменную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10), KIRHDGGEKYYPDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 14) и DYNKDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 19) или переменную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10), KIRHDGGEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 15) и DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18).

**[0072]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ лечения рака, включающий введение связывающего GCC агента субъекту, нуждающемуся в лечении, где связывающий GCC агент содержит: переменную область тяжелой цепи (VH) с определяющей комплементарность областью (CDR) последовательности HYYWS (HCDR1) (SEQ ID NO: 8), RIYPSGSTSYNPSLKS (HCDR2) (SEQ ID NO: 11) и DRSTGWSEWNSDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 16); переменную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMS (HCDR1) (SEQ ID NO: 9), KIRHDGGEKYYVDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 12) и DYTRDV (HCDR3) (SEQ ID NO: 17); переменную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10), KIKYDGSEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 13) и DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18); переменную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10), KIRHDGGEKYYPDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 14) и DYNKDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 19) или переменную область тяжелой цепи (VH) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10), KIRHDGGEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 15) и DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18).

**[0073]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотную последовательность VH, которая идентична любой из SEQ ID NO: 1, 20, 21, 26, 27 или 28.

**[0074]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность VH, которая идентична любой из SEQ ID NO: 1, 20, 21, 26, 27, или 28.

**[0075]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена выделенная клетка, содержащая вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность VH, которая идентична любой из SEQ ID NO: 1, 20, 21, 26, 27, или 28.

**[0076]** Следует понимать, что как приведенное выше общее описание, так и приведенное ниже подробное описание являются просто иллюстративными и пояснительными и не ограничивают заявляемое изобретение.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**[0077]** Чертежи, включенные в данный документ, которые состоят из следующих фигур, предназначены исключительно для иллюстрации, а не для ограничения.

**[0078]** На *Фиг. 1A и 1B* показаны иллюстративные конструкции химерного антигенного рецептора (CAR).

**[0079]** На *Фиг 2A-2D* показана цитотоксичность иллюстративных Т-клеток с CAR к GCC *in vitro*, полученная с использованием четырех линий опухолевых клеток. Клетки HT29-GCC, линия клеток колоректального рака человека HT29, сконструированная для стабильной экспрессии GCC) (Фиг. 2A); HT29-VEC (GCC-отрицательной линии клеток с векторным контролем) (Фиг. 2B); и две линии опухолевых клеток, эндогенно экспрессирующие GCC: GSU (Фиг. 2C) и LS1034 (Фиг. 2D). Столбцы представляют средние значения + стандартное отклонение из трех технических повторов. Данные являются репрезентативными для >3 независимых экспериментов, проведенных с Т-клетками с CAR к GCC от >3 доноров. Цитотоксичность CAR-Т определяли в отсутствие укороченного EGFR (tEGFR).

**[0080]** На *Фиг 3A-3D* показана цитотоксичность иллюстративных Т-клеток с CAR к GCC *in vitro*, полученная с использованием четырех линий опухолевых клеток. Клетки HT29-GCC, линия клеток колоректального рака человека HT29, сконструированная для стабильной экспрессии GCC) (Фиг. 3A); HT29-VEC (GCC-отрицательной линии клеток с

векторным контролем) (Фиг. 3B; и две линии опухолевых клеток, эндогенно экспрессирующие GCC: GSU (Фиг. 3C) и LS1034 (Фиг. 3D). Столбцы представляют средние значения + стандартное отклонение от трех технических повторов. Данные являются репрезентативными для >3 независимых экспериментов, проведенных с Т-клетками с CAR к GCC от >3 доноров. Цитотоксичность CAR-T определяли в присутствии укороченного EGFR (tEGFR).

**[0081]** На **Фиг. 4A-4D** показан иллюстративная секреция цитокинов IFN-гамма Т-клетками с CAR к GCC, совместно культивируемыми с клетками, экспрессирующими GCC, (HT29-GCC) (Фиг. 4A), GSU (фиг. 4C), LS1034 (Фиг. 4D), и GCC-отрицательными (HT29-VEC, Фиг. 4B) опухолевыми клетками *in vitro*. Секретируемый IFN-гамма в супернатанте определяли с помощью набора Intellicyt QBeads Human PlexScreen (Sartorius, 90702). Столбцы представляют средние значения + стандартное отклонение из трех технических повторов. Данные являются репрезентативными для >3 независимых экспериментов, проведенных с Т-клетками с CAR к GCC от >3 доноров. Секрецию цитокинов определяли в отсутствие укороченного EGFR (tEGFR).

**[0082]** На **Фиг. 5A-5D** показана иллюстративная секреция цитокина IFN-гамма Т-клетками с CAR к GCC, совместно культивируемыми с клетками, экспрессирующими GCC, (HT29-GCC (Фиг. 5A), GSU (фиг. 5C), LS1034 (Фиг. 5D), и GCC-отрицательными (HT29-VEC, Фиг. 5B) опухолевыми клетками *in vitro*. Секретируемый IFN-гамма в супернатанте определяли с помощью набора Intellicyt QBeads Human PlexScreen (Sartorius, 90702). Столбцы представляют средние значения + стандартное отклонение из трех технических повторов. Данные являются репрезентативными для >3 независимых экспериментов, проведенных с Т-клетками с CAR к GCC от >3 доноров. Секрецию цитокинов определяли в присутствии укороченного EGFR (tEGFR).

**[0083]** На **Фиг. 6A-6D** показана иллюстративная секреция цитокина IL-2 Т-клетками с CAR к GCC, совместно культивируемыми с клетками, экспрессирующими GCC, (HT29-GCC (Фиг. 6A), GSU (фиг. 6C), LS1034 (Фиг. 6D), и GCC-отрицательными (HT29-VEC, Фиг. 6B) опухолевыми клетками *in vitro*. Секретируемый IL-2 в супернатанте определяли с помощью набора Intellicyt QBeads Human PlexScreen (Sartorius, 90702). Столбцы представляют средние значения + стандартное отклонение из трех технических повторов. Данные являются репрезентативными для >3 независимых экспериментов, проведенных с Т-клетками с CAR к GCC от >3 доноров. Секрецию цитокинов определяли в отсутствие укороченного EGFR (tEGFR).

**[0084]** На *Фиг. 7A-7D* показана иллюстративная секреция цитокина IL-2 Т-клетками с CAR к GCC, совместно культивируемыми с клетками, экспрессирующими GCC, (HT29-GCC (Фиг. 7A), GSU (фиг. 7C), LS1034 (Фиг. 7D), и GCC-отрицательными (HT29-VEC, Фиг. 7B) опухолевыми клетками *in vitro*. Секретируемый IFL-2 в супернатанте определяли с помощью набора Intellicyt QBeads Human PlexScreen (Sartorius, 90702). Столбцы представляют средние значения + стандартное отклонение из трех технических повторов. Данные являются репрезентативными для >3 независимых экспериментов, проведенных с Т-клетками с CAR к GCC от >3 доноров. Секрецию цитокинов определяли в присутствии укороченного EGFR (tEGFR).

**[0085]** На *Фиг. 8A и 8B* показаны иллюстративные результаты противоопухолевого эффекта в виде изменения среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (40 дней) в модели HT55 (эндогенно экспрессирующий GCC колоректальный рак, гистологический счет H-score для GCC = 300/300), которую лечили Т-клетками с CAR к GCC, полученными от двух разных здоровых доноров D393 (Фиг. 8A) и D686 (Фиг. 8B). Противоопухолевый эффект определяли в отсутствие укороченного EGFR (tEGFR).

**[0086]** На *Фиг. 9A-9C* показаны иллюстративные результаты противоопухолевого эффекта в виде изменения среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (42 дней) в модели HT55 (эндогенно экспрессирующий GCC колоректальный рак, гистологический счет H-score для GCC = 300/300), которую лечили Т-клетками с CAR к GCC, полученными от три разных здоровых доноров D393 (Фиг. 9A), D797 (Фиг. 9B) и D954 (Фиг. 9C). Противоопухолевый эффект определяли в отсутствие укороченного EGFR (tEGFR).

**[0087]** На *Фиг. 10A-10C* показаны иллюстративные результаты противоопухолевого эффекта в изменении среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (42 дней) в модели HT55 (эндогенно экспрессирующий GCC колоректальный рак, гистологический счет H-score для GCC = 300/300), которую лечили Т-клетками с CAR к GCC, полученными от три разных здоровых доноров D393 (Фиг. 10A), D797 (Фиг. 10B) и D954 (Фиг. 10C). Противоопухолевый эффект определяли в присутствии укороченного EGFR (tEGFR).

**[0088]** На *Фиг. 11A-11C* показаны иллюстративные результаты противоопухолевого эффекта в виде изменения среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (42 дней) в модели HT55 (эндогенно экспрессирующий GCC колоректальный рак, гистологический счет H-score для GCC = 300/300), которую лечили Т-клетками с CAR к GCC, полученными от три разных здоровых доноров D393 (Фиг. 11A), D954 (Фиг. 11B) и

D686 (Фиг. 11С). Противоопухолевый эффект определяли в отсутствие укороченного EGFR (tEGFR).

**[0089]** На *Фиг. 12А-12С* показаны иллюстративные результаты противоопухолевого эффекта в изменении среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (42 дней) в модели HT55 (эндогенно экспрессирующий GСC колоректальный рак, гистологический счет H-score для GСC = 300/300), которую лечили Т-клетками с CAR к GСC, полученными от три разных здоровых доноров D393 (Фиг. 12А), D954 (Фиг. 12В) и D686 (Фиг. 12С). Противоопухолевый эффект определяли в присутствии укороченного EGFR (tEGFR).

**[0090]** На *Фиг. 13А и 13В* показаны иллюстративные результаты противоопухолевого эффекта в виде изменения среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (42 дня) в модели GSU (эндогенно экспрессирующий GСC рак желудка, гистологический счет H-score для GСC= 170/300), которую лечили Т-клетками с CAR к GСC, полученными от двух разных здоровых доноров D393 (Фиг. 13А) и D954 (Фиг. 13В). Противоопухолевый эффект определяли в отсутствие укороченного EGFR (tEGFR)

**[0091]** На *Фиг. 14А и 14В* показаны иллюстративные результаты противоопухолевого эффекта в виде изменения среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (42 дня) в модели GSU (эндогенно экспрессирующий GСC рак желудка, гистологический счет H-score для GСC = 170/300), которую лечили Т-клетками с CAR к GСC, полученными от двух разных здоровых доноров D393 (Фиг. 14А) и D954 (Фиг. 14В). Противоопухолевый эффект определяли в присутствии укороченного EGFR (tEGFR).

**[0092]** На *Фиг. 15А-С* показаны иллюстративные результаты противоопухолевого эффекта в виде изменения среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (42 дня) в модели GSU (эндогенно экспрессирующий GСC рак желудка, гистологический счет H-score для GСC = 170/300), которую лечили Т-клетками с CAR к GСC, полученными от три разных здоровых доноров D393 (Фиг. 15А), D954 (Фиг. 15В) и D686 (Фиг. 15С). Противоопухолевый эффект определяли в отсутствие укороченного EGFR (tEGFR).

**[0093]** На *Фиг. 16А-С* показаны иллюстративные результаты противоопухолевого эффекта в виде изменения среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (42 дня) в модели GSU (эндогенно экспрессирующий GСC рак желудка, гистологический счет H-score для GСC = 170/300), которую лечили Т-клетками с CAR к GСC, полученными от три разных здоровых доноров D393 (Фиг. 16А), D954 (Фиг. 16В) и D686 (Фиг. 16С). Противоопухолевый эффект определяли в отсутствие укороченного EGFR (tEGFR).

[0094] На Фиг. 17 показана иллюстративная противоопухолевая эффективность в виде изменения среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (42 дня) в модели LS1034 (эндогенно экспрессирующий GСC колоректальный рак, гистологический счет H-score для GСC= 300/300), которую лечили Т-клетками с CAR к GСC, полученными от здорового донора. Противоопухолевый эффект определяли в отсутствие укороченного EGFR (tEGFR).

[0095] На Фиг. 18 показаны иллюстративные результаты противоопухолевого эффекта в виде изменения среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (42 дня) в модели LS1034 (эндогенно экспрессирующий GСC колоректальный рак, гистологический счет H-score для GСC= 300/300), которую лечили Т-клетками с CAR к GСC, полученными от здорового донора. Противоопухолевый эффект определяли в присутствии укороченного EGFR (tEGFR).

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0096] Для того, чтобы настоящее изобретение было более понятным, сначала представлены определения некоторых терминов. Дополнительные определения для следующих терминов и других терминов изложены в описании.

[0097] Использование в данном описании и в прилагаемой формуле изобретения форм единственного числа включает ссылку на множественное число, если в контексте явно не указано иное. Таким образом например, ссылка на «способ» включает один или большее количество способов и/или этапов типа, описанного в данном документе, и/или которые станут очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения настоящего описания и т.д.

[0098] *Введение*: в контексте данного документа термин «введение» композиции субъекту означает введение, нанесение или приведение композиции в контакт с субъектом. Введение можно осуществлять любым из ряда путей, таких как, например, местный, пероральный, подкожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, интратекальный и интрадермальный.

[0099] *Аффинность*: в контексте данного документа термин «аффинность» относится к характеристикам связывающего взаимодействия между связывающим фрагментом (например, антигенсвязывающим агентом (например, описанным в данном документе переменным доменом) и мишенью (например, антигеном (например, GСC), что указывает на силу связывающего взаимодействия. В некоторых вариантах



осуществления показатель аффинности выражается в виде константы диссоциации ( $K_D$ ). В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент имеет высокую аффинность к мишени (например,  $K_D$  составляет менее около  $10^{-7}$  М, менее около  $10^{-8}$  М или менее около  $10^{-9}$  М). В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент имеет низкую аффинность к мишени (например,  $K_D$  выше около  $10^{-7}$  М, выше около  $10^{-6}$  М, выше около  $10^{-5}$  М или выше около  $10^{-4}$  М).

**[0100]** *Животное*: В контексте данного документа термин «животное» относится к любому члену царства животных. В некоторых вариантах осуществления «животное» относится к людям на любой стадии развития. В некоторых вариантах осуществления термин «животное» относится к отличным от человека животным на любой стадии развития. В определенных вариантах осуществления изобретения животное, не являющееся человеком, представляет собой млекопитающее (*например*, грызун, мышь, крысу, кролик, обезьяну, собаку, кошку, овцу, крупный рогатый скот, примат и/или свинью). В некоторых вариантах осуществления животные включают, но не ограничиваются ими, млекопитающих, птиц, рептилий, земноводных, рыб, насекомых и/или червей. В некоторых вариантах осуществления животное может быть трансгенным животным, генно-модифицированным животным и/или клоном.

**[0101]** *Аутологичный*: в контексте данного документа термин «аутологичный» относится к любому материалу, полученному от того же самого индивида, в организм которого он позже будет повторно введен.

**[0102]** *Аллогенный*: «аллогенный» относится к материалу, полученному от одного индивида и введенному другому индивиду или индивидам.

**[0103]** *Антитело или антигенсвязывающий агент*: в контексте данного документа термин «антитело» или «антигенсвязывающий агент» относится к полипептиду, который включает элементы канонических последовательностей иммуноглобулина, достаточные для обеспечения специфического связывания с конкретным антигеном-мишенью. Специалистам в данной области техники понятно, что термины могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо. В некоторых вариантах осуществления термин «антитело» или «антигенсвязывающий агент» также относится к «фрагменту антитела» или «фрагментам антитела» или «антигенсвязывающей части», которая включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры «фрагментов антител» включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv; триатела; тетратела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител; и CDR-содержащие фрагменты, включенные в полиспецифические антитела,

образованные из фрагментов антител. Специалистам в данной области техники понятно, что термин «фрагмент антитела» не подразумевает и не ограничивается каким-либо конкретным способом образования. Фрагмент антитела может быть получен с использованием любой подходящей методологии, включая, помимо прочего, расщепление интактного антитела, химический синтез, рекомбинантное производство и т. д. Как известно в данной области техники, интактные антитела, образуемые в природе, представляют собой тетрамерные агенты с молекулярной массой приблизительно 150 кДа, состоящие из двух идентичных полипептидов тяжелой цепи (около 50 кДа каждый) и двух идентичных полипептидов легкой цепи (около 25 кДа каждый), которые связываются друг с другом в то, что обычно называют «Y-образной» структурой. Каждая тяжелая цепь состоит по меньшей мере из четырех доменов (каждый длиной около 110 аминокислот) - N-концевого переменного ( $V_H$ ) домена (расположенного на концах структуры Y), за которым следуют три константных домена:  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и C-концевой  $C_{H3}$  (расположенный в основании стебля Y). Короткая область, известная как «переключатель», соединяет переменную и константную области тяжелой цепи. «Шарнир» соединяет домены  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$  с остальной частью антитела. Две дисульфидные связи в этой шарнирной области соединяют два полипептида тяжелой цепи друг с другом в интактном антителе. Каждая легкая цепь состоит из двух доменов: N-концевого переменного ( $V_L$ ) домена, за которым следует C-концевой константный ( $C_L$ ) домен, отделенные друг от друга другим «переключателем». Тетрамеры интактных антител состоят из двух димеров тяжелая цепь-легкая цепь, в которых тяжелая и легкая цепи связаны друг с другом одной дисульфидной связью; две другие дисульфидные связи соединяют шарнирные области тяжелой цепи друг с другом, так что димеры соединяются друг с другом и образуется тетрамер. Природные антитела также являются гликозилированными, обычно в домене  $C_{H2}$ . Каждый домен в природном антителе имеет структуру, характеризующуюся «иммуноглобулиновой складкой», образованной из двух бета-листов (например, 3-, 4- или 5-цепочечных листов), упакованных друг против друга в сжатом антипараллельном бета-цилиндре. Каждый переменный домен содержит три гиперпеременные петли, известные как «определяющие комплементарность области» (CDR1, CDR2 и CDR3), и четыре в некоторой степени инвариантных «каркасных» области (FR1, FR2, FR3 и FR4). Когда природные антитела складываются, области FR образуют бета-листы, которые обеспечивают структурный каркас для доменов, а области петель CDR как тяжелой, так и легкой цепей объединяются в трехмерном пространстве, так что они создают единую гиперпеременную антигенсвязывающую сайт, расположенный на вершине Y-структуры. Сравнение аминокислотных последовательностей полипептидных цепей антител определило два

класса легких цепей ( $\kappa$  и  $\lambda$ ), несколько классов тяжелых цепей (например,  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ) и определенные подклассы тяжелых цепей ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$  и  $\gamma 4$ ). Классы антител (IgA [включая IgA1, IgA2], IgD, IgE, IgG [включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4] и IgM) определяются на основе класса используемых последовательностей тяжелых цепей.

**[0104]** Для целей настоящего изобретения в определенных вариантах осуществления любой полипептид или комплекс полипептидов, который включает в себя достаточные последовательности иммуноглобулиновых доменов, которые обнаруживаются в природных антителах, можно назвать и/или использовать как «антитело» или «антигенсвязывающий агент», независимо от того, продуцируется ли такой полипептид в естественных условиях (например, образуется организмом, реагирующим на антиген), или получен путем рекомбинантной инженерии, химического синтеза или при помощи другой искусственной системы или методологии. В некоторых вариантах осуществления антитело является моноклональным; в некоторых вариантах осуществления антитело является поликлональным. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет последовательности константной области, которые характерны для антител мыши, кролика, приматов или человека. В некоторых вариантах осуществления элементы последовательности антител являются гуманизированными, приматизированными, химерными и т. д., как известно в данной области техники. Более того, в контексте данного документа термин «антитело» или «антигенсвязывающий агент» следует понимать как включающий (если не указано иное или не ясно из контекста), может относиться в соответствующих вариантах осуществления к любой из известных в данной области техники или разработанных конструкций или форматов для использования структурных и функциональных особенностей антитела в альтернативном представлении. Например, в некоторых вариантах осуществления термины могут относиться к би- или другим полиспецифическим (например, Zybody и т. д.) антителам, малым модульным иммунофармацевтическим препаратам («SMIP™»), одноцепочечным антителам, верблюжьим антителам и/или фрагмента антител. В некоторых вариантах осуществления антитело может не иметь ковалентную модификацию (например, присоединение гликана), которую оно имело бы, если бы было получено естественным образом. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать ковалентную модификацию (например, присоединение гликана, полезную нагрузку [например, обнаруживаемый фрагмент, терапевтический фрагмент, каталитический фрагмент и т. д.] или другую боковую группу [например, полиэтиленгликоль и т. д.]).

**[0105]**        *Приблизительно или около:* в контексте данного документа термин «приблизительно» или «около» применительно к одному или большему количеству значений, представляющим интерес, относится к значению, которое аналогично установленному эталонному значению. В некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» или «около» относится к диапазону значений, которые попадают в пределы 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любую сторону (больше или меньше) от установленного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышало бы 100 % от возможного значения).

**[0106]**        *Определяющая комплементарность область (CDR):* «CDR» варибельного домена представляют собой аминокислотные остатки в пределах варибельной области, которые идентифицируют в соответствии с определениями по Kabat, Chothia, в соответствии с комбинацией Kabat и Chothia, AbM, Contact и/или конформационными определениями или любым способом определения CDR, хорошо известным в данной области техники. CDR антитела могут быть идентифицированы как гиперварибельные области, первоначально определенные Kabat et al. См., например, Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Положения CDR также могут быть идентифицированы как структурные петлевые структуры, первоначально описанные Chothia и другими. См., например, Chothia et al., Nature 342:877-883, 1989. Другие подходы к идентификации CDR включают «определение AbM», которое является компромиссом между Kabat и Chothia и получено с использованием программного обеспечения для моделирования антител Oxford Molecular AbM (теперь Accelrys®), или «определение Contact» CDR на основе наблюдаемых контактов с антигеном, которое изложено в MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745, 1996. В другом подходе, называемом в данном документе «конформационным определением» CDR, положения CDR могут быть идентифицированы как остатки, которые вносят энтальпийный вклад в связывание антигена. См, например, Makabe et al., Journal of Biological Chemistry, 283: 1 156-1166, 2008. Тем не менее, другие определения границ CDR могут не строго соответствовать одному из описанных выше подходов, но, тем не менее, будут перекрываться, по крайней мере, с частью CDR по Kabat, хотя они могут быть укорочены или удлинены в свете прогнозов или экспериментальных данных о том, что отдельные остатки или группы остатков или даже целые CDR существенно не влияют на связывание антигена. Если не указано иное, используемые в данном документе определения CDR соответствуют CDR по Kabat.

**[0107]**        *Эффекторные функции:* в контексте данного документа термин «эффекторные функции» относится к тем биологическим активностям, которые присущи антигенсвязывающему агенту, описанному в данном документе. Примеры эффекторных функций антител включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность; связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; снижение экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, рецепторов В-клеток; и активацию В-клеток. «Сниженная или минимизированная» эффекторная функция антитела означает, что она снижена по меньшей мере на 50% (альтернативно 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99%) от дикого типа или немодифицированного антитела. Определение эффекторной функции антитела может быть легко определено и измерено специалистом в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления затрагиваются эффекторные функции антитела по связыванию комплемента, комплементзависимой цитотоксичности и антителозависимой цитотоксичности. В некоторых вариантах осуществления эффекторная функция устраняется посредством мутации в константной области, устраняющей гликозилирование, например, «мутации, которая устраняет эффекторную функцию». В одном аспекте «мутация, которая устраняет эффекторную функцию» представляет собой мутацию N297A или DANA (D265A+N297A) в области CH2. Shields et al., J. Biol. Chem. 276(9): 6591-6604 (2001). Альтернативно, дополнительные мутации, приводящие к уменьшению или устранению эффекторной функции, включают: K322A и L234A/L235A (LALA). В качестве альтернативы, эффекторная функция может быть уменьшена или устранена с помощью методов продукции, таких как экспрессия в клетках-хозяевах, которые не гликозилируют (например, E. coli) или которые приводят к измененному профилю гликозилирования, который неэффективен или менее эффективен для стимулирования эффекторной функции (например, Shinkawa et al., J. Biol. Chem. 278 (5):3466-3473 (2003).

**[0108]**        «*Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность* или АЗКЦ относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig, связанный с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, натуральных клетках-киллерах (NK-клетках), нейтрофилах и макрофагах), позволяет этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с несущей антиген целевой клеткой и впоследствии уничтожать целевую клетку цитотоксинами. Антитела «приводят в готовность» цитотоксические клетки и необходимы для уничтожения клетки-мишени по этому механизму. Первичные клетки, опосредующие АЗКЦ, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют

Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII и Fc $\gamma$ RIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках приведена в таблице 3 на странице 464 в Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991). Для оценки активности АЗКЦ представляющей интерес молекулы может быть проведен анализ АЗКЦ *in vitro*, описанный в патенте США № 5500362 или 5821337. Эффекторные клетки, пригодные для такого анализа, включают моноклеарные клетки периферической крови (РВМС) и природные клетки-киллеры (НК). В качестве альтернативы или дополнения, активность АЗКЦ представляющей интерес молекулы можно оценить *in vivo*, например, в животной модели, например, согласно описанию в публикации Clynes et al., PNAS USA 95: 652-656 (1998).

**[0109]** *Антиген:* в контексте данного документа термин «антиген» относится к агенту, вызывающему иммунный ответ; и/или агенту, который связывается с Т-клеточным рецептором (например, при презентации молекулой МНС) или с антителом (например, продуцируемым В-клеткой) при воздействии или введении в организм. В некоторых вариантах осуществления антиген вызывает гуморальный ответ (например, включая продукцию антигенспецифических антител) в организме; альтернативно или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления антиген вызывает клеточный ответ (например, с участием Т-клеток, рецепторы которых специфически взаимодействуют с антигеном) в организме. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что конкретный антиген может вызывать иммунный ответ у одного или более представителей организма-мишени (например, у мышей, кроликов, приматов, людей), но не у всех представителей вида организма-мишени. В некоторых вариантах осуществления антиген вызывает иммунный ответ у по меньшей мере около 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% представителей вида организма-мишени. В некоторых вариантах осуществления антиген связывается с антителом и/или Т-клеточным рецептором и может индуцировать или не индуцировать конкретный физиологический ответ в организме. В некоторых вариантах осуществления, например, антиген может связываться с антителом и/или с Т-клеточным рецептором *in vitro* независимо от того, происходит ли такое взаимодействие *in vivo*. В некоторых вариантах антиген реагирует с продуктами специфического гуморального или клеточного иммунитета, в том числе индуцируемого гетерологичными иммуногенами. В некоторых вариантах осуществления раскрытых композиций и способов белок GCC представляет собой антиген.

**[0110]** *Связаны с:* Два события или объекта «связаны» друг с другом в том смысле, в котором этот термин используется в данном документе, если присутствие, уровень и/или

форма одного коррелируют с таковым другого. Например, конкретный объект (например, полипептид) считается связанным с конкретным заболеванием, нарушением или патологическим состоянием, если его наличие, уровень и/или форма коррелируют с частотой и/или восприимчивостью заболевания, нарушения или патологического состояния (например, среди соответствующей группы населения). В некоторых вариантах осуществления два или более объекта физически «связаны» друг с другом, если они взаимодействуют, напрямую или опосредовано, так что они находятся и остаются в физической близости друг с другом. В некоторых вариантах осуществления два или более объектов, которые физически связаны друг с другом, ковалентно связаны друг с другом; в некоторых вариантах осуществления два или более объектов, которые физически связаны друг с другом, не связаны друг с другом ковалентной связью, а связаны нековалентно, например, посредством водородных связей, взаимодействия Ван-дер-Ваальса, гидрофобных взаимодействий, магнетизма и их комбинаций.

**[0111]** *Связывание:* следует понимать, что используемый в данном документе термин «связывание» обычно относится к нековалентной ассоциации между двумя или более объектами или между ними. «Прямое» связывание включает физический контакт между объектами или группами; косвенное связывание включает физическое взаимодействие посредством физического контакта с одним или более промежуточными объектами. Связывание между двумя или более объектами можно оценить в любом из множества контекстов, в том числе в тех случаях, когда взаимодействующие объекты или группы изучаются по отдельности или в контексте более сложных систем (например, будучи ковалентно или иным образом связаны с субъектом-носителем и/или в биологической системе или клетке). В контексте данного документа термин « $K_a$ » относится к скорости ассоциации конкретной связывающей части и мишени с образованием комплекса связывающий фрагмент / мишень. В контексте данного документа термин « $K_d$ » относится к скорости диссоциации конкретного комплекса связывающий фрагмент / мишень. В контексте данного документа термин « $K_D$ » относится к константе диссоциации, которую получают из отношения  $K_d$  к  $K_a$  (т.е.,  $K_d/K_a$ ) и выражают в виде молярной концентрации (M). Значения  $K_D$  можно определить с использованием способов, хорошо зарекомендовавших себя в данной области техники, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса или с использованием биосенсорной системы, такой как система Biacore®.

**[0112]** *Носитель:* в контексте данного документа термин «носитель» относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или наполнителю, с которым вводят композицию. В

некоторых примерных вариантах осуществления носители могут включать стерильные жидкости, такие как, например, вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как, например, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. В некоторых вариантах осуществления носители представляют собой или включают один или более твердых компонентов.

**[0113]** *Характерная часть:* в контексте данного документа термин «характерная часть» используется в самом широком смысле для обозначения части субстанции, присутствие (или отсутствие) которой коррелирует с присутствием (или отсутствием) определенной характеристики, характерного признака или активности субстанции. В некоторых вариантах осуществления характерная часть субстанции представляет собой часть, которая обнаруживается в данном веществе и в родственных субстанциях, которые имеют общую характеристику, характерный признак или активность, но не в субстанциях, которые не имеют общей характеристики, характерного признака или активности.

**[0114]** *Кодон-оптимизированная:* в контексте данного термина термин «кодон-оптимизированная» последовательность нуклеиновой кислоты относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая была изменена таким образом, что трансляция последовательности нуклеиновой кислоты и экспрессия полученного белка улучшены, оптимизированы для конкретной системы экспрессии. «Кодон-оптимизированная» последовательность нуклеиновой кислоты кодирует тот же белок, что и неоптимизированная исходная последовательность, на которой основана «кодон-оптимизированная» последовательность нуклеиновой кислоты. Например, последовательность нуклеиновой кислоты может быть «кодон-оптимизирована» для экспрессии в клетках млекопитающих (например, клетках СНО, клетках человека, клетках мыши и т.д.), бактериальных клетках (например, *E.coli*), клетках насекомых, дрожжевых клетках или растительных клетках.

**[0115]** *Сопоставимый:* в контексте данного документа термин «сопоставимый» относится к двум или более агентам, объектам, ситуациям, наборам условий и т. д., которые могут не быть идентичными друг другу, но достаточно сходными, чтобы можно было провести сравнение между ними, так что выводы могут быть обоснованно сделаны на основе наблюдаемых различий или сходств. Специалистам в данной области техники из контекста будет понятно, какая степень идентичности требуется в любом данном случае, чтобы два или большее количество таких средств, объектов, ситуаций, наборов условий и т.д. считались сопоставимыми.



**[0116]**        *Соответствует:* в контексте данного документа термин «соответствует» часто используется для обозначения положения/идентичности аминокислотного остатка в представляющем интерес полипептиде. Для специалистов в данной области техники будет понятно, что для простоты остатки в полипептиде часто обозначаются с использованием канонической системы нумерации, основанной на эталонном родственном полипептиде, так что аминокислота, «соответствующая» остатку в положении 190, например, в действительности не обязательно должна быть 190-ой аминокислотой в конкретной аминокислотной цепи, а скорее соответствовать остатку, обнаруживаемому в положении 190 в эталонном полипептиде; специалисты в данной области техники легко поймут, как идентифицировать «соответствующие» аминокислоты.

**[0117]**        *Получена из:* в контексте данного документа фраза «получена из» или «специфична для указанной последовательности» относится к последовательности, которая включает непрерывную последовательность из по меньшей мере 6 нуклеотидов или по меньшей мере 2 аминокислот, по меньшей мере 9 нуклеотидов или по меньшей мере 3 аминокислот, по меньшей мере около 10-12 нуклеотидов или 4 аминокислот, или по меньшей мере около 15-21 нуклеотид или 5-7 аминокислот, соответствующих, т.е. идентичных или комплементарных, например, смежной области указанной последовательности. В определенных вариантах осуществления последовательность включает всю указанную нуклеотидную или аминокислотную последовательность. Последовательность может быть комплементарной (в случае полинуклеотидной последовательности) или идентичной области последовательности, которая уникальна конкретной последовательности, как это определено с помощью способов, известных в данной области техники. Области, из которых могут быть получены последовательности, включают, но не ограничиваются ими, области, кодирующие специфические эпитопы, области, кодирующие CDR, области, кодирующие каркасные последовательности, области, кодирующие области константного домена, области, кодирующие области переменного домена, а также нетранслируемые и/или нетранскрибируемые области. Полученная последовательность не обязательно будет получена физически из исследуемой последовательности, но может быть получена любым способом, включая, помимо прочего, химический синтез, репликацию, обратную транскрипцию или транскрипцию, которая основана на информации, которая представлена последовательностью оснований в области(-ях), из которой получен полинуклеотид. Таким образом, он может представлять либо смысловую, либо бессмысловую ориентацию исходного полинуклеотида. Кроме того, комбинации областей, соответствующие таковым в указанной последовательности, могут быть модифицированы или объединены способами, известными в данной области

техники, чтобы соответствовать предполагаемому применению. Например, последовательность может состоять из двух или более смежных последовательностей, каждая из которых содержит часть указанной последовательности и прерывается участком, который не идентичен указанной последовательности, но предназначен для представления последовательности, полученной из указанной последовательности. Что касается молекул антител, «полученная из нее» включает молекулу антитела, которая функционально или структурно родственна антителу для сравнения, например, «полученная из нее» включает молекулу антитела, имеющую подобную или по существу такую же последовательность или структуру, например, имеющую такую же или аналогичные CDR, каркасные или переменные области. «Полученная из него» для антитела также включает остатки, например, один или более, например, 2, 3, 4, 5, 6 или более остатков, которые могут быть или не быть смежными, но определены или идентифицированы в соответствии со схемой нумерации или гомологией с общей структурой антитела, или трехмерной близостью, т.е. в пределах CDR или каркасной области последовательности сравнения. Термин «полученная из него» не ограничивается физически полученной из него, но включает получение любым способом, например, путем использования информации о последовательности из антитела для сравнения для конструирования другого антитела.

**[0118] *Определить:*** Многие методологии, описанные в данном документе, включают стадию «определения». Специалистам в данной области техники, прочитавшим настоящее описание, будет понятно, что такое «определение» может использовать любой из множества способов, доступных специалистам в данной области техники, включая, например, конкретные способы, явно указанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления определение включает манипуляции с физическим образцом. В некоторых вариантах осуществления определение включает рассмотрение и/или манипуляцию данными или информацией, например, с помощью компьютера или другого вычислительного устройства, приспособленного для выполнения соответствующего анализа. В некоторых вариантах осуществления определение включает получение соответствующей информации и/или материалов из источника. В некоторых вариантах осуществления определение включает сравнение одного или более признаков образца или объекта с сопоставимым эталоном.

**[0119] *Сконструированный:*** в контексте данного документа термин «сконструированный» описывает полинуклеотид, полипептид или клетку, которые были сконструированы или модифицированы человеком и/или для создания и производства которых требуется вмешательство и/или активность человека. Например,

сконструированная клетка, специально созданная для получения определенного эффекта и отличающаяся от эффекта природных клеток того же типа. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка экспрессирует химерный антигенный рецептор, описанный в данном документе. Иллюстративные способы конструирования описаны в разделах подробного описания и примеров.

**[0120]** *Эпитоп:* в контексте данного документа термин «эпитоп» включает любой фрагмент, который специфически распознается компонентом связывания иммуноглобулина (например, антитела или рецептора) полностью или частично. В некоторых вариантах осуществления эпитоп состоит из множества аминокислот в антигене. В некоторых вариантах осуществления такие аминокислотные остатки экспонируются на поверхности, когда антиген принимает соответствующую трехмерную конформацию. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки физически находятся рядом или граничат друг с другом, когда антиген принимает такую конформацию. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере некоторые из аминокислот физически отделены друг от друга, когда антиген принимает альтернативную конформацию (например, линеаризуется; например, нелинейный эпитоп).

**[0121]** *Экципиент:* в контексте данного документа термин «эксципиент» относится к нетерапевтическому агенту, который может быть включен в фармацевтическую композицию, например, для обеспечения или достижения необходимой консистенции или стабилизирующего эффекта. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают, например, крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерин, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т. п.

**[0122]** *Экспрессия:* термин «экспрессия» или «экспрессированный», когда он используется в отношении нуклеиновой кислоты в данном документе, относится к одному или более из следующих событий: (1) продуцирование РНК-транскрипта матрицы ДНК (например, путем транскрипции); (2) процессинг РНК-транскрипта (например, путем сплайсинга, редактирования, образования 5'-кэпа и/или образования 3'-конца); (3) трансляция РНК в полипептид; и/или (4) посттрансляционная модификация полипептида.

**[0123]** *Ex vivo:* в контексте данного документа термин «ex vivo» относится к событиям, происходящим во внешней среде, например, вне многоклеточного организма. В некоторых вариантах осуществления клетку или популяцию клеток модифицируют вне тела многоклеточного организма (например, млекопитающего, такого как отличный от

человека примат или человек) для экспрессии молекулы анти-GCC, описанной в данном документе, перед введением такой клетки или популяции клеток нуждающемуся в этом субъекту.

**[0124]** *Слитый белок:* в контексте данного документа термин «слитый белок» относится к белку, кодируемому последовательностью нуклеиновой кислоты, сконструированной из последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих по меньшей мере часть двух разных (например, гетерологичных) белков. Как, несомненно, известно специалистам в данной области техники, для создания слитого белка последовательности нуклеиновых кислот соединяют таким образом, чтобы полученная рамка считывания не содержала внутреннего стоп-кодона. В некоторых вариантах осуществления слитые белки, как описано в данном документе, включают полипептид НА гриппа или его фрагмент.

**[0125]** *Гуанилатциклаза C (GCC):* в контексте данного документа термин «GCC», также известный как белок «STAR», «GUC2C», «GUCY2C» или «рецептора ST», относится к GCC млекопитающих, предпочтительно к белку GCC человека. GCC человека относится к белку, описанному в GenBank под номером доступа: NM-004963, и его природным аллельным белковым вариантам. Другие варианты известны в данной области техники. См., например, номер доступа Ensp0000261170 в базе данных Ensembl Европейского института биоинформатики и института Сенгера, заявку на патент США № 20060035852; или номер доступа в GenBank AAB 19934. Как правило, природный аллельный вариант имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 97% или 99% идентичности с последовательностью GCC SEQ ID NO: 41. Транскрипт кодирует белковый продукт из 1073 аминокислот и описан в GenBank под номером доступа: NM-004963. Белок GCC характеризуется как трансмембранный рецепторный белок клеточной поверхности, и считается, что он играет критическую роль в регуляции кишечного сока, электролитного гомеостаза и пролиферации клеток.

**[0126]** *Хозяин:* термин «хозяин» используется в данном документе для обозначения системы (например, клетки, организма и т. д.), в которой присутствует представляющий интерес полипептид. В некоторых вариантах осуществления хозяин представляет собой систему, которая экспрессирует конкретный представляющий интерес полипептид.

**[0127]** *Клетка-хозяин:* в контексте данного документа выражение «клетка-хозяин» относится к клетке, в которую была внесена экзогенная ДНК (рекомбинантная или иная). Например, клетки-хозяева можно использовать для получения полипептидов, описанных в данном документе, с помощью стандартных рекомбинантных методов. Специалисты в данной области техники поймут, что такие термины относятся не только к конкретной

клетке субъекта, но и к потомству такой клетки. Поскольку определенные модификации могут происходить в последующих поколениях из-за мутаций или влияния окружающей среды, такое потомство может фактически не быть идентичным исходной клетке, но все же включено в объем термина «клетка-хозяин», который используется в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева включают любые прокариотические и эукариотические клетки, подходящие для экспрессии экзогенной ДНК (например, последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты). Иллюстративные клетки включают клетки прокариот и эукариот (одноклеточные или многоклеточные), бактериальные клетки (например, штаммы *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. и т.д.), клетки микобактерий, грибковые клетки грибов, клетки дрожжей (например, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. Methanolica* и т.д.), клетки растений, клетки насекомых (например, SF-9, SF-21, инфицированные бакуловирусом клетки насекомых, *Trichoplusia ni* и т.д.), клетки животных, отличных от человека, клетки человека или клеточные гибриды, такие как, например, гибридомы или квадромы. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. В некоторых вариантах осуществления клетка является эукариотической и выбрана из следующих клеток: CHO (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клетка сетчатки, Vero, CV1, клетка почки (например, HEK293, HEK293T, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (например, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (эпидермальный), CV-1, U937, 3T3, клетка L, клетка C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, клетка Сертоли, клетка BRL 3A, клетка HT1080, миеломная клетка, опухолевая клетка и линия клеток, полученная из вышеупомянутой клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или большее количество вирусных генов, например, клетка сетчатки, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетка PER.C6™).

**[0128]** *Иммунный ответ*: в контексте данного документа термин «иммунный ответ» относится к ответу клетки иммунной системы, такой как В-клетка, Т-клетка, дендритная клетка, макрофаг или полиморфонуклеоцит, на стимул, такой как антиген или вакцина. Иммунный ответ может включать любую клетку организма, участвующую в защитном ответе хозяина, включая, например, эпителиальную клетку, секретирующую интерферон или цитокин. Иммунный ответ включает, но не ограничивается ими, врожденный и/или адаптивный иммунный ответ. В данном контексте защитный иммунный ответ относится к иммунному ответу, который защищает субъекта от инфекции (предотвращает заражение или предотвращает развитие заболевания, связанного с инфекцией). Способы измерения иммунных ответов хорошо известны в данной области

техники и включают, например, измерение пролиферации и/или активности лимфоцитов (таких как В- или Т-клетки), секреции цитокинов или хемокинов, воспаления, продукции антител и т.п.

**[0129]** *In vitro*: в контексте данного документа термин «*in vitro*» относится к событиям, которые происходят в искусственной среде, например, в пробирке или реакционном сосуде, в культуре клеток и т. д., а не в многоклеточном организме.

**[0130]** *In vivo*: в контексте данного документа термин «*in vivo*» относится к событиям, которые происходят в многоклеточном организме, таком как человек и отличное от человека животное. В контексте систем на основе клеток данный термин может использоваться для обозначения событий, которые происходят внутри живой клетки (в отличие, например, от систем *in vitro* или *ex vivo* ).

**[0131]** *Выделенный*: в контексте данного документа термин «выделенный» относится к веществу и/или объекту, которые были (1) отделены по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми они были связаны при первоначальной выработке (в природе и/или в экспериментальных условиях), и/или (2) получены, изготовлены и/или произведены человеком. Выделенные вещества и/или объекты могут быть отделены от около 10%, около 20%, около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более чем около 99% других компонентов, с которыми они были первоначально связаны. В некоторых вариантах осуществления выделенные агенты имеют чистоту около 80 %, около 85 %, около 90 %, около 91 %, около 92 %, около 93 %, около 94 %, около 95 %, около 96 %, около 97 %, около 98 %, около 99 % или более чем около 99 %. Как используется в данном документе, субстанция является «чистой», если она по существу не содержит других компонентов. В некоторых вариантах осуществления, как будет понятно специалистам в данной области техники, субстанция может все еще считаться «выделенной» или даже «чистой» после объединения с некоторыми другими компонентами, такими как, например, один или более носителей или эксципиентов (например, буфера, растворителя, воды и т. д.); в таких вариантах осуществления процент выделения или чистоты вещества рассчитывают без учета таких носителей или эксципиентов. Например, в некоторых вариантах осуществления биологический полимер, такой как полипептид или полинуклеотид, который встречается в природе, считается «выделенным», когда: а) в силу своего происхождения или источника получения он не связан с некоторыми или всеми из компонентов, которые находятся вместе с ним в его естественном состоянии в природе; б) он по существу не содержит других

полипептидов или нуклеиновых кислот того же вида, который его вырабатывает в природе; с) он экспрессируется или иным образом находится в ассоциации с компонентами клетки или другой экспрессионной системы, которая не относится к виду, который его вырабатывает в природе. Таким образом, например, в некоторых вариантах осуществления полипептид, который синтезирован химически или синтезирован в клеточной системе, отличной от той, которая вырабатывает его в природе, считается «выделенным» полипептидом. В некоторых альтернативных или дополнительных вариантах осуществления полипептид, который был подвергнут одному или более способам очистки, может считаться «выделенным» полипептидом в той степени, в которой он был отделен от других компонентов, а) с которыми он связан в природе; и/или б) с которыми он был связан при первоначальной выработке. В некоторых вариантах осуществления клетки можно «выделить» (например, очистить или отделить) от других клеток. Например, в некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные клетки, сконструированные для экспрессии описанного в данном документе CAR, могут быть выделены из немодифицированных клеток.

**[0132]** *Нуклеиновая кислота:* в контексте данного документа выражение «нуклеиновая кислота» в самом широком смысле относится к любому соединению и/или субстанции, которая включена или может быть включена в олигонуклеотидную цепь. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой соединение и/или субстанцию, которая входит или может быть включено в олигонуклеотидную цепь посредством фосфодиэфирной связи. Как будет понятно из контекста, в некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» относится к отдельным остаткам нуклеиновой кислоты (например, нуклеотидам и/или нуклеозидам); в некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» относится к олигонуклеотидной цепи, содержащей отдельные остатки нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой или содержит РНК; в некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой или содержит ДНК. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой, содержит или состоит из одного или более остатков естественной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» представляет собой, содержит или состоит из одного или более аналогов нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления аналог нуклеиновой кислоты отличается от «нуклеиновой кислоты» тем, что он не использует фосфодиэфирный каркас. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одной или более «пептидных нуклеиновых кислот», которые известны в данной области техники

и каркас которых содержит пептидные связи вместо фосфодиэфирных связей, которые рассматриваются в рамках данного изобретения. Альтернативно или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» имеет одну или более фосфоротиоатных и/или 5'-N-фосфорамидитных связей, а не фосфодиэфирных связей. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, содержит или состоит из одного или более природных нуклеозидов (например, аденозина, тимидина, гуанозина, цитидина, уридина, дезоксиаденозина, дезокситимидина, дезоксигуанозина и дезоксицитидина). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой, включает или состоит из одного или более нуклеозидных аналогов (например, 2-аминоаденозина, 2-тиотимидина, инозина, пирролопиримидина, 3-метиладенозина, 5-метилцитидина, C-5 пропинилцитидина, C-5 пропинил-уридина, 2-аминоаденозина, C5-бромуридина, C5-фторуридина, C5-йодуридина, C5-пропинил-уридина, C5-пропинил-цитидина, C5-метилцитидина, 2-аминоаденозина, 7-аминоазадина, 7-дезагуанозина, 8-оксоаденозина, 8-оксогуанозина, O(6)-метилгуанина, 2-тиоцитидина, метилированных оснований, интеркалированных оснований и их комбинации). В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота включает один или более модифицированных сахаров (например, 2'-фторрибозу, рибозу, 2'-дезоксирибозу, арабинозу и гексозу) по сравнению с таковыми в естественных нуклеиновых кислотах. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» имеет нуклеотидную последовательность, которая кодирует функциональный генный продукт, такой как РНК или белок. В некоторых вариантах осуществления «нуклеиновая кислота» включает один или более интронов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты получают путем одного или более из выделения из природного источника, ферментативного синтеза путем полимеризации на основе комплементарной матрицы (*in vivo* или *in vitro*), размножения в рекомбинантной клетке или системе и химического синтеза. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет длину по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или более остатков. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является одноцепочечной; в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является двухцепочечной. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, которая содержит по меньшей мере один элемент, который кодирует полипептид, или является комплементарной последовательности,



которая кодирует полипептид. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота обладает ферментативной активностью.

**[0133]** *Фармацевтически приемлемые носители*: Фармацевтически приемлемые носители (наполнители), применимые в данном описании, являются обычными. В Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15<sup>th</sup> Edition (1975) описаны композиции и составы, подходящие для фармацевтической доставки одной или более терапевтических композиций (например, композиция, содержащая описанный в данном документе химерный антигенный рецептор) и дополнительные фармацевтические агенты. В общем, природа носителя будет зависеть от конкретного применяемого способа введения. Например, парентеральные составы обычно содержат жидкости для инъекций, которые включают фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как вода, физиологический солевой раствор, сбалансированные растворы солей, водный раствор декстрозы, глицерин и т.п. в качестве носителя. Для твердых композиций (например, в форме порошка, пилюль, таблеток или капсул) обычные нетоксичные твердые носители могут включать, например, маннит фармацевтической степени чистоты, лактозу, крахмал, или стеарат магния. В дополнение к биологически нейтральным носителям, фармацевтические композиции, подлежащие введению, могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты, буферные агенты pH и тому подобное, например, ацетат натрия или монолаурат сорбитана.

**[0134]** *Полипептид*: «полипептид», вообще говоря, представляет собой участок из по меньшей мере двух аминокислот, соединенных друг с другом пептидной связью. В некоторых вариантах осуществления полипептид может включать по меньшей мере 3-5 аминокислот, каждая из которых присоединена к другим посредством по меньшей мере одной пептидной связи. Специалистам в данной области техники будет понятно, что полипептиды иногда включают «неприродные» аминокислоты или другие соединения, которые, тем не менее, способны интегрироваться в полипептидную цепь, при необходимости. В некоторых вариантах осуществления термин «полипептид» используется для обозначения конкретных функциональных классов полипептидов, таких как полипептиды антител, химерных антигенных рецепторов или костимулирующих доменов и т. д. Для каждого такого класса в настоящем описании приведены и/или известны из уровня техники несколько примеров аминокислотных последовательностей известных иллюстративных полипептидов в этом классе; в некоторых вариантах осуществления один или более таких известных полипептидов являются эталонными

полипептидами для данного класса. В таких вариантах осуществления термин «полипептид» относится к любому члену класса, который демонстрирует достаточную гомологию последовательности или идентичность с соответствующим эталонным полипептидом, чтобы специалист в данной области техники понял, что он должен быть включен в данный класс. Во многих вариантах осуществления член репрезентативного класса также обладает значительной активностью по отношению к эталонному полипептиду. Например, в некоторых вариантах осуществления полипептид-член демонстрирует общую степень гомологии последовательности или идентичности с эталонным полипептидом, которая составляет по меньшей мере около 30-40%, а часто превышает около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более и/или включает по меньшей мере одну область (т. е. консервативную область, часто включающую характерный элемент последовательности), которая демонстрирует очень высокую идентичность последовательности, часто более 90% или даже 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. Такая консервативная область обычно включает по меньшей мере 3-4, а часто до 20 или более аминокислот; в некоторых вариантах осуществления консервативная область включает по меньшей мере один участок из по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более смежных аминокислот.

**[0135]** Понятно, что антитела и антигенсвязывающие агенты по изобретению могут иметь дополнительные консервативные замены или замены заменимых аминокислот, которые не оказывают существенного влияния на функции полипептида. Будет ли определенная замена допустимой, т.е. не будет ли она неблагоприятно влиять на желаемые биологические свойства, такие как активность связывания, можно определить, как описано в Bowie, J U et al. Science 247:1306-1310 (1990) или Padlan et al. FASEB J. 9:133-139 (1995). «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой консервативную аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток замещен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники. 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, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

**[0136]** *Предотвращение:* в контексте данного документа термин «предотвращение» относится к профилактике, недопущению проявления заболевания, задержке начала и/или снижению частоты и/или степени тяжести одного или более симптомов конкретного заболевания, нарушения или патологического состояния (например, заражения, например, вирусом гриппа). В некоторых вариантах осуществления предотвращение оценивается на популяционной основе, так что агент считается «предотвращающим» конкретное заболевание, нарушение или патологическое состояние, если наблюдается статистически значимое снижение развития, частоты и/или интенсивности проявления одного или более симптомов заболевания, нарушения или патологического состояния в популяции, предрасположенной к развитию заболевания, нарушения или патологического состояния.

**[0137]** *Чистый:* в контексте данного документа агент или соединение являются «чистыми», если они по существу свободны от других компонентов. Например, препарат, который содержит более около 90% конкретного агента или соединения, как правило, считается чистым препаратом. В некоторых вариантах осуществления агент или соединение имеют 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% чистоты.

**[0138]** *Рекомбинантный:* в контексте данного документа термин «рекомбинантный» предназначен для обозначения полипептидов (например, полипептидов, описанных в данном документе), которые разработаны, сконструированы, приготовлены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами, такими как полипептиды, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяин, полипептидов, выделенных из библиотеки рекомбинантных, комбинаторных полипептидов, или полипептидов, полученных, экспрессированных, созданных или выделенных любыми другими способами, которые включают сплайсинг выбранных элементов последовательности друг с другом. В некоторых вариантах осуществления один или более таких выбранных элементов последовательности встречаются в природе. В некоторых вариантах осуществления один или более таких выбранных элементов последовательности и/или их комбинаций разработаны *in silico*. В некоторых вариантах осуществления один или более таких выбранных элементов последовательности являются результатом комбинации нескольких (например, двух или более) известных элементов последовательности, которые не

присутствуют в природе в одном и том же полипептиде (например, два эпитопа из двух отдельных полипептидов НА).

**[0139]**        *Эталонный*: термин «эталонный» часто используется в данном документе для описания стандартного или контрольного агента, индивида, популяции, образца, последовательности или значения, с которым сравнивается представляющий интерес агент, индивид, популяция, образец, последовательность или значение. В некоторых вариантах осуществления эталонный агент, индивид, популяция, образец, последовательность или значение тестируются и/или определяются по существу одновременно с тестированием или определением агента, индивида, популяции, образца, последовательности или значения, представляющих интерес. В некоторых вариантах осуществления эталонный агент, индивид, популяция, образец, последовательность или значение представляют собой историческую ссылку, необязательно воплощенную в материальной среде. Как правило, как должно быть понятно специалистам в данной области техники, эталонный агент, индивид, популяция, образец, последовательность или значение определяются или характеризуются в условиях, сопоставимых с теми, которые используются для определения или характеристики агента, индивида, популяции, образца, последовательности или значения, представляющих интерес.

**[0140]**        *Однодоменное антитело*: в контексте данного документа термины «однодоменное антитело (sdAb)», «вариабельный одиночный домен» или «иммуноглобулиновый одиночный вариабельный домен (ISV)», «антитело на основе одного вариабельного домена тяжелой цепи (VH)» относятся к одиночному вариабельному фрагменту антитела, который связывается с антигеном-мишенью. Эти термины используются в данном документе взаимозаменяемо. sdAb представляет собой один антигенсвязывающий полипептид, имеющий три определяющие комплементарность области (CDR). Одно sdAb способно связываться с антигеном без образования пар с соответствующим CDR-содержащим полипептидом. Однодоменное антитело VH относится к однодоменному антителу, имеющему вариабельный домен тяжелой цепи человека или домен, полученный из вариабельного домена тяжелой цепи человека. В некоторых случаях однодоменные антитела конструируют из HCAb верблюдовых, а их вариабельные домены тяжелой цепи обозначают как «VHH». Некоторые VHH также могут быть известны как наноантитела. sdAb верблюдовых представляет собой один из самых маленьких известных антигенсвязывающих фрагментов антител (см., например, Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-8 (1993); Greenberg et al., Nature 374: 168-73 (1995); Hassanzadeh-Ghassabeh et al., Nanomedicine (Lond), 8:1013-26 (2013)). Базовая VHH имеет

следующую структуру от N-конца к C-концу: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, где FR1-FR4 относятся к каркасным областям 1-4, соответственно, и в которых CDR1-CDR3 относятся к определяющим комплементарность областям 1-3. Как объяснено ниже, некоторые варианты осуществления различных аспектов изобретения относятся к связывающему агенту, содержащему одиночный переменный домен тяжелой цепи антитела/одиночный переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, которые связывают антиген GCC в отсутствие легкой цепи.

**[0141]**        *Субъект*: в контексте данного документа термин «субъект» означает любое млекопитающее, включая людей. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения субъектом является взрослый, подросток или младенец. В некоторых вариантах осуществления используются термины «индивид» или «пациент», которые считаются взаимозаменяемыми с термином «субъект». Также настоящим изобретением предусмотрено введение фармацевтических композиций и/или выполнение способов лечения *in utero*. Например, субъект может быть пациентом (например, пациентом-человеком или ветеринарным пациентом), имеющим рак (например, желудочно-кишечного происхождения), симптом рака, при котором по меньшей мере некоторые клетки экспрессируют GCC, или имеющим предрасположенность к раку, при котором по меньшей мере некоторые из клеток экспрессируют GCC. Термин «отличные от человека животные» по изобретению включает всех позвоночных, отличных от человека, например, отличных от человека млекопитающих и не являющихся млекопитающими животных, таких как отличные от человека приматы, овцы, собаки, коровы, куры, земноводные, рептилии и т. д. если не указано иное.

**[0142]**        *По существу*: используемый в данном документе термин «по существу» относится к качественному состоянию, демонстрирующему общую или почти полную степень или степень представляющей интерес характеристики или свойства. Специалист в области биологических наук поймет, что биологические и химические явления редко, если вообще когда-либо, доходят до завершения и/или переходят к завершению, достижению или избеганию абсолютного результата. Таким образом, термин «по существу» используется в данном документе для обозначения потенциального недостатка полноты, присущей многим биологическим и химическим явлениям.

**[0143]**        *Терапевтический агент*: в контексте данного документа термин «терапевтический агент» относится к агенту (например, антигенсвязывающему агенту), который имеет биологическую активность. Термин используется в данном документе для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической

макромолекулы или экстракта, полученного из биологических материалов. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент может представлять собой противораковый агент или химиотерапевтический агент. В контексте данного документа термины «противораковый агент» или «химиотерапевтический агент» относятся к агентам, которые обладают функциональным свойством ингибировать развитие или прогрессирование новообразования у человека, в частности, злокачественного (ракового) поражения, такого как карцинома, саркома, лимфома или лейкоз. Ингибирование метастазирования или ангиогенеза часто является свойством противораковых или химиотерапевтических агентов. Химиотерапевтический агент может быть цитотоксическим или цитостатическим агентом. Термин «цитостатический агент» относится к агенту, который ингибирует или подавляет клеточный рост и/или размножение клеток. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой генетически модифицированную клетку или антитело. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой CAR к GCC. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой клетку (например, популяцию клеток), экспрессирующую CAR к GCC, описанную в данном документе.

**[0144]** *Трансформация:* в контексте данного документа термин относится к любому процессу, с помощью которого экзогенная ДНК вводится в клетку-хозяина. Трансформация может происходить в естественных или искусственных условиях с использованием различных способов, хорошо известных в данной области техники. Трансформация может основываться на любом известном способе введения последовательностей чужеродных нуклеиновых кислот в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления конкретная методология трансформации выбирается на основе трансформируемой клетки-хозяина и может включать, помимо прочего, вирусную инфекцию, электропорацию, спаривание, трансфекцию, липофекцию. В некоторых вариантах осуществления «трансформированная» клетка стабильно трансформируется в том смысле, что встроенная ДНК способна к репликации либо как автономно реплицирующаяся плазмида, либо как часть хромосомы-хозяина. В некоторых вариантах осуществления трансформированная клетка транзичентно экспрессирует введенную нуклеиновую кислоту в течение ограниченных периодов времени.

**[0145]** *Лечить или лечение:* в контексте данного документа термин «лечить» или «лечение» определяется как введение антигенсвязывающего агента к GCC (например, антитела к GCC или его фрагмента, CAR к GCC, клеток, содержащих CAR к GCC и т.д.)

субъекту, например, пациенту, или введение, например, путем нанесения на выделенную ткань или клетку субъекта, которые возвращаются субъекту. Антигенсвязывающий агент к GСС можно вводить отдельно или в комбинации со вторым агентом. Лечение может заключаться в излечении, выздоровлении, облегчении, ослаблении, изменении, устранении, смягчении, временном облегчении, улучшении или влиянии на нарушение, симптомы нарушения или предрасположенность к нарушению, например, к раку. Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что лечение вызывает ингибирование, абляцию или уничтожение клетки *in vitro* или *in vivo* или иным образом снижает способность клетки, например, аберрантной клетки, опосредовать нарушение, т.е. нарушение, описанное в данном документе (например, рак).

**[0146]**        *Вариабельная область или домен*: в контексте данного документа термины «вариабельная область» или «вариабельный домен» антитела относятся к N-концевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи могут обозначаться как «VH» и «VL», соответственно. Эти домены в целом являются наиболее вариабельными частями антитела (по сравнению с другими антителами того же класса) и содержат сайты связывания антигена. Антитела, состоящие только из тяжелых цепей, имеют одну вариабельную область тяжелой цепи.

**[0147]**        *Вектор*: в контексте данного документа термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, причем дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к независимой репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную природу репликации и эписомные векторы млекопитающего). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина после внесения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе «векторами экспрессии».

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НЕКОТОРЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

**[0148]** Настоящее изобретение основано на открытии новых антигенсвязывающих агентов, которые специфически связываются с гуанилатциклазой С (GCC), и их применении в терапевтических способах. В настоящей заявке предложены однодоменные антитела к GCC (sdAb) и химерные антигенные рецепторы (CAR), включающие внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий один или более GCC-связывающих фрагментов (таких как sdAb к GCC).

**[0149]** Настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами, и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Кроме того, следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, если не указано иное, поскольку объем данного изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

### **Гуанилатциклаза С**

**[0150]** Гуанилатциклаза С (GCC) (также известная как STAR, рецептор ST, GUC2C и GUCY2C) представляет собой трансмембранный рецептор клеточной поверхности, который участвует в регуляции кишечного сока, электролитного гомеостаза и пролиферации клеток (Carrithers et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3018-3020 (2003); Mann et al., *Biochem Biophys Res Commun* 239: 463-466 (1997); Pitari et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2695-2699 (2003)); номер доступа GenBank NM.004963, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки). Эта функция опосредована связыванием гуанилина (Wiegand et al. *FEBS Lett.* 311:150-154 (1992)). GCC также является рецептором для термостабильного энтеротоксина (ST, например, имеющего аминокислотную последовательность NTFYCCELCCNPACAGCY, SEQ ID NO: 40), который представляет собой пептид, продуцируемый *E. coli*, а также другими инфекционными организмами (Rao, M. C. *Ciba Found. Symp.* 112:74-93 (1985); Knoop F. C. and Owens, M. J. *Pharmacol. Toxicol. Methods* 28:67-72 (1992)). Связывание ST с GCC активирует сигнальный каскад, который приводит к кишечным заболеваниям, например, диарее. Нуклеотидная последовательность GCC человека (номер доступа GenBank NM-004963). Аминокислотная последовательность GCC человека (номер доступа GenPept NP-004954):

MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSNCHNGSYEISVLMMGNSAF AEPLKNL  
EDAVNEGLEIVRGR LQNAGLNVTVNATFMYS DGLIHNSGDCRSSTCEGLDLLRK  
ISNAQRMGCVLIGP SCTYSTFQMYLDTELSYPMISAGSFGLSCDYKETLTRL MSP  
ARKL MYFLVNFWK TNDLPFKTYSWSTSYVYKNGTETEDCFWYLNAL EASVSYF  
SHELGFKV VLRQDKEFQDILMDHNRKSNVIIMCGGPEFLYK LKGDR AVAEDIVII



LVDLFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTLSPGNSLLNSSFSRNLSPTKRDFALAY  
LNGILLFGHMLKIFLENGENITTPKFAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDVDSTM  
VLLYTSVDTKKYKVLLTYDTHVNKTYPVDMSPFTWKNSKLPNDITGRGPQILM  
IAVFTLTGAVVLLLLVALLMLRKYRKDYELRQKKW SHIPPENIFPLETNETNHVS  
LKIDDDKRRDTIQRLRQCKYDKKRVLKDLKHNDGNFTEKQKIELNKLLQIDYY  
NLTKFYGTVKLDTMIFGVIEYCERGSREVLNDTISYDPDGTDFMDWEFKISVLYDI  
AKGMSYLHSSKTEVHGRLKSTNCVVDSRMVVKITDFGCNSILPPKKDLWTAPEH  
LRQANISQKGDVYSYGIIAQEILRKETFYTLSCRDRNEKIFRVENSNGMKPFRPD  
LFLETAEEKELEVYLLVKNCWEEDPEKRPDFKKIETTAKIFGLFHDQKNESYMD  
TLIRRLQLYSRNLEHLVEERTQLYKAERDRADRLNFMLLPRLVVKSLKEKGFVEP  
ELYEEVTIYFSDIVGFTTICKYSTPMEVVDMLNDIYKSFHDHVDHHDVYK VETIGD  
AYMVASGLPKRNGNRHAIDIAKMALEILSFMGTFELEHLPGLPIWIRIGVHSGPC  
AAGVVGKMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPLRIHVSGSTIAILKRTECQFLYEV  
RGETYLGKGRGNETTYWLTGMKDQKFNLPPTVENQQRLQAEFSDMIANSLQK  
RQAAGIRSQKPRRVASYKKGTTLEYLQLNTTDKESTYF (SEQ ID NO: 41)

**[0151]** Белок GCC имеет несколько общепринятых доменов, каждый из которых вносит свой вклад в функцию молекулы GCC. Функции GCC включают сигналинг для направления белка на клеточную поверхность, связывание внеклеточного лиганда, активность тирозинкиназы и каталитическую активность гуанилатциклазы. В нормальных тканях человека GCC экспрессируется в клетках слизистой оболочки, например, апикальных мембран щеточной каймы, выстилающих тонкую кишку, толстую кишку и прямую кишку (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996)). Экспрессия GCC сохраняется при неопластической трансформации эпителиальных клеток кишечника с экспрессией во всех первичных и метастатических колоректальных опухолях (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Carrithers et al., *Gastroenterology* 107: 1653-1661 (1994)). Неопластические клетки желудка, пищевода и желудочно-пищеводного перехода также экспрессируют GCC (см., например, патент США № 6767704; Debruyne et al. *Gastroenterology* 130:1191-1206 (2006)). Тканеспецифическая экспрессия и ассоциация с раком, например, желудочно-кишечного происхождения (например, раком толстой кишки, раком желудка или раком пищевода) могут быть использованы для применения GCC в качестве диагностического маркера этого заболевания (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005)).

**[0152]** В качестве белка клеточной поверхности GСС также может служить терапевтической мишенью для рецептор-связывающих белков, таких как антитела или лиганды. В нормальной ткани кишечника GСС экспрессируется на апикальной стороне плотных контактов эпителиальных клеток, которые образуют непроницаемый барьер между просветной средой и сосудистым компартментом (Almenoff et al., *Mol Microbiol* 8: 865-873); Guarino et al., *Dig Dis Sci* 32: 1017-1026 (1987)). Таким образом, системное внутривенное введение терапевтического средства на основе GСС-связывающего белка будет оказывать минимальное влияние на кишечные рецепторы GСС, имея доступ к неопластическим клеткам желудочно-кишечной системы, включая инвазивные или метастатические раковые клетки толстой кишки, внекишечные или метастатические опухоли толстой кишки, опухоли пищевода или опухоли желудка, аденокарциномы желудочно-пищеводного перехода. Кроме того, GСС интернализуется посредством опосредованного рецептором эндоцитоза при связывании лиганда (Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Urbanski et al., *Biochem Biophys Acta* 1245: 29-36 (1995)).

**[0153]** Поликлональные антитела, образованные против внеклеточного домена GСС, (Nandi et al. *Protein Expr. Purif.* 8:151-159 (1996)) были способны ингибировать связывание пептида ST с GСС человека и крысы и ингибировать ST-опосредованную продукцию цГМФ с помощью GСС человека.

**[0154]** GСС был охарактеризован как белок, участвующий в развитии рака, включая рак толстой кишки. См. также Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Carrithers et al., *Gastroenterology* 107: 1653-1661 (1994); Urbanski et al., *Biochem Biophys Acta* 1245: 29-36 (1995).

**[0155]** Описанные в данном документе терапевтические средства на основе антигенсвязывающих молекул, направленных на GСС, могут быть использованы для ингибирования экспрессирующих GСС раковых клеток. Антигенсвязывающие молекулы к GСС по изобретению могут связывать GСС человека. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула к GСС по изобретению может ингибировать связывание лиганда, например, гуанилина или термостабильного энтеротоксина, с GСС.

#### **Антигенсвязывающие молекулы**

**[0156]** Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим молекулам к GСС. В некоторых вариантах осуществления молекулы к GСС по настоящему изобретению вызывают клеточную реакцию при связывании с GСС на экспрессирующей GСС клетке, с

которой они связываются. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GСС, по изобретению может блокировать связывание лиганда с GСС.

**[0157]** Структурная единица природного антитела млекопитающих представлена тетрамером. Каждый тетрамер состоит из двух пар полипептидных цепей, каждая из которых имеет одну «легкую» (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа). N-концевая часть каждой цепи включает вариабельную область из около 100-110 или более аминокислот, которая в первую очередь отвечает за распознавание антигена. С-концевая часть каждой цепи определяет константную область, которая в первую очередь отвечает за эффекторную функцию. Легкие цепи человека можно классифицировать как легкие цепи каппа и лямбда. Тяжелые цепи можно классифицировать как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон, а изотип антитела определить как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. В легкой и тяжелой цепях вариабельная и константная области соединены областью «J», состоящей примерно из 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает область «D», состоящая еще примерно из 10 аминокислот. В целом смотрите *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Вариабельные области каждой пары легкая/тяжелая цепь образуют связывающий сайт антитела. Предпочтительными изотипами для молекул антител к GСС являются иммуноглобулины IgG, которые можно разделить на четыре подкласса, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, имеющие разные тяжелые цепи гамма. Большинство терапевтических антител представляют собой человеческие, химерные или гуманизированные антитела типа IgG1. В конкретном варианте молекула антитела к GСС имеет изотип IgG1.

**[0158]** Вариабельные области каждой пары тяжелой и легкой цепей образуют сайт связывания антигена. Таким образом, интактное антитело IgG имеет два одинаковых сайта связывания. Однако бифункциональные или биспецифические антитела представляют собой искусственные гибридные конструкции, которые имеют две разные пары тяжелая цепь / легкая цепь, что приводит к двум различным сайтам связывания.

**[0159]** Все цепи имеют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями, также называемыми областями, определяющими комплементарность, или CDR. CDR из двух цепей каждой пары выровнены по каркасным областям, что позволяет связываться со специфическим эпитопом. От N-конца к С-концу как легкие, так и тяжелые цепи включают домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Назначение аминокислот для каждого домена соответствует определениям Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), или

Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al. *Nature* 342:878-883 (1989). В контексте данного документа термины CDR обозначаются согласно Kabat для каждой из тяжелых (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и легких (LCDR1, LCDR2, LCDR3) цепей.

**[0160]** Молекула антитела к GCC может содержать все или подмножество петель связывания антигена CDR или тяжелой цепи описанных в данном документе антител. Аминокислотные последовательности антигенсвязывающих агентов к GCC, описанные в данном документе, включая переменные области и CDR, можно найти в таблицах 1-3.

**[0161]** Таким образом, в одном варианте осуществления молекула антитела включает одно или оба из:

**[0162]** (а) одной, двух, трех или другого числа петель связывания антигена CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3) человеческого антитела, такого как антитело, полученное из гибридомы человека, или мышинное антитело (например, легкая цепь антитела к GCC, описанного в US 20180355062A1, который полностью включен посредством ссылки). В вариантах осуществления CDR может содержать аминокислотную последовательность одного или более или всех LCDR1-3, как указано ниже: LCDR1, или модифицированный LCDR1, в которой консервативно заменены от одной до семи аминокислот) LCDR2, или модифицированный LCDR2, в которой одна или две аминокислоты консервативно заменены); или LCDR3, или модифицированный LCDR3, при этом одна или две аминокислоты консервативно заменены; и

**[0163]** (b) одну, две, три или другое число петель связывания антигена CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3), как описано в данном документе. В вариантах осуществления CDR может содержать аминокислотную последовательность одной или более или всех HCDR1-3, как указано ниже: HCDR1 или модифицированная HCDR1, в которой одна или две аминокислоты консервативно заменены; HCDR2 или модифицированная HCDR2, в которой консервативно заменены от одной до четырех аминокислот; или HCDR3, или модифицированная HCDR3, в которой одна или две аминокислоты консервативно заменены.

**[0164]** В некоторых вариантах осуществления молекула антитела к GCC по изобретению может вызывать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) в отношении клетки, экспрессирующей GCC, например, опухолевой клетки. Антитела с изотипами IgG1 и IgG3 полезны для проявления эффекторной функции в антителозависимой цитотоксичности благодаря их способности связываться с Fc-рецептором. Антитела с изотипами IgG2 и IgG4 полезны для минимизации ответа ADCC

из-за их низкой способности связывать Fc-рецептор. В родственных вариантах осуществления замены в области Fc или изменения в профиле гликозилирования антитела, например, путем выращивания в модифицированной линии эукариотических клеток, могут быть сделаны для повышения способности Fc-рецепторов распознавать, связывать и/или опосредовать цитотоксичность клетки, с которыми связываются антитела к GCC (см., например, патенты США №№ 7317091, 5624821 и публикации, включая WO 00/42072, Shields, et al. *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001), Lazar et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:4005-4010 (2006), Satoh et al. *Expert Opin Biol. Ther.* 6:1161-1173 (2006)). В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, антитело человеческого происхождения, человеческое антитело) могут включать аминокислотные замены или замещения, которые изменяют или адаптируют функцию (например, эффекторную функцию). Например, константная область человеческого происхождения (например, константная область  $\gamma 1$ , константная область  $\gamma 2$ ) может быть сконструирована для уменьшения активации комплемента и/или связывания Fc-рецептора. (См., например, патент США № 5648260 (Winter et al.), патент США № 5624821 (Winter et al.) и патент США № 5834597 (Tso et al.), все положения которых включены в настоящий документ посредством ссылки). Предпочтительно аминокислотная последовательность константной области человеческого происхождения, которая содержит такие аминокислотные замены или замещения, имеет по меньшей мере около 95% идентичности по всей длине с аминокислотной последовательностью неизменной константной области человеческого происхождения, более предпочтительно по меньшей мере около 99% идентичности по всей длине с аминокислотной последовательностью неизменной константной области человеческого происхождения. Дополнительные антигенсвязывающие молекулы к GCC, дополнительно описаны в патенте США № 8785600 (Nam et al.), все положения которого включены в данный документ посредством ссылки.

**[0165]** В еще одном варианте эффекторные функции также могут быть изменены путем модулирования профиля гликозилирования антитела. Под изменением подразумевается делеция одного или более углеводных фрагментов, обнаруженных в антителе, и/или добавление одного или более сайтов гликозилирования, которые не представлены в антителе. Например, антитела с повышенной активностью АЗКЦ со зрелой углеводной структурой, в которой отсутствует фукоза, присоединенная к области Fc антитела, описаны в публикации заявки на патент США № 2003/0157108 (Presta). См. также публикацию заявки на патент США № 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Glycofi также разработала линии дрожжей, способные продуцировать специфические гликоформы антител.

**[0166]** Дополнительно или альтернативно можно получить антитело с измененным типом гликозилирования, такое как гипофукозилированное антитело, имеющее пониженные количества фукозильных остатков, или антитело, имеющее повышенное количество структур GlcNac в точках ветвления. Было продемонстрировано, что такие измененные модели гликозилирования повышают способность антител к АЗКЦ. Такие углеводные модификации могут быть выполнены, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с измененным механизмом гликозилирования были описаны в данной области техники и могут быть использованы в качестве клеток-хозяев, в которых сконструированы так, чтобы они экспрессировали рекомбинантные антитела по изобретению, чтобы тем самым продуцировать антитело с измененным гликозилированием. Например, В EP 1176195 от Hang et al. описана линия клеток с функционально нарушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, так что антитела, экспрессируемые в такой клеточной линии, проявляют гипофукозилирование. В публикации PCT WO 03/035835 от Presta описан вариант клеточной линии CHO, Lec13, с пониженной способностью присоединять фукозу к Asp (297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине (см. также Shields, R. L. et al., 2002 *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). В публикации PCT WO 99/54342 от Umana et al. описаны клеточные линии, сконструированные для экспрессии модифицирующих гликопротеин гликозилтрансфераз (например, бета(1,4) -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), так что антитела, экспрессируемые в сконструированных линиях клеток, демонстрируют повышенное количество структуры GlcNac в точках ветвления, что приводит к увеличению активности АЗКЦ антитела (см. также Umana et al., 1999 *Nat. Biotech.* 17:176-180).

**[0167]** Гуманизированные антитела также могут быть получены с использованием подхода с трансплантацией CDR. Методы получения таких гуманизированных антител известны в данной области техники. Как правило, гуманизированные антитела получают путем получения последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антитела, которое связывается с GCC, идентификации определяющей комплементарность области или «CDR» в последовательностях вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи и трансплантации последовательностей нуклеиновой кислоты CDR в последовательности нуклеиновой кислоты человеческой каркасной области. (См., например, патенты США №№ 4816567 и 5225539). Можно определить расположение CDR и остатков каркасной области (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, и Chothia, C. et al. *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)).

**[0168]** Молекулы антител к GCC, описанные в данном документе, имеют аминокислотные последовательности CDR и последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие CDR, перечисленные в таблицах 5 и 6. В некоторых вариантах осуществления последовательности из таблиц 5 и 6 могут быть включены в молекулы, которые распознают GCC, для использования в терапевтических или диагностических способах, описанных в данном документе. Выбранная человеческая каркасная область подходит для введения *in vivo*, что означает, что она не проявляет иммуногенности. Например, такое определение может быть сделано на основании предшествующего опыта использования таких антител *in vivo* и исследований сходства аминокислот. Подходящая каркасная область может быть выбрана из антитела человеческого происхождения, имеющего по меньшей мере около 65% идентичности аминокислотных последовательностей и предпочтительно по меньшей мере около 70%, 80%, 90% или 95% идентичности аминокислотных последовательностей по всей длине каркасной области в аминокислотной последовательности эквивалентной части (например, каркасной области) донорного антитела, например, молекулы антитела к GCC (например, 3G1). Идентичность аминокислотной последовательности можно определить с помощью подходящего алгоритма выравнивания аминокислотных последовательностей, такого как CLUSTAL W, с параметрами по умолчанию. (Thompson J. D. et al., *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680 (1994).)

**[0169]** После идентификации CDR и FR клонированного антитела, которые должны быть гуманизированы, идентифицируют аминокислотные последовательности, кодирующие CDR, и соответствующие последовательности нуклеиновых кислот трансплантируют к выбранным FR человека. Это можно сделать с использованием известных праймеров и линкеров, выбор которых известен в данной области техники. Все CDR конкретного антитела человека могут быть заменены по меньшей мере частью CDR нечеловеческого происхождения или только некоторые из CDR могут быть заменены CDR нечеловеческого происхождения. Необходимо только заменить количество CDR, необходимых для связывания гуманизированного антитела с предварительно заданным антигеном. После того, как CDR привиты к выбранным FR человека, полученные «гуманизированные» последовательности переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи экспрессируются с получением гуманизированного Fv или гуманизированного антитела, которое связывается с GCC. Предпочтительно антитело

с трансплантированным CDR (например, гуманизованное) связывает белок GCC с аффинностью, сходной, по существу такой же или лучшей, чем у донорного антитела. Как правило, гуманизованные переменные последовательности тяжелой и легкой цепи экспрессируются в виде слитого белка с последовательностями константного домена человека, так что получают интактное антитело, которое связывается с GCC. Однако можно получить гуманизованное антитело Fv, не содержащее константных последовательностей.

**[0170]** Также в объем изобретения входят гуманизованные антитела, в которых заменены, удалены или добавлены определенные аминокислоты. В частности, гуманизованные антитела могут иметь аминокислотные замены в каркасной области, например, для улучшения связывания с антигеном. Например, выбранное небольшое количество акцепторных каркасных остатков гуманизованной цепи иммуноглобулина может быть заменено соответствующими донорными аминокислотами. Места замен включают аминокислотные остатки, соседние с CDR или которые способны взаимодействовать с CDR (см., например, патенты США № 5585089 или 5859205). Акцепторная каркасная область может представлять собой каркасную последовательность зрелого человеческого антитела или консенсусную последовательность. В контексте данного документа термин «консенсусная последовательность» относится к последовательности, встречающейся наиболее часто, или полученной из наиболее распространенных остатков в каждом положении последовательности в области среди родственных членов семейства. Доступен ряд консенсусных последовательностей антител человека, включая консенсусные последовательности для различных подгрупп человеческих переменных областей (см., Kabat, E. A., et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)). База данных Kabat и ее приложения находятся в свободном доступе в сети интернет, например, через IgBLAST в Национальном центре биотехнологической информации, Бетесда, штат Мэриленд (см. также Johnson, G. and Wu, T. T., *Nucleic Acids Research* 29:205-206 (2001)).

**[0171]** В определенных вариантах осуществления молекула антитела к GCC представляет собой человеческое антитело IgG1 к GCC. Поскольку такие антитела обладают желаемым связыванием с молекулой GCC, для любого из таких антител можно легко изменить изотип с целью получения, например, человеческого изотипа IgG4, сохраняя при этом ту же самую переменную область (которая в определенной степени определяет специфичность и аффинность антитела). Соответственно, поскольку создаются



кандидатные антитела, отвечающие желаемым «структурным» характеристикам, как обсуждалось выше, они, как правило, могут быть обеспечены по меньшей мере некоторыми дополнительными «функциональными» свойствами, которые желательны, путем переключения изотипа.

**[0172]** В некоторых аспектах часть композиции CAR по настоящему изобретению, которая содержит фрагмент антитела, является гуманизированной с сохранением высокой аффинности к антигену-мишени и других предпочтительных биологических свойств. В соответствии с одним аспектом изобретения гуманизированные антитела и фрагменты антител 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 последовательностей иммуноглобулинов-кандидатов. Изучение таких отображений позволяет провести анализ вероятной роли остатков в функционировании потенциально пригодных последовательностей иммуноглобулина, например, анализ остатков, которые влияют на способность потенциально пригодного иммуноглобулина связываться с антигеном-мишенью.

**[0173]** Следовательно, остатки FR могут выбираться и объединяться из реципиентных и импортированных последовательностей, что позволяет достичь требуемой характеристики антитела или фрагмента антитела, например, повышенной аффинности к антигену-мишени. В целом, остатки CDR непосредственно и в существенной степени вовлечены в процесс связывания с антигеном.

**[0174]** Гуманизированное антитело или фрагмент антитела может сохранять такую же антигенную специфичность, как и исходное антитело, например, в настоящем изобретении способность связывать человеческий GCC. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело или фрагмент антитела может иметь улучшенную аффинность и/или специфичность связывания с человеческим GCC.

**[0175]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GCC содержит одну или более последовательностей CDR, указанных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GCC содержит переменную область тяжелой цепи с CDR 1, которая указана в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GCC содержит переменную область тяжелой цепи с CDR 2, которая указана в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления

антигенсвязывающий агент к GCC содержит вариабельную область тяжелой цепи с CDR 3, которая указана в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GCC содержит вариабельную область тяжелой цепи с CDR1, CDR2 и CDR3, которые указаны в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GCC содержит одну или более последовательностей CDR, которые указаны в таблице 1, где указанная CDR содержит 1, 2 или 3 аминокислотные замены. В одном варианте осуществления указанная замена не оказывает неблагоприятного воздействия на связывание связывающего агента с его мишенью.

*Таблица 1. Иллюстративные последовательности CDR анти-GCC*

	<b>HCDR 1</b>	<b>HCDR 2</b>	<b>HCDR 3</b>
V1	HYYWS (SEQ ID NO: 8)	RIYPSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 11)	DRSTGWSEWNSDL (SEQ ID NO: 16)
V1-01	HYYWS (SEQ ID NO: 8)	RIYPSGSTSYNPSLKS (SEQ ID NO: 11)	DRSTGWSEWNSDL (SEQ ID NO: 16)
V5	RYWMS (SEQ ID NO: 9)	KIRHDGGEKYYVDSVKG (SEQ ID NO: 12)	DYTRDV (SEQ ID NO: 17)
V36	RYWMT (SEQ ID NO: 10)	KIKYDGSEKYYADSVKG (SEQ ID NO: 13)	DYNKDY (SEQ ID NO: 18)
V48	RYWMT (SEQ ID NO: 10)	KIRHDGGEKYYPDSVKG (SEQ ID NO: 14)	DYNKDL (SEQ ID NO: 19)
V51	RYWMT (SEQ ID NO: 10)	KIRHDGGEKYYADSVKG (SEQ ID NO: 15)	DYNKDY (SEQ ID NO: 18)

**[0176]** Антитела к GCC, которые не являются интактными антителами, также применимы в данном изобретении. Такие антитела могут быть получены из любых антител, описанных выше. Применимые молекулы антител этого типа включают (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')<sub>2</sub>,

двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989)), который состоит из домена VH; (vi) однодоменное функциональное антитело, состоящее только из тяжелых цепей, которое состоит из домена VHH (известного как наноантитело), см., например, Cortez-Retamozo, et al., *Cancer Res.* 64: 2853-2857 (2004), и цитируемые в нем ссылки; и (vii) выделенную CDR, например, одну или более выделенных CDR вместе с каркасной областью, достаточной для получения антигенсвязывающего фрагмента. Кроме того, несмотря на то, что два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть объединены с помощью рекомбинантных методов с помощью синтетического линкера, который позволяет им приобрести форму одиночной белковой цепи, в которой участки VL и VH спариваются для образования моновалентных молекул (известны как одноцепочечные Fv (scFv); см., например, Bird et al. *Science* 242:423-426 (1988); и Huston et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)). Подразумевается, что такие одноцепочечные антитела также охватываются термином «антигенсвязывающий фрагмент» антитела. Эти фрагменты антител получают с помощью традиционных методов, известных специалистам в данной области техники, и проводят скрининг фрагментов в отношении функциональности таким же образом, что и для интактных антител. Фрагменты антител, такие как Fv, F(ab')<sub>2</sub> и Fab, могут быть получены путем расщепления интактного белка, например, путем протеазного или химического расщепления.

### ***Однодоменные антитела***

[0177] Однодоменные антитела (sdAb) отличаются от обычных 4-цепочечных антител наличием одиночного вариабельного домена мономерного антитела. Например, верблюдовые и акулы производят sdAb, называемые антителами, состоящими только из тяжелых цепей, (HcAb), в которых, естественно, отсутствуют легкие цепи. Антигенсвязывающий фрагмент в каждом плече антитела, состоящих только из тяжелых цепей, верблюдовых имеет один вариабельный домен тяжелой цепи (VHH), который может иметь высокую аффинность к антигену без необходимости вовлечения легкой цепи. VHH верблюдовых известен как наименьший функциональный антигенсвязывающий фрагмент с молекулярной массой около 15 кДа. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие агенты представляют собой антитела на основе человеческого одиночного вариабельного домена тяжелой цепи (VH). Такие связывающие молекулы

также называются Humabody® и могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо. Humabody® является зарегистрированным товарным знаком Crescendo Biologics Ltd.

**[0178]** В одном аспекте настоящей заявки предложены выделенные однодоменные антитела (обозначаемые в данном документе как «sdAb к GCC»), которые специфически связываются с GCC, такими как GCC человека. В некоторых вариантах осуществления sdAb к GCC модулирует активность GCC. В некоторых вариантах осуществления sdAb к GCC представляет собой антагонистическое антитело. Кроме того, предусмотрены антигенсвязывающие фрагменты, полученные из любого из описанных в данном документе sdAb к GCC, и антигенсвязывающие белки, содержащие любое из sdAb к GCC, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления sdAb к GCC содержат одну, две и/или три последовательности CDR, указанные в таблице 1. Иллюстративные sdAb к GCC перечислены в таблицах 2 и 3. В некоторых вариантах осуществления sdAb к GCC содержит переменную область тяжелой цепи, указанную в таблице 2 или таблице 3.

**[0179]** В некоторых вариантах осуществления некоторые или все последовательности CDR тяжелой цепи можно использовать в другом антигенсвязывающем агенте, например, в гуманизированной или химерной молекуле антитела с трансплантированным CDR. Варианты осуществления включают молекулу антитела, которая содержит достаточное количество CDR, например, все три CDR из одной из указанных выше переменных областей тяжелой цепи, чтобы обеспечить связывание с GCC на поверхности клетки.

**[0180]** В некоторых вариантах осуществления CDR, например, все HCDR, встроены в человеческие или полученные из человеческих каркасные области. Примеры человеческих каркасных областей включают каркасные последовательности зародышевой линии человека, последовательности зародышевой линии человека с созревшей аффинностью (либо *in vivo* или *in vitro*), или синтетические последовательности человека, например, консенсусные последовательности. В одном варианте осуществления каркасная область тяжелой цепи представляет собой каркасную область IgG1 или IgG2.

**[0181]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие агенты к GCC по настоящему изобретению содержат аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи, указанную в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие агенты к GCC, представляют собой однодоменные антитела, содержащие только тяжелые цепи, (например, антигенсвязывающие агенты, не содержащие легкую цепь иммуноглобулина).

Таблица 2. Иллюстративные аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи (VH)

Описание	Аминокислотная последовательность VH
V1	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPA GKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKS RVAMSV DTPKNQFSLNL SSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1)
V1-01	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPA GKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKS RVAMSV DTPKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 20)
V5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQ APGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSS (SEQ ID NO: 21)
V36	EVQLVESGGGLAQPGGSLRLS CAASGFTFSRYWMTWVRQ APGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDNKNSL YLQMDSLRAEDTAVYYCTRDY NKDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 26)
V48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWMTWVRQ APGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNKNS LYLQMDNLRAEDTAMYYCTRDY NKDLWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 27)
V51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSRYWMTWVRQ APGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDY NKDYWGQGT LVTVSS  (SEQ ID NO: 28)

**[0182]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие агенты к GCC по настоящему изобретению содержат аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью VH, представленной в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GCC на

основе VH (например, однодоменное антитело) содержит лидерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GCC на основе VH содержит лидерную последовательность, включающую MKHLWFFLLVAAPRWVLS (SEQ ID NO: 6), MELGLSWVFLVAILEGVQC (SEQ ID NO: 7) или MEFGLSWVFLVAIKGVQC (SEQ ID NO: 42). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GCC на основе VH содержит лидерную последовательность, включающую MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 45)

**[0183]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие агенты к GCC по настоящему изобретению содержат аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью VH, указанной в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие агенты к GCC по настоящему изобретению содержат аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая идентична последовательности VH, указанной в таблице 3.

**[0184]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GCC на основе VH (например, однодоменное антитело) содержит лидерную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с таковой в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GCC на основе VH (например, однодоменное антитело) содержит лидерную последовательность, указанную в таблице 3.

*Таблица 3. Иллюстративные аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH)*

	Лидерная последовательность	Последовательность VH
V1	MKHLWFFLL LVAAPRWVLS (SEQ ID NO: 6)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQP AGKGLEWIGRIYPSGSTSYPNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSL NLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLV TVSS (SEQ ID NO: 1)
V1-01	MKHLWFFLL LVAAPRWVLS (SEQ ID NO: 6)	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQP AGKGLEWIGRIYPSGSTSYPNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLV TVSS (SEQ ID NO: 20)

V5	MELGLSWVF LVAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMSWVR QAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDN NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTV SS (SEQ ID NO: 21)
V8	MELGLSWVF LVAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVR QAPGKGLEWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN NSVYLQMNSLRAEDTGVYYCATDFTRDVWGQGT TVTS S (SEQ ID NO: 22)
V9	MELGLSWVF LVAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVR QAPGRGLEWVAKIRYDGGEKYYVDSVKGRFTISRDN NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVWGQGT TVTS S (SEQ ID NO: 23)
V30	MELGLSWVF LVAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFGRYWMSWVR QAPGKGREWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVWGQGT TVTS S (SEQ ID NO: 24)
V31	MEFGLSWVF LVAIIKGVQC (SEQ ID NO: 42)	QVQLVESGGGVVVRP GGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVR QAPGKGREWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDN NSLYLQMNSLRADDTAVYYCATDFTRDVWGQGT TVTS S (SEQ ID NO: 25)
V36	MELGLSWVF LVAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	EVQLVESGGGLAQP GGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVR QAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDN NSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTR DYNKDYWGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO: 26)
V48	MELGLSWVF LVAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLTCAASGFTFSRYWMTWVR QAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPD SVKGRFTVSRDN AKNSLYLQMDNLRAEDTAMYYCTR DYNKDLWGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO: 27)
V51	MELGLSWVF LVAILEGVQC (SEQ ID NO: 7)	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVR QAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYAD SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR DYNKDYWGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO: 28)

**[0185]** Фрагменты антител для терапевтического или диагностического применения *in vivo* могут выиграть от модификаций, которые повышают их время полужизни в сыворотке. Подходящие органические фрагменты, предназначенные для повышения времени полужизни антитела в сыворотке *in vivo*, могут включать один, два или более линейных или разветвленных фрагмента, выбранных из гидрофильной полимерной группы (например, линейный или разветвленный полимер (например, полиалкангликоль, такой как полиэтиленгликоль, монометокси-полиэтиленгликоль и т.п.), углевод (например, декстран, целлюлозу, полисахарид и т.п.), полимер гидрофильной аминокислоты (например, полилизин, полиаспарат и т.п.), полиалкан оксид и поливинилпирролидон), группу, содержащую жирную кислоту, (например, монокарбоновую кислоту или дикарбоновую кислоту), группу, содержащую сложный эфир жирной кислоты, липидную группу (например, диацилглицериновую группу, сфинголипидную группу (например, керамидил)) или фосфолипидную группу (например, фосфатидилэтаноламиновою группу). Предпочтительно органический фрагмент связывается с заранее определенным участком, где органический фрагмент не ухудшает функцию (например, снижает аффинность связывания антигена) полученного иммуноконъюгата по сравнению с фрагментом в виде неконъюгированного антитела. Органический фрагмент может иметь молекулярную массу от около 500 Да до около 50000 Да, предпочтительно около 2000, 5000, 10000 или 20000 Да. Примеры и способы модификации полипептидов, например, антител, органическими фрагментами можно найти, например, в патенте США №№ 4179337 и 5612460, публикации РСТ № WO 95/06058 и WO 00/26256 и публикации заявки на патент США № 20030026805.

### *Химерные антигенные рецепторы*

**[0186]** Химерные антигенные рецепторы (CAR) представляют собой гибридные молекулы, состоящие из трех основных единиц: (1) внеклеточный антигенсвязывающий мотив, (2) связывающие/трансмембранные мотивы и (3) внутриклеточные сигнальные мотивы Т-клеток (Long A H, Haso W M, Orentas R J. Lessons learned from a highly-active CD22-specific chimeric antigen receptor. *Oncimmunology*. 2013; 2 (4):e23621). В различных вариантах осуществления CAR, специфичных для GCS, раскрытых в данном документе, общая схема представлена на Фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления CAR к GCS содержат от N-конца к С-концу сигнальный или лидерный пептид, антигенсвязывающий домен, трансмембранный и/или шарнирный домен, костимулирующий домен и внутриклеточный домен.



**[0187]** Настоящее изобретение относится к CAR (например, полипептиду CAR), который содержит связывающий домен к GCC (например, домен, связывающий GCC, как описано в данном документе), трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, и где указанный связывающий домен к GCC содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (CDR1 HC), определяющую комплементарность область тяжелой цепи 2 (HC CDR2) и определяющую комплементарность область тяжелой цепи 3 (HC CDR3) любых аминокислотных последовательностей связывающего домена тяжелой цепи к GCC, перечисленных в таблице 1 или 8. В некоторых вариантах осуществления CAR к GCC содержат от N-конца к C-концу сигнальный или лидерный пептид, vH к GCC, трансмембранный и шарнирный домены CD28, костимулирующий домен CD28 и внутриклеточный домен CD3-дзета.

**[0188]** Антигенсвязывающий домен может представлять собой любой белок, который связывается с антигеном, включая, помимо прочего, моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело и их функциональные фрагменты, включая, помимо прочего, однодоменное антитело, такое как переменный домен тяжелой цепи (VH), переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен (VHH) наноантитела верблюжьего происхождения, а также с альтернативным каркасом, известным в данной области техники, который функционирует в качестве антигенсвязывающего домена, таким как домен рекомбинантного фибронектина, и т.п. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен

**[0189]** Антигенсвязывающий мотив CAR, как правило, создается по образцу одноцепочечного переменного фрагмента (ScFv), минимального связывающего домена молекулы иммуноглобулина (Ig) или однодоменного антитела (например, WO2018/028647A1). Также были разработаны альтернативные антигенсвязывающие мотивы, такие как лиганды рецепторов (например, IL-13 был сконструирован для связывания экспрессируемого опухолью рецептора IL-13), интактные иммунные рецепторы, пептиды из библиотеки и эффекторные молекулы врожденной иммунной системы (такие как NKG2D). Предстоит большая работа по определению наиболее активной популяции Т-клеток для трансдукции векторами CAR, определению оптимальных методов культивирования и экспансии, а также определению молекулярных деталей самой структуры белка CAR.

**[0190]** Связывающие мотивы CAR могут представлять собой относительно стабильный структурный домен, такой как константный домен IgG, или могут быть

разработаны в качестве удлиненного гибкого линкера. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен к GCC, (например, полипептид, содержащий последовательность, указанную в таблице 1 или таблице 7) присоединен к трансмембранному домену через линкер, например, линкер, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления CAR к GCC включает линкер (Gly4-Ser)<sub>n</sub>, где n равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6 (SEQ ID NO: 72). В некоторых вариантах осуществления линкер включает аминокислотную последовательность RAAA (SEQ ID NO: 53).

**[0191]** Структурные мотивы, такие как мотивы, полученные из константных доменов IgG, могут быть использованы для удлинения связывающего домена ScFv в сторону от поверхности плазматической мембраны Т-клеток. Это может быть важно для некоторых опухолевых мишеней, где связывающий домен особенно близок к мембране поверхности опухолевых клеток (например, для дисиаialogанглиозида GD2; Orentas et al., неопубликованные наблюдения). На сегодняшний день сигнальные мотивы, используемые в CAR, всегда включают цепь CD3- $\zeta$ , поскольку этот основной мотив является ключевым сигналом для активации Т-клеток. Первые зарегистрированные CAR второго поколения содержали сигнальные домены CD28 и трансмембранную последовательность CD28. Этот мотив также использовали в CAR третьего поколения, содержащих сигнальные мотивы CD137 (4-1BB) (Zhao Y et al. *J Immunol.* 2009; 183 (9): 5563-74). С появлением новых технологий активация Т-клеток частицами, связанными с антителом к CD3 и к CD28, и наличие канонического «сигнала 2» от CD28 больше не требовалось, чтобы он был закодирован самим CAR. Было обнаружено, что с помощью активации частиц векторы третьего поколения не превосходят векторы второго поколения в анализах *in vitro*, и они не давали явных преимуществ по сравнению с векторами второго поколения в мышинных моделях лейкоза (Haso W, Lee D W, Shah N N, Stetler-Stevenson M, Yuan C M, Pastan I H, Dimitrov D S, Morgan R A, FitzGerald D J, Barrett D M, Wayne A S, Mackall C L, Orentas R J. *Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B cell precursor acute lymphoblastic leukemia, Blood.* 2013; 121 (7):1165-74; Kochenderfer J N et al. *Blood.* 2012; 119 (12):2709-20). Это подтверждается клиническим успехом CD19-специфических CAR, которые имеют сигнальный формат CD28/CD3- $\zeta$  (Lee D W et al. *American Society of Hematology Annual Meeting. New Orleans, La.; Dec. 7-10, 2013*) и CD137/CD3- $\zeta$  второго поколения (Porter D L et al. *N Engl J Med.* 2011; 365 (8): 725-33). В дополнение к CD137, другие члены суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, такие как OX40, также способны обеспечивать важные устойчивые сигналы в трансдуцированных CAR Т-клетках (Yvon E et al. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(18):5852-60). Не менее важными являются условия культивирования, в которых культивировали популяции CAR Т-клеток.

**[0192]** Иммуноterapia на основе Т-клеток стала новым рубежом в синтетической биологии; предполагается, что многочисленные промоторы и генные продукты направляют эти высокоэффективные клетки в микроокружение опухоли, причем Т-клетки могут как уклоняться от негативных регуляторных сигналов, так и опосредовать эффективное уничтожение опухоли. Уничтожение нежелательных Т-клеток посредством индуцированной лекарственным средством димеризации индуцибельных конструкций каспазы 9 с AP1903 демонстрирует один из способов фармакологического иницирования мощного переключателя, способного контролировать популяции Т-клеток (Di Stasi A et al. N Engl J Med. 2011; 365(18):1673-83). Таким образом, хотя кажется, что CAR могут иницировать активацию Т-клеток аналогично эндогенному рецептору Т-клеток, основным препятствием для клинического применения этой технологии на сегодняшний день является ограниченная экспансия CAR+ Т-клеток *in vivo*, быстрое исчезновение клеток после инфузии и неутешительная клиническая активность. Соответственно, в данной области техники существует острая и давно ощущаемая потребность в открытии новых композиций и способов лечения рака с использованием подхода, который может проявлять специфический и эффективный противоопухолевый эффект без вышеупомянутых недостатков (т.е. высокой токсичности, недостаточной эффективности).

**[0193]** Настоящее изобретение направлено на удовлетворение этих потребностей путем предоставления композиций CAR и терапевтических способов, которые можно применять для лечения рака и других заболеваний и/или патологических состояний. В частности, настоящее изобретение, раскрытое и описанное в данном документе, обеспечивает CAR, которые можно использовать для лечения заболеваний, нарушений или патологических состояний, связанных с нарушением регуляции экспрессии GCS, и эти CAR содержат домены, связывающие антиген GCS, которые проявляют высокую поверхностную экспрессию на трансдуцированных Т-клетках, проявляют высокую степень цитолиза и экспансии и персистенции трансдуцированных Т-клеток *in vivo*.

**[0194]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие агенты к GCS представляют собой химерные антигенные рецепторы (CAR). Характеристики CAR включают в себя их способность перенаправлять Т-клеточную специфичность и реактивность к выбранной мишени не рестриктированным по MHC образом, и использование антигенсвязывающих свойств моноклональных антител. Не рестриктированное по MHC распознавание антигена дает Т-клеткам, экспрессирующим CAR, способность распознавать антиген независимо от процессинга антигена, таким образом обходя основной механизм ускользания опухоли от иммунологического ответа.

Более того, при экспрессии в Т-клетках CAR преимущественно не димеризуются с эндогенными альфа- и бета-цепями Т-клеточного рецептора (TCR).

#### *Внеклеточный домен*

**[0195]** Как описано в данном документе, CAR содержит мишень-специфический связывающий элемент (например, по меньшей мере часть антигенсвязывающего агента к GCC), иначе называемый антигенсвязывающим доменом или фрагментом. Выбор домена зависит от типа и количества лигандов, которые определяют поверхность целевой клетки. Например, антигенсвязывающий домен может быть выбран для распознавания лиганда (например, GCC), который выступает в качестве маркера клеточной поверхности на клетках-мишенях, связанных с конкретным болезненным состоянием (например, раком). Таким образом, примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут действовать как лиганды для антигенсвязывающего домена в CAR, включают маркеры, связанные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями, аутоиммунными заболеваниями и раковыми клетками.

**[0196]** В некоторых вариантах внеклеточный домен CAR к GCC содержит антигенсвязывающий агент, который содержит по меньшей мере одну CDR, указанную в таблице 1. В некоторых вариантах внеклеточный домен CAR к GCC содержит переменную область тяжелой цепи, которая имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью VH, указанной в таблице 2 или таблице 3. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CAR к GCC содержит переменную область тяжелой цепи, указанную в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CAR к GCC содержит переменную область тяжелой цепи, указанную в таблице 3.

#### *Трансмембранный домен*

**[0197]** Что касается трансмембранного домена, в различных вариантах осуществления CAR может быть сконструирован таким образом, чтобы включать трансмембранный домен, который присоединен к внеклеточному домену CAR (например, антигенсвязывающему домену к GCC). Трансмембранный домен может включать одну или более дополнительных аминокислот, смежных с трансмембранной областью, например, одну или более аминокислот, связанных с внеклеточной областью белка, из которого был получен трансмембранный белок (например, от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 до 15 аминокислот внеклеточной области), и/или одну или более дополнительных аминокислот, связанных с

внутриклеточной областью белка, из которого был получен трансмембранный белок (например, от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 до 15 аминокислот внутриклеточной области).

**[0198]** В одном аспекте применяют трансмембранный домен, который связан с одним из доменов в CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран из или модифицирован посредством аминокислотной замены во избежание связывания таких доменов с трансмембранными доменами аналогичных или различных белков поверхностной мембраны, например, для сведения к минимуму взаимодействий с другими членами рецепторного комплекса. В одном аспекте трансмембранный домен способен к гомодимеризации с другим CAR на поверхности клетки, экспрессирующей CAR, например, CART-клетки. В еще одном аспекте аминокислотная последовательность трансмембранного домена может быть модифицирована или заменена таким образом, чтобы свести к минимуму взаимодействия со связывающими доменами нативного партнера по связыванию, присутствующего в той же клетке, экспрессирующей CAR, например, CART.

**[0199]** Как описано в данном документе, CAR содержит трансмембранный домен. Что касается трансмембранного домена, CAR содержит один или более трансмембранных доменов, слитых с внеклеточным доменом, связывающим антиген GCC, из CAR. Трансмембранный домен может быть получен либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник является природным, то домен может быть образован из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка.

**[0200]** Трансмембранные области для конкретного применения в описанных в данном документе CAR могут происходить из (т.е. включать по меньшей мере трансмембранную(-ые) область(-и)) альфа-, бета- или дзета-цепи T-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, мезотелина, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154.

**[0201]** Трансмембранный домен может быть получен либо из природного, либо из рекомбинантного источника. Если источник является природным, то домен может быть образован из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. В одном аспекте трансмембранный домен способен к сигналингу внутриклеточным доменам каждый раз, когда CAR связался с мишенью. Трансмембранный домен для конкретного применения в данном изобретении может включать по меньшей мере трансмембранную область(-и), например, альфа-, бета- или дзета-цепи T-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8 (например, CD8-альфа, CD8-бета), CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. В некоторых вариантах осуществления

трансмембранный домен может включать по меньшей мере трансмембранную(-ые) область(-и) костимулирующей молекулы, например, молекулы МНС класса I, белков-рецепторов TNF, иммуноглобулин-подобных белков, рецепторов цитокинов, интегринов, сигнальных молекул активации лимфоцитов (белков SLAM), активирующих рецепторов NK-клеток, BTLA, рецептора лиганда Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, 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, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, и лиганда, который специфически связывается с CD83.

**[0202]** В некоторых вариантах осуществления молекула CAR содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из альфа-, бета- или дзета-цепи T-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154.

**[0203]** Альтернативно трансмембранный домен может быть синтетическим, и в этом случае он будет содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых вариантах осуществления на каждом конце синтетического трансмембранного домена будет находиться триплет из фенилаланина, триптофана и валина. Необязательно короткий олиго- или полипептидный линкер, предпочтительно длиной от 2 до 10 аминокислот, может образовывать связь между трансмембранным доменом и цитоплазматическим сигнальным доменом CAR. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой глицин-сериновый дублет или линкер из трех аланинов.

**[0204]** В некоторых вариантах осуществления в дополнение к трансмембранным доменам, описанным выше, используется трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в CAR. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен можно выбрать путем аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же или отличающихся

белков поверхностной мембраны для минимизации взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса.

**[0205]** В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен в CAR по настоящему изобретению представляет собой трансмембранный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD28 включает последовательность нуклеиновой кислоты FWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWV SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD28 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает последовательность, которая имеет по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 20, 10 или 5 модификаций (например, замен) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 30, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30.

**[0206]** В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может быть присоединен к внеклеточной области CAR, например, антигенсвязывающему домену CAR посредством шарнира, например, шарнира из человеческого белка. Например, в одном варианте осуществления шарнир может представлять собой шарнир человеческого Ig (иммуноглобулин), например, шарнир IgG4 или шарнир CD8a.

**[0207]** В CAR спейсерный домен, также называемый шарнирным доменом, может быть расположен между внеклеточным доменом и трансмембранным доменом или между внутриклеточным доменом и трансмембранным доменом. Спейсерный домен означает любой олигопептид или полипептид, который служит для связывания трансмембранного домена с внеклеточным доменом и/или трансмембранного домена с внутриклеточным доменом. Спейсерный домен содержит до 300 аминокислот, предпочтительно от 10 до 100 аминокислот и наиболее предпочтительно от 25 до 50 аминокислот.

**[0208]** В некоторых вариантах осуществления линкер может включать спейсерный элемент, который, если он присутствует, увеличивает размер линкера, так что расстояние между эффекторной молекулой или обнаруживаемым маркером и антителом или антигенсвязывающим фрагментом увеличивается. Иллюстративные спейсеры известны специалистам и включают те, которые перечислены в патентах США №№ 7964566, 7498298, 6884869, 6323315, 6239104, 6034065, 5780588, 5665860, 5663149, 5635483, 5599902, 5554725, 5530097, 5521284, 5504191, 5410024, 5138036, 5076973, 4986988, 4978744, 4879278, 4816444, и 4486414, а также в публикациях патента США №№

20110212088 и 20110070248, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

**[0209]** Спейсерный домен предпочтительно имеет последовательность, которая способствует связыванию CAR с антигеном и усиливает сигналинг в клетку. Примеры аминокислот, которые, как ожидается, будут способствовать связыванию, включают цистеин, заряженную аминокислоту, а также серин и треонин в потенциальном сайте гликозилирования, и эти аминокислоты можно использовать в качестве аминокислот, составляющих спейсерный домен.

**[0210]** В некоторых вариантах осуществления CAR содержит шарнирный домен. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает последовательность нуклеиновой кислоты IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает последовательность, которая имеет по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 20, 10 или 5 модификаций (например, замен) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 29, или последовательность с 95-99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29.

**[0211]** В некоторых вариантах осуществления CAR содержит шарнирный домен CD8. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает аминокислотную последовательность TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 5). В некоторых вариантах осуществления CAR содержит трансмембранный домен CD8. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает аминокислотную последовательность IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления шарнирный и трансмембранный домены получены из одной и той же молекулы. В других вариантах осуществления шарнирный и трансмембранный домены получены из разных молекул (например, CD8, слитый с CD28). В некоторых вариантах осуществления CAR содержит шарнирный домен. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает последовательность нуклеиновой кислоты

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVA FIIFWV (SEQ ID NO: 31). В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления шарнирный



домен включает последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 20, 10 или 5 модификаций (например, замен) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31.

**[0212]** В одном варианте осуществления CAR содержит последовательность метки, кодирующую укороченную последовательность рецептора эпидермального фактора роста (tEGFR). В некоторых вариантах осуществления метка tEGFR включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43 или последовательность, идентичность которой составляет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

### *Внутриклеточный домен*

**[0213]** Цитоплазматический домен или, иначе, внутриклеточный сигнальный домен CAR отвечает за активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки, в которую был помещен 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 «внутриклеточный сигнальный домен» относится к части белка, которая передает сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение специализированной функции. Тогда как обычно может использоваться весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать всю цепь. В случае применения усеченной части внутриклеточного сигнального домена, такую усеченную часть можно использовать вместо интактной цепи при условии, что она передает сигнал эффекторной функции. Таким образом, это означает, что термин «внутриклеточный сигнальный домен» представляет собой включает любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для передачи сигнала эффекторной функции.

**[0214]** Примеры внутриклеточных сигнальных доменов для применения в CAR включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR) и корецепторов, которые действуют вместе, иницируя сигнальную трансдукцию после взаимодействия с антигенным рецептором, а также любые производные или варианты этих последовательностей и любые синтетические последовательности, которые имеют такие же функциональные способности. Генерируемые только TCR сигналы недостаточны для полной активации Т-клетки, поэтому также требуется вторичный или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация Т-клеток опосредована двумя

различными классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, что инициируют антиген-зависимую первичную активацию через TCR (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и теми, что действуют антиген-независимым образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности).

**[0215]** Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности регулируют первичную активацию комплекса TCR стимулирующим образом или ингибирующим образом. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, известные как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM. В некоторых вариантах осуществления ITAM-содержащий домен в CAR имитирует сигналинг первичного TCR независимо от эндогенных комплексов TCR. В одном аспекте первичный сигнал инициируется посредством, например, связывания комплекса TCR/CD3 с молекулой МНС, загруженной пептидом, что приводит к опосредованию Т-клеточного ответа, включая, помимо прочего, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т. п. Первичная цитоплазматическая сигнальная последовательность (также называемая «первичным сигнальным доменом»), которая действует стимулирующим образом, может содержать сигнальный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM.

**[0216]** Примеры ITAM, содержащие первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые особенно применимы в описанных в данном документе CAR, включают последовательности, полученные из TCR-дзета (CD3-дзета), FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. Конкретные неограничивающие примеры ITAM включают пептиды, имеющие последовательности аминокислот с номерами от 51 до 164 CD3-дзета. (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--932170.1), аминокислот с номерами с 45 по 86 в Fc-эпсилон RI-гамма. (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--004097.1), аминокислот с номерами с 201 по 244 в Fc-эпсилон RI-бета. (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--000130.1), аминокислот с номерами с 139 по 182 в CD3-гамма. (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--000064.1), аминокислот с номерами с 128 по 171 в CD3-дельта. (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--000723.1), аминокислот с номерами с 153 по 207 в CD3-эпсилон. (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--000724.1), аминокислот с номерами с 402 по 495 в CD5 (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--055022.2), аминокислот с номерами с 707 по 847 в 0022 (эталонная последовательность

NCBI: NP.sub.--001762.2), аминокислот с номерами с 166 по 226 в CD79a (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--001774.1), аминокислот с номерами с 182 по 229 в CD79b (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--000617.1), и аминокислот с номерами с 177 по 252 в CD66d (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--001806.2), и их вариантов, обладающих той же функцией, что и эти пептиды. Номер аминокислоты, основанный на информации об аминокислотной последовательности идентификатор эталонной последовательности NCBI или GenBank, описанной в данном документе, нумеруется на основе полной длины предшественника (содержащего последовательность сигнального пептида и т. д.) каждого белка.

**[0217]** В вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен трансдуцирует сигнал эффекторной функции и направляет клетку на выполнение специализированной функции. Хотя можно использовать целый внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях не обязательно использовать новую цепь. В случае применения усеченной части внутриклеточного сигнального домена, такую усеченную часть можно использовать вместо интактной цепи при условии, что она передает сигнал эффекторной функции. Таким образом, это означает, что термин «внутриклеточный сигнальный домен» представляет собой включает любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для передачи сигнала эффекторной функции.

**[0218]** Внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который вызывает иммунную эффекторную функцию клетки, содержащей CAR, например, CART-клетки. К примерам иммунной эффекторной функции, например, в CART-клетке, относится цитолитическая активность и хелперная активность, включая секрецию цитокинов.

**[0219]** В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен. Примеры первичных внутриклеточных сигнальных доменов включают домены, полученные из молекул, ответственных за первичную стимуляцию или антиген-зависимую стимуляцию. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать костимулирующий внутриклеточный домен. К примерам костимулирующих внутриклеточных сигнальных доменов относятся домены, полученные из молекул, которые отвечают за костимулирующие сигналы или стимуляцию, зависящую от антигена. Например, в случае CART первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность T-клеточного рецептора, а

костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность корцептора или костимулирующей молекулы.

**[0220]** В некоторых вариантах осуществления первичные цитоплазматические сигнальные последовательности включают последовательности, полученные из CD3-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известного как «ICOS»), FcεRI, CD66d, DAP10 и DAP12. В одном варианте осуществления цитоплазматическая сигнальная молекула в CAR содержит цитоплазматическую сигнальную последовательность, полученную из CD3-дзета.

**[0221]** В одном варианте осуществления первичный сигнальный домен содержит модифицированный домен ITAM, например, мутировавший домен ITAM, который изменил (например, повысил или снизил) активность по сравнению с нативным доменом ITAM. В одном варианте осуществления первичный сигнальный домен содержит модифицированный первичный внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM, например, оптимизированный и/или укороченный первичный внутриклеточный сигнальный домен, содержащий ITAM. В одном варианте осуществления первичный сигнальный домен содержит один, два, три, четыре или более мотивов ITAM.

**[0222]** В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR может быть сконструирован так, чтобы содержать сигнальный домен CD3-дзета сам по себе или в сочетании с любым другим желаемым цитоплазматическим доменом(-ами), применимыми в контексте CAR. Например, внутриклеточный домен CAR может содержать часть дзета-цепи CD3 и костимуляторную сигнальную область. Костимулирующая сигнальная область относится к части CAR, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимуляторная молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, отличную от рецептора антигена или их лигандов, которая необходима для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. К примерам подобных костимулирующих молекул относятся CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83, и т. п. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, состоящей из OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) и 4-1BB (CD137)

**[0223]** Конкретные неограничивающие примеры таких костимулирующих молекул включают пептиды, имеющие последовательности аминокислот с номерами с 236 по 351 в CD2 (эталонная последовательность NCBI: NP--001758.2), аминокислот с номерами с 421

по 458 в CD4 (эталонная последовательность NCBI: NP 000607.1), аминокислот с номерами с 402 по 495 в CD5 (эталонная последовательность NCBI: NP--055022.2), аминокислот с номерами с 207 по 235 в CD8-альфа. (эталонная последовательность NCBI: NP--001759.3), аминокислот с номерами с 196 по 210 в CD83 (GenBank: AAA35664.1), аминокислот с номерами с 181 по 220 в CD28 (эталонная последовательность NCBI: NP--006130.1), аминокислот с номерами с 214 по 255 в CD137 (4-1BB, эталонная последовательность NCBI: NP--001552.2), аминокислот с номерами с 241 по 277 в CD134 (OX40, эталонная последовательность NCBI: NP--003318.1) и аминокислот с номерами с 166 по 199 в ICOS (эталонная последовательность NCBI: NP--036224.1), и их вариантов, обладающих той же функцией, что и эти пептиды. Таким образом, несмотря на то, что в качестве примера в данном документе приводится 4-1BB в качестве костимулирующего сигнального элемента, другие костимулирующие элементы входят в объем изобретения.

**[0224]** Внутриклеточный сигнальный домен CAR может содержать первичный сигнальный домен, например, сигнальный домен CD3-дзета, сам по себе или может быть объединен с любым другим желаемым внутриклеточным сигнальным доменом(-ами), применимыми в контексте CAR по изобретению. Например, внутриклеточный сигнальный домен CAR может содержать первичный сигнальный домен, например, часть дзета-цепи CD3, и костимулирующий сигнальный домен. Костимулирующий сигнальный домен относится к части CAR, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующая молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, отличающуюся от рецептора антигена или его лигандов, которая требуется для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. Примеры таких молекул включают молекулу MHC класса I, белки-рецепторы TNF, белки, подобные иммуноглобулинам, рецепторы цитокинов, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы NK-клеток, BTLA, рецептор лиганда Toll, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRP1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8-альфа, CD8-бета, IL2R-бета, IL2R-гамма, IL7R-альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, GG AC, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, и лиганд, который специфически связывается с CD83 и т.п. Например,

было показано, что костимуляция CD27 усиливает экспансию, эффекторную функцию и выживаемость человеческих CART-клеток *in vitro* и увеличивает стойкость и противоопухолевую активность человеческих Т-клеток *in vivo* (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706). Внутриклеточные сигнальные последовательности в цитоплазматической части CAR по настоящему изобретению могут быть связаны между собой в случайном или определенном порядке.

**[0225]** Цитоплазматические сигнальные последовательности внутри цитоплазматической сигнальной части CAR могут быть связаны друг с другом в случайном или заданном порядке. Необязательно, связь может образовывать короткий олиго- или полипептидный линкер, предпочтительно длиной от 2 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой глицин-сериновый дублет или линкер из трех аланинов.

**[0226]** В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит костимулирующий сигнальный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 32).

**[0227]** В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит CD3-дзета с одним или более модифицированными иммунорецепторными тирозиновыми активирующими мотивами (ITAM). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит CD3-дзета с немодифицированным первым из трех иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов (ITAM) и измененными вторым и третьим ITAM, названными «1XX». В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR. (SEQ ID NO: 33)

**[0228]** В еще одном варианте осуществления внутриклеточный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен 4-1BB. В еще одном варианте осуществления внутриклеточный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD28 и 4-1BB.

**[0229]** В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR содержит сигнальный домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета, причем сигнальный домен 4-1BB включает KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 3) и сигнальный домен CD3-дзета включает последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEG  
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR  
(SEQ ID NO: 4) или

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEG  
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR  
(SEQ ID NO: 71).

**[0230]** В некоторых вариантах осуществления домены CAR связаны полипептидным линкером. Например, полипептидный линкер может иметь длину от 2 до 10 аминокислот (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот) и может образовывать связь между внутриклеточной сигнальной последовательностью. В одном варианте осуществления глицин-сериновый дублет может использоваться в качестве подходящего линкера. В некоторых вариантах осуществления в качестве подходящего линкера можно использовать одну аминокислоту, например, аланин, глицин.

**[0231]** В одном аспекте внутриклеточный сигнальный домен содержит два или более, например, 2, 3, 4, 5 или более костимулирующих сигнальных доменов. В варианте осуществления два или более, например, 2, 3, 4, 5 или более костимулирующих сигнальных доменов разделены линкерной молекулой, например, линкерной молекулой, описанной в данном документе. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит два костимулирующих сигнальных домена. В некоторых вариантах осуществления линкерная молекула представляет собой остаток глицина. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой остаток аланина.

**[0232]** В одном аспекте внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD28. В одном аспекте внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен 4-1BB.

**[0233]** В одном аспекте внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD27. В одном аспекте внутриклеточный компонент содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD28. В одном аспекте внутриклеточный компонент содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен ICOS.

**[0234]** В некоторых вариантах осуществления CAR к GCC включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в таблице 4.

**[0235]**

*Таблица 4. Аминокислотные последовательности иллюстративных CAR к GCC*

CAR	Последовательность
V1-01 CAR	MGWSCIIIFLVATATGVHSEVQLQESGGLVVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWS WFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKS RVAMSV DTPKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEK SNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDA LHMQUALPPR (SEQ ID NO: 48)
V5 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYW MSWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNG TIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDA LHMQUALPPR (SEQ ID NO: 49)
V36 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQP GGSLRLSCAASGFTFSRYW MTWVRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMD SLRAEDTAVYYCTRDYNDYWGQGTAVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNG TIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRR KNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDA LHMQUALPPR (SEQ ID NO: 50)



V48 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYW MTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQM DNLRAEDTAMYYCTRDYNKDLWGQGLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKS NGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRR KNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDA LHMQUALPPR (SEQ ID NO: 51)
V51 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYW MTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNG TIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRR KNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDA LHMQUALPPR (SEQ ID NO: 52)
V1 CAR	MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWS WFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLNLSSVTAA DTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEK SNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRS KRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAY QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQK DKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 47)

**[0236]** В некоторых вариантах осуществления CAR к GCC включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 47.

**[0237]** В некоторых вариантах осуществления CAR к GCC включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 48.

**[0238]** В некоторых вариантах осуществления CAR к GCC включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 49.

**[0239]** В некоторых вариантах осуществления CAR к GCC включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 50.

**[0240]** В некоторых вариантах осуществления CAR к GCC включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 51.

**[0241]** В некоторых вариантах осуществления CAR к GCC включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 52.

#### *Функциональные особенности CAR*

**[0242]** Также в объем изобретения явно включены функциональные части описанных в данном документе CAR. Термин «функциональная часть» при использовании в отношении CAR относится к любой части или фрагменту одного или более CAR, описанных в данном документе, причем часть или фрагмент сохраняет биологическую активность CAR, частью которого он является (исходный CAR). Функциональные части охватывают, например, те части CAR, которые сохраняют способность распознавать клетки-мишени или обнаруживать, лечить или предотвращать заболевание в такой же степени, в той же степени или в большей степени, чем исходный CAR. Что касается исходного CAR, функциональная часть может составлять, например, около 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% или более исходного CAR.

**[0243]** Функциональная часть может содержать дополнительные аминокислоты на N- или C-конце части или на обоих концах, при этом дополнительные аминокислоты не встречаются в аминокислотной последовательности исходного CAR. Желательно, чтобы дополнительные аминокислоты не мешали биологической функции функциональной части, например, распознавать клетки-мишени, обнаруживать рак, лечить или предотвращать рак и т. д. Более желательно, чтобы дополнительные аминокислоты повышали биологическую активность по сравнению с биологической активностью исходного CAR.

**[0244]** В объем настоящего изобретения включены функциональные варианты CAR, описанные в данном документе. Термин «функциональный вариант», используемый в данном документе, относится к CAR, полипептиду или белку, обладающему существенной или значимой идентичностью или сходством последовательности с исходным CAR, при этом функциональный вариант сохраняет биологическую активность CAR, вариантом которого он является. Функциональные варианты охватывают, например, те варианты CAR,

описанные в данном документе (исходный CAR), которые сохраняют способность распознавать клетки-мишени в такой же степени, в той же степени или в большей степени, что и исходный CAR. Что касается исходного CAR, функциональный вариант может, например, быть по меньшей мере приблизительно на 30%, 50%, 75%, 80%, 90%, 98% или более идентичным по аминокислотной последовательности с исходным CAR.

**[0245]** Функциональный вариант может, например, содержать аминокислотную последовательность исходного CAR с по меньшей мере одной консервативной аминокислотной заменой. Альтернативно или дополнительно функциональные варианты могут содержать аминокислотную последовательность исходного CAR с по меньшей мере одной неконсервативной аминокислотной заменой. В этом случае предпочтительно, чтобы неконсервативная аминокислотная замена не мешала или не подавляла биологическую активность функционального варианта. Неконсервативная аминокислотная замена может усиливать биологическую активность функционального варианта таким образом, что биологическая активность функционального варианта увеличивается по сравнению с исходным CAR.

**[0246]** Аминокислотные замены CAR предпочтительно представляют собой консервативные аминокислотные замены. Консервативные аминокислотные замены известны в данной области техники и включают аминокислотные замены, при которых одну аминокислоту, имеющую определенные физические и/или химические свойства, заменяют на другую аминокислоту, обладающую такими же или аналогичными химическими или физическими свойствами. Например, консервативная замена аминокислоты может представлять собой кислую/отрицательно заряженную полярную аминокислоту, замененную на другую кислую/отрицательно заряженную полярную аминокислоту (например, Asp или Glu), аминокислоту с неполярной боковой цепью, замененную на другую аминокислоту с неполярной боковой цепью (например, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val, и т.д.), основную/положительно заряженную полярную аминокислоту, замененную на другую основную/положительно заряженную полярную аминокислоту (например, Lys, His, Arg, и т.д.), незаряженную аминокислоту с полярной боковой цепью, замененную на другую незаряженную аминокислоту с полярной боковой цепью (например, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr и т. д.), аминокислоту с бета-разветвленной боковой цепью, замененную на другую аминокислоту с бета-разветвленной боковой цепью (например, Ile, Thr и Val), аминокислоту с ароматической боковой цепью, замененную на другую аминокислоту с ароматической боковой цепью (например, His, Phe, Trp и Tyr) и т. д.

**[0247]** CAR могут состоять по существу из указанной аминокислотной последовательности или последовательностей, описанных в данном документе, так что другие компоненты, например, другие аминокислоты, существенно не изменяют биологическую активность функционального варианта.

**[0248]** CAR (включая функциональные части и функциональные варианты) могут быть любой длины, т. е. могут содержать любое количество аминокислот, при условии, что CAR (или их функциональные части или функциональные варианты) сохраняют свою биологическую активность, например, способность специфически связываться с антигеном, обнаруживать пораженные клетки у млекопитающего или лечить или предотвращать заболевание у млекопитающего и т. д. Например, CAR может иметь длину от около 50 до около 5000 аминокислот, например 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 и более аминокислот в длину.

**[0249]** CAR (включая функциональные части и функциональные варианты по изобретению) могут содержать синтетические аминокислоты вместо одной или более природных аминокислот. Такие синтетические аминокислоты известны в данной области техники и включают, например, аминокислоты: аминокислоту циклогексанкарбоновую кислоту, норлейцин,  $\alpha$ -амино-н-декановую кислоту, гомосерин, S-ацетиламинометилцистеин, транс-3- и транс-4-гидроксипролин, 4-аминофенилаланин, 4-нитрофенилаланин, 4-хлорфенилаланин, 4-карбоксифенилаланин,  $\beta$ -фенилсерин  $\beta$ -гидроксифенилаланин, фенилглицин,  $\alpha$ -нафтилаланин, циклогексилаланин, циклогексилглицин, индолин-2-карбоновую кислоту, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту, аминомалоновую кислоту, моноамид аминомалоновой кислоты, N'-бензил-N'-метиллизин, N',N'-дибензиллизин, 6-гидроксилизин, орнитин,  $\alpha$ -аминоциклопентанкарбоновую кислоту,  $\alpha$ -аминоциклогексанкарбоновую кислоту,  $\alpha$ -аминоциклогептанкарбоновую кислоту,  $\alpha$ -(2-амино-2-норборнан)-карбоновую кислоту,  $\gamma$ -диаминомасляную кислоту,  $\beta$ -диаминопропионовую кислоту, гомофенилаланин и  $\alpha$ -трет-бутилглицин.

**[0250]** CAR (включая функциональные части и функциональные варианты) могут быть гликозилированы, амидированы, карбоксилированы, фосфорилированы, этерифицированы, N-ацилированы, циклизованы, например, через дисульфидный мостик, или превращены в кислотно-аддитивную соль и/или необязательно димеризованы или полимеризованы, или конъюгированы.

*Замены и варианты*

**[0251]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рассматриваются варианты аминокислотных последовательностей антител, предложенных в настоящем документе. Например, может быть желательно улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела могут быть получены путем введения соответствующих модификаций в последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Любая комбинация делеции, вставки и замены может быть использована для получения конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками, например, антигенсвязывающими характеристиками.

а) Варианты замены, вставки и делеции

**[0252]** В некоторых вариантах осуществления предложены варианты антител, содержащие одну или более аминокислотных замен. Сайты, представляющие интерес для замещающего мутагенеза, включают HVR и FR. Как дополнительно описано ниже в отношении классов боковых цепей аминокислот. Аминокислотные замены можно вносить в представляющее интерес антитело, и проводить скрининг полученных продуктов в отношении необходимой активности, например, сохранения/улучшения связывания антигена, снижения иммуногенности или улучшения АЗКЦ или КЗЦ.

**[0253]** Аминокислоты можно поделить на группы в соответствии с общими свойствами боковых цепей:

**[0254]** (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

**[0255]** (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

**[0256]** (3) кислые: Asp, Glu;

**[0257]** (4) основные: His, Lys, Arg;

**[0258]** (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;

**[0259]** (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

**[0260]** Неконсервативные замены приводят к замене члена одного из этих классов на члена другого класса.

**[0261]** В некоторых аспектах антигенсвязывающий домен является гуманизированным. Нечеловеческое антитело является гуманизированным, где конкретные последовательности или участки антитела модифицируют для повышения сходства с

антителом, которое естественным образом вырабатывается у человека, или его фрагментом. В одном аспекте антигенсвязывающий домен является гуманизированным. Гуманизированное антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) может быть получено с использованием множества способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, трансплантацию CDR (см., например, европейский патент № EP 239400; международную публикацию № WO 91/09967; и патенты США №№ 5225539, 5530101 и 5585089, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки), маскировку поверхностных остатков или изменение поверхности (см., например, европейские патенты №№ EP 592106 и EP 519596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814; и Roguska et al., 1994, *PNAS*, 91:969-973, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки), перетасовку цепей (см., например, патент США № 5565332, который полностью включен в данный документ посредством ссылки), и методы, раскрытые, например, в публикации заявки на патент США № US 2005/0042664, публикации заявки на патент США № US 2005/0048617, № 6407213, патенте США № 5766886, международной публикации № 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 J S, *Gene*, 150(2):409-10 (1994), и Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73 (1994), полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки. Часто каркасные остатки в каркасных областях будут замещены соответствующим остатком из донорного антитела CDR для изменения, например, улучшения связывания с антигеном. Эти замены каркасных остатков, например, консервативные замены, идентифицируют с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, например, путем моделирования взаимодействий CDR и остатков каркаса для идентификации каркасных остатков, важных для связывания антигена, и сравнения последовательностей для выявления необычных каркасных остатков в конкретных положениях. (См., например, Queen et al., патент США № 5585089, и Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323, которые полностью включены в данный документ посредством ссылки).

**[0262]** Гуманизированное антитело или фрагмент антитела имеет один или более аминокислотных остатков, оставшихся в нем из источника нечеловеческого происхождения. Такие аминокислотные остатки нечеловеческого происхождения часто называются «импортированными» остатками, которые обычно взяты из

«импортированного» переменного домена. Как представлено в настоящем документе, гуманизированные антитела или фрагменты антител содержат одну или более CDR из молекул иммуноглобулина и каркасных областей нечеловеческого происхождения, причем аминокислотные остатки, содержащие каркас, получены полностью или в основном из зародышевой линии человека. В данной области техники хорошо известны многочисленные способы гуманизации антител или фрагментов антител.

**[0263]** Один тип заменяемого варианта включает замену одного или более остатков гиперпеременной области исходного антитела (например, гуманизированное 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 замещающим вариантом 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 HVR подвергают мутации и варианты антитела экспонируют на поверхности фага и проводят скрининг в отношении конкретного вида биологической активности (например, аффинности связывания).

**[0264]** Изменения (например, замены) могут быть сделаны в HVR, например, для улучшения аффинности антитела. Такие изменения могут быть произведены в «горячих точках» HVR, т. е. остатках, кодируемых кодонами, которые подвергаются мутации с высокой частотой во время процесса соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207: 179-196 (2008)), и/или SDR (а-CDR), при этом полученный вариант VH или VL тестируется на связывание близость. 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 созревание аффинности, разнообразие вводится в переменные гены, выбранные для созревания, любым из множества способов (например, подверженной ошибкам ПЦР, перетасовкой цепей или олигонуклеотид-направленным мутагенезом). Затем создают вторичную библиотеку. Затем проводят скрининг библиотеки для идентификации любых вариантов антител с требуемой аффинностью. Другой способ для внесения разнообразия включает подходы, направленные на HVR, в которых несколько аминокислотных остатков HVR (4-6 аминокислотных

остатков подряд) являются рандомизированными. Остатки HVR, вовлеченные в связывание антигена, могут быть специфически идентифицированы, например, с использованием аланин-сканирующего мутагенеза или моделирования. Мишенями в частности являются CDR-H3 и CDR-L3.

**[0265]** В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции могут совершаться внутри одной или более HVR при условии, что такие изменения существенно не снижают способность антитела связывать антиген. Например, в HVR можно проводить консервативные замены (например, консервативные замены, предложенные в данном документе), которые существенно не снижают аффинность связывания. Такие изменения могут происходить за пределами «горячих точек» HVR или CDR. В некоторых вариантах осуществления в вариантах последовательностей VH, приведенных ранее, каждый HVR или не изменен, или содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

**[0266]** Удобный способ выявления остатков или областей антитела, которые могут быть мишенями для мутагенеза, называется «аланин-сканирующим мутагенезом», описанным в Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244: 1081-1085. 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. Альтернативно или дополнительно, кристаллическая структура комплекса антиген-антитело может быть использована для определения точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки могут быть нацелены или исключены как кандидаты для замены. Варианты могут быть проверены, чтобы определить, содержат ли они желаемые свойства.

**[0267]** Вставки аминокислотной последовательности включают N- и/или C-концевые слитые молекулы, имеющие длину в диапазоне от одного остатка до полипептидов, содержащие сто или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или более аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метионильным остатком. 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.



## б) Варианты гликозилирования

**[0268]** 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.

**[0269]** Если антитело содержит область Fc можно изменять присоединенный к ней углевод. Нативные антитела, продуцируемые клетками млекопитающих, обычно содержат разветвленный двухантенный олигосахарид, который обычно присоединяется посредством N-связи к Asn297 домена CH2 Fc-области. 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» биантенной олигосахаридной структуры. В некоторых вариантах осуществления модификации олигосахарида в антителе по настоящей заявке могут быть выполнены для создания вариантов антител с некоторыми улучшенными свойствами.

**[0270]** В некоторых вариантах осуществления представлены варианты антител, имеющие углеводную структуру, в которой отсутствует фукоза, присоединенная (прямо или косвенно) к Fc-области. 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 Asn297 относительно общего количества гликоструктур, присоединенных к Asn 297 (например, комплексных, гибридных или содержащих большое количество маннозы структур), согласно данным масс-спектрометрии MALDI-TOF, как описано, например, в WO 2008/077546. Asn297 относится к остатку аспарагина, расположенному в положении 297 в области Fc (согласно нумерации EU остатков области Fc); при этом Asn297 также может быть расположен на около  $\pm 3$  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 № US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). 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; WO 2005/053742; WO 2002/031140; 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 A1, Presta, L; and WO 2004/056312 A1, Adams et al.), 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 WO2003/085107).

**[0271]** Кроме того, предлагаются варианты антител с олигосахаридами, разделенными пополам, например, в которых биантеннальный олигосахарид, присоединенный к области Fc антитела, разделен пополам с помощью GlcNAc. Такие варианты антител могут иметь пониженное фукозилирование и/или улучшенную функцию АЗКЦ. Примеры таких вариантов антител описаны, например, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); патенте США № 6602684 (Umana et al.); и US 2005/0123546 (Umana et al.). Также предложены варианты антител с по меньшей мере одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к области Fc. Такие варианты антител могут иметь улучшенную функцию КЗЦ. Такие варианты антител описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); и WO 1999/22764 (Raju, S.).

**[0272]** CAR (включая их функциональные части и функциональные варианты) можно получить способами, известными в данной области техники. CAR могут быть получены любым подходящим способом получения полипептидов или белков. Подходящие способы синтеза полипептидов и белков *de novo* описаны в публикациях, таких как Chan et al., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2001; и патент США № 5 449 752. Кроме того, полипептиды и белки могут быть получены рекомбинантным способом с использованием нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, с использованием стандартных рекомбинантных способов. См., например, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; и Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, N Y, 1994. Кроме того, некоторые из CAR (включая их функциональные части и функциональные варианты) могут быть выделены и/или очищены из источника, такого как растение, бактерия, насекомое, млекопитающее,

например, крыса, человек и т. д. Способы выделения и очистки хорошо известны в данной области техники. Альтернативно, описанные в данном документе CAR (включая их функциональные части и функциональные варианты) могут быть коммерчески синтезированы компаниями. В этом отношении CAR могут быть синтетическими, рекомбинантными, выделенными и/или очищенными.

### ***Обнаруживаемые маркеры и метки***

**[0273]** CAR, Т-клетка, экспрессирующая CAR, моноклональные антитела, их антигенсвязывающие фрагменты, специфичные в отношении одного или более антигенов, описанных в настоящем документе, также могут экспрессироваться (например, коэкспрессироваться) с белком-меткой. В некоторых вариантах осуществления сайт распознавания фурином и расположенная ниже последовательность саморасщепляющегося пептида 2A предназначены для одновременной бицистронной экспрессии последовательности метки и последовательности CAR. В некоторых вариантах осуществления последовательность 2A включает последовательность нуклеиновой кислоты GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления фуриновая последовательность и последовательность P2A включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления метка P2A включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44 или последовательность, идентичность которой составляет по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%.

**[0274]** В некоторых вариантах осуществления CAR, Т-клетка, экспрессирующая CAR, моноклональные антитела, их антигенсвязывающие фрагменты, специфичные в отношении одного или более антигенов, описанных в данном документе, также могут экспрессироваться с помощью EGFR. В некоторых вариантах осуществления CAR, Т-клетка, экспрессирующая CAR, моноклональные антитела, их антигенсвязывающие фрагменты, специфичные в отношении одного или более антигенов, описанных в данном документе, экспрессируются (например, совместно экспрессируются) с укороченным EGFR (tEGFR). В некоторых вариантах осуществления tEGFR содержит аминокислотную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 95%, идентична по меньшей мере на 96%, идентична по меньшей мере на 97%, идентична по меньшей мере на 98%, идентична по меньшей мере на 99% или на 100% идентична SEQ ID NO: 43.

tEGFR:

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPV  
AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQ  
FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGE  
NSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSE  
CIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYAD  
AGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFM  
(SEQ ID NO: 43)

**[0275]** CAR, Т-клетка, экспрессирующая CAR, моноклональные антитела, их антигенсвязывающие фрагменты, специфичные в отношении одного или более антигенов, описанных в данном документе, также могут быть конъюгированы с обнаруживаемым маркером; например, обнаруживаемый маркер, который можно обнаружить с помощью ИФА, спектрофотометрии, проточной цитометрии, микроскопии или методов диагностической визуализации (таких как компьютерная томография (КТ), компьютерная аксиальная томография (САТ), магнитно-резонансная томография (МРТ), ядерно-магнитно-резонансная томография (ЯМРТ), магнитно-резонансная томография (МТР), ультразвуковое исследование, фиброоптическое исследование и лапароскопическое исследование). Конкретные неограничивающие примеры обнаруживаемых маркеров включают флуорофоры, хемилюминесцентные агенты, ферментативные связи, радиоактивные изотопы и тяжелые металлы или соединения (например, суперпарамагнитные нанокристаллы оксида железа для обнаружения с помощью МРТ). Например, полезные обнаруживаемые маркеры включают флуоресцентные соединения, в том числе флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, 5-диметиламин-1-нафталинсульфонилхлорид, фикоэритрин, лантаноидные люминофоры и т.п. Также используются биолюминесцентные маркеры, такие как люцифераза, зеленый флуоресцентный белок (GFP), желтый флуоресцентный белок (YFP). CAR, Т-клетка, экспрессирующая CAR, антитело или его антигенсвязывающую часть, также могут быть конъюгированы с ферментами, пригодными для обнаружения, такими как пероксидаза хрена,  $\beta$ -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза, глюкозооксидаза и т.п. Когда CAR, Т-клетка, экспрессирующая CAR, антитело или его антигенсвязывающую часть конъюгируют с обнаруживаемым ферментом, их можно обнаружить путем добавления дополнительных реагентов, которые используются ферментом для получения продукта реакции, который может быть обнаружен. Например, когда присутствует пероксидаза хрена, добавление перекиси водорода и диаминобензидина приводит к окрашиванию продукта реакции, который можно обнаружить визуально. CAR, Т-клетка,

экспрессирующая CAR, антитело или его антигенсвязывающую часть также могут быть конъюгированы с биотином и обнаружены путем непрямого измерения связывания авидина или стрептавидина. Следует отметить, что сам авидин может быть конъюгирован с ферментом или флуоресцентной меткой.

**[0276]** CAR, T-клетка, экспрессирующая CAR, антитело или его антигенсвязывающая часть могут быть конъюгированы с парамагнитным агентом, таким как гадолиний. Парамагнитные агенты, такие как суперпарамагнитный оксид железа, также используются в качестве меток. Антитела также могут быть конъюгированы с лантаноидами (такими как европий и диспрозий) и марганцем. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент также могут быть помечены заранее определенными полипептидными эпитопами, распознаваемыми вторичным репортером (такими как последовательности пар лейциновых молний, сайты связывания вторичных антител, металл-связывающие домены, эпитопные метки).

**[0277]** CAR, T-клетка, экспрессирующая CAR, антитело или его антигенсвязывающую часть также могут быть конъюгированы с аминокислотой, меченной радиоактивным изотопом. Радиоактивная метка может использоваться как в диагностических, так и в терапевтических целях. Например, радиоактивную метку можно использовать для обнаружения одного или более антигенов, описанных в данном документе, и клеток, экспрессирующих антиген, с помощью рентгеновского излучения, спектров излучения или других диагностических методов. Кроме того, радиоактивная метка может быть использована терапевтически в качестве токсина для лечения опухолей у субъекта, например, для лечения нейроblastомы. Примеры меток для полипептидов включают, помимо прочего, следующие радиоизотопы или радионуклеотиды:  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ .

**[0278]** Способы обнаружения таких обнаруживаемых маркеров хорошо известны специалистам в данной области техники. Так, например, радиоактивные метки могут быть обнаружены с помощью фотопленки или сцинтилляционных счетчиков, флуоресцентные маркеры могут быть обнаружены с помощью фотодетектора для обнаружения испускаемого света. Ферментативные метки, как правило, обнаруживают путем предоставления ферменту субстрата и обнаружения продукта реакции, образующегося в результате воздействия фермента на субстрат, а колориметрические метки обнаруживаются путем простой визуализации окрашенной метки.

## **Нуклеиновые кислоты, векторы экспрессии и клетки-хозяева**

**[0279]** Кроме того, вариантом осуществления изобретения является нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую любой из CAR, антитело или его антигенсвязывающую часть, описанные в данном документе (включая их функциональные части и функциональные варианты). Нуклеиновые кислоты по изобретению могут содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую любую из лидерных последовательностей, антигенсвязывающих доменов, трансмембранных доменов и/или внутриклеточных Т-клеточных сигнальных доменов, описанных в данном документе.

**[0280]** В одном аспекте настоящее изобретение охватывает конструкцию рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, где молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую связывающий домен к GCS, например, описанный в данном документе, который является смежным с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей внутриклеточный сигнальный домен, и находится в той же рамке считывания. Иллюстративный внутриклеточный сигнальный домен, который можно использовать в CAR, включает, помимо прочего, один или более внутриклеточных сигнальных доменов, например, CD3-дзета, CD28, 4-1BB и т.п. В некоторых вариантах осуществления CAR может содержать любую комбинацию CD3-дзета, CD28, 4-1BB и т.п.

**[0281]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере около 70% или более, например, около 80%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с нуклеиновой кислотой, кодирующей описанную в данном документе конструкцию CAR.

**[0282]** В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует связывающий домен к GCS, выбранный из последовательности VH к GCS, указанной в таблицах 1-3 или таблице 7. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит последовательность, имеющую по меньшей мере около 70% или больше, например, около 80%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с любой из SEQ ID NO: 61-70. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает последовательность, идентичную любой из SEQ ID NO: 61-70

**[0283]** В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность может быть модифицирована по кодонам. Без привязки к конкретной теории считается, что

оптимизация кодонов нуклеотидной последовательности увеличивает эффективность трансляции транскриптов мРНК. Оптимизация кодонов нуклеотидной последовательности может включать замену нативного кодона другим кодоном, который кодирует ту же аминокислоту, но может транслироваться с помощью тРНК, которая более доступна в клетке, что повышает эффективность трансляции. Оптимизация нуклеотидной последовательности может также уменьшить количество вторичных структур мРНК, которые могут мешать трансляции, тем самым повышая эффективность трансляции.

**[0284]** В варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота может содержать модифицированную по кодонам нуклеотидную последовательность, которая кодирует антигенсвязывающий домен CAR по изобретению. В еще одном варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота может содержать нуклеотидную последовательность с модифицированными кодонами, которая кодирует любой из описанных в данном документе CAR (включая их функциональные части и функциональные варианты).

**[0285]** В одном аспекте изобретение относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе, например, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, описанный в данном документе. В одном варианте осуществления вектор выбран из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора или ретровирусного вектора.

**[0286]** В одном варианте осуществления вектор представляет собой лентивирусный вектор. В одном варианте осуществления вектор дополнительно содержит промотор. В одном варианте осуществления промотор представляет собой промотор EF-1.

**[0287]** Векторы экспрессии включают плазмиды, ретровирусы, космиды, YAC, эписомы, происходящие от EBV, и т.п. Удобным является вектор, который кодирует функционально полную последовательность СН или СL иммуноглобулина человека, с соответствующими сайтами рестрикции, сконструированными таким образом, чтобы можно было легко вставить и экспрессировать любую последовательность VH или VL. В таких векторах сплайсинг обычно происходит между сайтом донора сплайсинга во вставленной области J и сайтом акцептора сплайсинга, предшествующим С-области человека, а также в областях сплайсинга, которые встречаются в экзонах СН человека. Подходящие векторы экспрессии могут содержать ряд компонентов, например, точку начала репликации, селективный маркерный ген, один или более элементов контроля экспрессии, таких как элемент контроля транскрипции (например, промотор, энхансер или терминатор) и/или один или более сигналов трансляции, сигнальную последовательность

или лидерную последовательность и т.п. Полиаденилирование и терминация транскрипции происходят в нативных хромосомных сайтах ниже кодирующих областей. Полученное химерное антитело может быть присоединено к любому сильному промотору. Примеры подходящих векторов, которые можно использовать, включают те, которые подходят для хозяев-млекопитающих и основаны на системах вирусной репликации, таких как обезьяний вирус 40 (SV40), вирус саркомы Рауса (RSV), аденовирус 2, вирус папилломы крупного рогатого скота (BPV), мутантный паповавирус ВК (BKV) или цитомегаловирус мыши и человека (CMV) и вирус мышинового лейкоза Молони (MMLV), нативные промоторы Ig и т. д. В данной области техники известно множество подходящих векторов, включая векторы, которые находятся в одной или более копиях или которые интегрируются в хромосому клетки-хозяина, например, через LTR или с помощью искусственных хромосом, созданных с множественными сайтами интеграции (Lindenbaum et al. *Nucleic Acids Res.* 32:e172 (2004), Kennard et al. *Biotechnol. Bioeng.* Online May 20, 2009). Дополнительные примеры подходящих векторов перечислены в следующем разделе.

**[0288]** Настоящее изобретение также включает конструкцию РНК, которая может быть непосредственно трансфицирована в клетку. Способ получения мРНК для применения при трансфекции включает *in vitro* транскрипцию (IVT) матрицы с помощью специально разработанных праймеров с последующим добавлением поли(А) для получения конструкции, содержащей 3' и 5' нетранслируемую последовательность (UTR), 5'-кэп и/или участок внутренней посадки рибосомы (IRES), нуклеиновую кислоту, подлежащую экспрессии, и поли(А)-хвост, как правило, длиной 50–2000 оснований. Полученная таким образом РНК может эффективно трансфицировать различные типы клеток. В одном варианте осуществления матрица включает последовательности для CAR. В одном варианте осуществления РНК-вектор CAR трансдуцируется в клетку, например, Т-клетку или НК-клетку, путем электропорации.

**[0289]** Таким образом, изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, человеческое, гуманизированное, химерное антитело или антигенсвязывающий фрагмент любого из вышеперечисленных), цепь антитела (например, тяжелую цепь, легкую цепь) или антигенсвязывающую часть цепи антитела, связывающего белок GSC.

**[0290]** Экспрессия в эукариотических клетках-хозяевах полезна, поскольку такие клетки с большей вероятностью, чем прокариотические клетки, собирают и секретируют правильно свернутые и иммунологически активные антитела. Однако любое продуцированное антитело, которое неактивно из-за неправильного фолдинга, может быть



ренатурировано известными способами (Kim and Baldwin, "Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding", *Ann. Rev. Biochem.* 51, pp. 459-89 (1982)). Возможно, что клетки-хозяева будут продуцировать части интактных антител, таких как димеры легких цепей или димеры тяжелых цепей, которые также являются гомологами антител по настоящему изобретению.

**[0291]** В одном варианте осуществления нуклеиновые кислоты можно встраивать в рекомбинантный вектор экспрессии. В этом отношении в одном варианте осуществления предлагаются рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из нуклеиновых кислот. В данном документе 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. Векторы не встречаются в естественных условиях как единое целое.

**[0292]** Однако части векторов могут быть природного происхождения. 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. Предпочтительно, неприродные или измененные нуклеотиды или межнуклеотидные связи не препятствуют транскрипции или репликации вектора.

**[0293]** В одном варианте осуществления рекомбинантный вектор экспрессии может быть любым подходящим рекомбинантным вектором экспрессии и может использоваться для трансформации или трансфекции любой подходящей клетки-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).

**[0294]** Также можно использовать бактериофаговые векторы, такие как  $\lambda$ ,  $\lambda$ ZapII (Stratagene), EMBL4 и  $\lambda$ NMI 149. Примеры векторов экспрессии растений включают pBIO1, pBI101.2, pBHO1.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). Примеры векторов экспрессии на животных включают pEUK-C1, pMAM и pMAMneo (Clontech). Рекомбинантный вектор экспрессии может представлять собой вирусный вектор, например, ретровирусный вектор или лентивирусный вектор. Лентивирусный вектор представляет собой вектор, полученный из по меньшей мере части лентивирусного генома, включая, в частности, самоинактивирующийся лентивирусный вектор, как предлагается в Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Другие примеры лентивирусных векторов, которые можно использовать в клинике, включают, например, но не в порядке ограничения, технологию доставки генов LENTIVECTOR® от Oxford BioMedica plc, векторную систему LENTIMAX™ от Lentigen и т.п. Неклинические типы лентивирусных векторов также доступны и известны специалисту в данной области техники.

**[0295]** Ряд методов трансфекции общеизвестен в данной области техники (см., например, Graham et al., Virology, 52: 456-467 (1973); Sambrook et al., выше; Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier (1986); и Chu et al., Gene, 13: 97 (1981).

**[0296]** Методы трансфекции включают соосаждение фосфатом кальция (см., например, Graham et al., выше), прямую микроинъекцию в культивируемые клетки (см., например, Capecchi, Cell, 22: 479-488 (1980)), электропорацию (см., например, Shigekawa et al., BioTechniques, 6: 742-751 (1988)), опосредованный липосомами перенос генов (см., например, Mannino et al., BioTechniques, 6: 682-690 (1988)), опосредованную липидами трансдукцию (см., например, Feigner et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 84:7413-7417 (1987)), и доставку нуклеиновой кислоты с использованием высокоскоростных микрочастиц (см., например, Klein et al, Nature, 327: 70-73 (1987)).

**[0297]** В одном варианте осуществления рекомбинантные векторы экспрессии могут быть получены 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, плазмиды 2 $\mu$ ,  $\lambda$ , SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота и т.п.

**[0298]** Рекомбинантный вектор экспрессии может содержать регуляторные последовательности, такие как иницирующие и терминирующие кодоны транскрипции и

трансляции, которые специфичны для типа клетки-хозяина (например, бактерии, гриба, растения или животного), в который должен быть введен вектор, при необходимости, с учетом того, основан ли вектор на ДНК или РНК. Рекомбинантный вектор экспрессии может содержать сайты рестрикции для облегчения клонирования.

**[0299]** Рекомбинантный вектор экспрессии может включать один или более маркерных генов, которые позволяют отобрать трансформированных или трансфицированных клеток-хозяев. Маркерные гены включают гены резистентности к биоцидам, например, гены резистентности к антибиотикам, тяжелым металлам и т.д., комплементации в ауксотрофном хозяине для обеспечения прототрофности и т.п. Подходящие маркерные гены для векторов экспрессии по изобретению включают, например, гены резистентности к неомицину/G418, гены резистентности к гигромицину, гены резистентности к гистидинолу, гены резистентности к тетрациклину и гены резистентности к ампициллину.

**[0300]** Рекомбинантный вектор экспрессии может содержать нативный или ненативный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей CAR (включая ее функциональные части и функциональные варианты), или с нуклеотидной последовательностью, которая комплементарна или гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, кодирующей CAR. Выбор промоторов, например, сильных, слабых, индуцируемых, тканеспецифичных и специфичных для развития, находится в пределах обычной квалификации 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 SV40, промотор RSV, промотор EF1-альфа, или промотор, присутствующий в длинном концевом повторе вируса мышинных стволовых клеток.

**[0301]** 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.

**[0302]** Дополнительно могут быть созданы рекомбинантные векторы экспрессии, включающие суицидальный ген. Используемый в данном документе 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 средству, клетке, в которой экспрессируется ген, и заставляет клетку погибать, когда клетку приводят в контакт с агентом или подвергается его воздействию. Суицидальные гены известны в данной области техники (см., например, *Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews*, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004) и включают, например, ген тимидинкиназы (ТК) вируса простого герпеса (HSV), цитозиндезаминазу, пуриннуклеозидфосфорилазу и нитроредуктазу.

**[0303]** Вариант осуществления дополнительно обеспечивает клетку-хозяина, содержащую любой из рекомбинантных векторов экспрессии, описанных в данном документе. В контексте данного документа термин «клетка-хозяин» относится к любому типу клеток, которые могут содержать рекомбинантный вектор экспрессии по изобретению. Клетка-хозяин может быть эукариотической клеткой, например, растением, животным, грибом или водорослью, или может быть прокариотической клеткой, например, бактерией или простейшим. Клетка-хозяин может представлять собой культивируемую клетку или первичную клетку, т. е. выделенную непосредственно из организма, например, человека. Клетка-хозяин может представлять собой адгезивную клетку или суспендированную клетку, т. е. клетку, которая растет в суспензии. Подходящие клетки-хозяева известны в данной области техники и включают, например, клетки DH5a *E. coli*, клетки яичников китайского хомячка, клетки VERO обезьяны, клетки COS, клетки HEK293, клетки HEK293T и тому подобное. Для целей амплификации или репликации рекомбинантного вектора экспрессии клетка-хозяин может быть прокариотической клеткой, например, клеткой DH5a. Для получения рекомбинантного CAR клетка-хозяин может представлять собой клетку млекопитающего. Клетка-хозяин может представлять собой человеческую клетку. Хотя клетка-хозяин может относиться к любому типу клеток, может происходить из любого типа ткани и может находиться на любой стадии развития, клетка-хозяин может быть лимфоцитом периферической крови (PBL) или мононуклеарной клеткой периферической крови (PBMC). Клетка-хозяин может представлять собой Т-клетку.

**[0304]** В данном документе термин Т-клеткой может быть любая Т-клетка, такая как культивируемая Т-клетка, например, первичная Т-клетка или Т-клетка из культивируемой линии Т-клеток, например, Jurkat, SupT1 и т. д., или Т-клетка, полученная от млекопитающего. Если Т-клетка получена от млекопитающего, она может быть получена из многочисленных источников, включая, но не ограничиваясь ими, кровь, костный мозг,

лимфатический узел, тимус или другие ткани или жидкости. Т-клетки также могут быть обогащенными или очищенными. Т-клетка может представлять собой Т-клетку человека. Т-клетка может представлять собой Т-клетку, выделенную из человека. Т-клетка может представлять собой Т-клетку любого типа и может находиться на любой стадии развития, включая, помимо прочего, CD4+/CD8+ двойные положительные Т-клетки, CD4+ Т-хелперы, например, клетки Th1 и Th2, CD8+ Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), инфильтрирующие опухоль клетки, Т-клетки памяти, стволовые клетки памяти, т.е. Tscm, наивные Т-клетки и т.п. Т-клетка может быть CD8+ Т-клеткой или CD4+ Т-клеткой.

**[0305]** В одном варианте осуществления описанные в данном документе CAR можно использовать в подходящих клетках, отличных от Т-клеток. Такими клетками являются клетки с иммуноэффекторной функцией, такие как, например, NK-клетки и Т-подобные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток.

**[0306]** В одном аспекте настоящей заявки предложена сконструированная иммунная эффекторная клетка, содержащая любой из CAR, описанных в данном документе, или любую из выделенных нуклеиновых кислот, описанных выше, или любой из векторов, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, NK-клетку, мононуклеарную клетку периферической крови (PBMC), гемопоэтическую стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку.

**[0307]** В варианте осуществления также предложена популяция клеток, включающая по меньшей мере одну клетку-хозяина, описанную в данном документе. Популяция клеток может представлять собой гетерогенную популяцию, включающую клетку-хозяина, содержащую любой из описанных рекомбинантных векторов экспрессии, в дополнение по меньшей мере к одной другой клетке, например, клетке-хозяину (например, Т-клетке), которая не содержит ни одного из рекомбинантных векторов экспрессии или клетки, отличной от Т-клетки, например, В-клетки, макрофага, нейтрофила, эритроцита, гепатоцита, эндотелиальной клетки, эпителиальной клетки, мышечной клетки, клетки мозга и т. д. Альтернативно, популяция клеток может быть по существу гомогенной популяцией, в которой популяция в основном содержит клетки-хозяева (например, состоящие в основном из), содержащие рекомбинантный вектор экспрессии. Популяция также может быть клональной популяцией клеток, в которой все клетки популяции являются клонами одной клетки-хозяина, содержащей рекомбинантный вектор экспрессии, так что все клетки

популяции содержат рекомбинантный вектор экспрессии. В одном варианте осуществления популяция клеток представляет собой клональную популяцию, включающую клетки-хозяева, содержащие рекомбинантный вектор экспрессии, как описано в данном документе.

**[0308]** CAR (включая их функциональные части и варианты), нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, клетки-хозяева (включая их популяции) и антитела (включая их антигенсвязывающие части) могут быть выделены и/или очищены. Например, очищенный (или выделенный) препарат клетки-хозяина представляет собой препарат, в котором клетка-хозяин является более чистой, чем клетки в их естественной среде в организме. Такие клетки-хозяева могут быть получены, например, с помощью стандартных методов очистки. В некоторых вариантах осуществления препарат клетки-хозяина очищают таким образом, что клетка-хозяин составляла по меньшей мере около 50%, например, по меньшей мере около 70%, от общего содержания клеток в препарате. Например, чистота может составлять по меньшей мере около 50%, может превышать около 60%, около 70% или около 80% или может составлять около 100%.

**[0309]** Последовательности нуклеиновой кислоты, ориентированные на желаемые молекулы, могут быть получены с помощью рекомбинантных методов, известных в данной области техники, как, например, путем скрининга библиотек из клеток, экспрессирующих ген, путем получения гена из вектора, известного как содержащий этот ген, или путем непосредственного выделения из клеток и тканей, содержащих его, используя стандартные методики.

**[0310]** Альтернативно, представляющий интерес ген может быть получен синтетическим путем, а не клонированием. В настоящем изобретении также предлагаются векторы, в которые встраивается ДНК по настоящему изобретению. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются пригодными инструментами для достижения длительного переноса генов, поскольку они обеспечивают длительную стабильную интеграцию трансгена и его распространение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы имеют дополнительное преимущество перед векторами, полученными из онкоретровирусов, таких как вирусы мышиноного лейкоза, в том, что они могут трансдуцировать непролиферирующие клетки, такие как гепатоциты. Они также обладают дополнительным преимуществом низкой иммуногенности.

**[0311]** Экспрессия природных или синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, может быть достигнута путем функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид CAR или ее частей, с промотором и включения конструкции в вектор экспрессии. Векторы могут быть подходящими для

репликации и интеграции эукариот. Типичные векторы для клонирования содержат терминаторы транскрипции и трансляции, последовательности инициации и промоторы, пригодные для регуляции экспрессии желаемой последовательности нуклеиновой кислоты.

**[0312]** Экспрессирующие конструкции по настоящему изобретению также могут использоваться для иммунизации нуклеиновой кислоты и генной терапии, используя стандартные протоколы доставки генов. Способы доставки генов известны в данной области техники. См., например, патент США №№ 5399346, 5580859, 5589466, полностью включенные в данный документ посредством ссылки. В другом варианте осуществления в изобретении предложен вектор для генной терапии.

**[0313]** Нуклеиновая кислота может быть клонирована в целый ряд типов векторов. Например, нуклеиновая кислота может быть клонирована в вектор, включая, помимо прочего, плазмиду, фагмид, производное фага, вирус животного и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают векторы экспрессии, векторы репликации, векторы генерации зондов и векторы секвенирования. Более того, вектор экспрессии можно доставлять в клетку в форме вирусного вектора.

**[0314]** 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. Вирусы, которые можно использовать в качестве векторов, включают в себя, помимо прочего, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. Как правило, подходящий вектор содержит точку начала репликации, функционирующую по меньшей мере в одном организме, последовательность промотора, удобные сайты рестрикционных эндонуклеаз и один или более выбираемых маркеров, (например, WO 01/96584; WO 01/29058; и патент США № 6326193).

**[0315]** Для переноса генов в клетки млекопитающих был разработан ряд вирусных систем. Например, ретровирусы обеспечивают удобную платформу для систем доставки генов. Выбранный ген можно встроить в вектор и упаковать в ретровирусные частицы с использованием способов, известных в данной области техники. Затем рекомбинантный вирус можно выделить и доставить в клетки субъекта либо *in vivo*, либо *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 одном варианте осуществления используются лентивирусные векторы.

**[0316]** Дополнительные элементы промотора, например энхансеры, регулируют частоту инициации транскрипции. Обычно они расположены в области 30-110 п.н. выше стартового сайта, хотя недавно было показано, что ряд промоторов также содержат функциональные элементы ниже стартового сайта. Интервал между элементами промотора часто бывает изменчивым, так что функция промотора сохраняется, когда элементы инвертируются или перемещаются относительно друг друга. В промоторе тимидинкиназы (ТК) интервал между элементами промотора можно увеличить до 50 п. о., прежде чем активность начнет снижаться. В зависимости от промотора оказывается, что отдельные элементы могут функционировать либо совместно, либо независимо для активации транскрипции.

**[0317]** Одним из примеров подходящего промотора является последовательность немедленно раннего промотора цитомегаловируса (CMV). Эта последовательность промотора является последовательностью сильного конститутивного промотора, способной стимулировать высокие уровни экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально с ней связанной.

**[0318]** Другим примером подходящего промотора является фактор роста элонгации-1a (EF-1a). Однако могут также использоваться и другие последовательности конститутивного промотора, включая, помимо прочего, ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор длинных концевых повторов (ДКП) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, немедленный ранний промотор вируса Эпштейна-Барра, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, такие как, помимо прочего, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Более того, настоящее изобретение не должно ограничиваться использованием конститутивных промоторов. Индуцибельные промоторы также рассматриваются как часть настоящего изобретения. Использование индуцируемого промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный включать экспрессию полинуклеотидной последовательности, с которой он функционально связан, когда такая экспрессия желательна, или выключать экспрессию, когда экспрессия нежелательна. Примеры индуцируемых промоторов включают, помимо прочего, промотор металлотионина, промотор глюкокортикоида, промотор прогестерона и тетрациклиновый промотор.

**[0319]** Чтобы оценить экспрессию полипептида CAR или его частей, вектор экспрессии, вводимый в клетку, может также содержать выбираемый маркерный ген,



репортерный ген или и тот, и другой, чтобы способствовать идентификации и выбору экспрессирующих клеток из популяции клеток, которые необходимо подвергнуть трансфекции или инфицировать вирусными векторами. В других аспектах селективный маркер может переноситься отдельным участком ДНК и использоваться в процедуре совместной трансфекции.

**[0320]** Как селективные маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями, чтобы обеспечить экспрессию в клетке-хозяине. К пригодным для использования селективным маркерам относятся, например, устойчивые к антибиотикам гены, такие как *neo* и т. п. Репортерные гены используются для идентификации потенциально трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. В целом, репортерный ген представляет собой ген, который не присутствует или не экспрессируется в реципиентном организме или ткани и который кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется каким-либо легко определяемым свойством, например, ферментной активностью. Экспрессию репортерного гена анализируют в подходящее время после введения ДНК в реципиентные клетки. Подходящие репортерные гены могут включать в себя гены, кодирующие люциферазу, бета-галактозидазу, хлорамфеникол-ацетилтрансферазу, секретлируемую щелочную фосфатазу или ген зеленого флуоресцентного белка (например, *Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82*). Подходящие системы экспрессии хорошо известны и могут быть получены, используя известные методы, или приобретены на коммерческой основе. В целом, конструкция с минимальным 5' фланкирующим участком, демонстрирующая самый высокий уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируется как промотор. Такие промоторные области могут быть связаны с репортерным геном и использоваться для оценки способности веществ модулировать активированную промотором транскрипцию.

**[0321]** В данной области техники известны способы введения и экспрессии генов в клетке. В контексте вектора экспрессии этот вектор можно легко ввести в клетку-хозяина, например, в клетку млекопитающего, бактерии, дрожжей или насекомого, любым способом, известным в данной области техники. Например, вектор экспрессии можно переносить в клетку-хозяин с помощью физических, химических или биологических средств. К физическим способам введения полинуклеотида в клетку-хозяин относятся осаждение фосфатом кальция, липофекция, бомбардировка частицами, микроинъекция, электропорация и т. п. Способы получения клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области техники. Смотрите, например,

Sambrook et al. (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Предпочтительным способом введения полинуклеотида в клетку-хозяин является трансфекция фосфатом кальция.

**[0322]** К биологическим способам введения представляющего интерес полинуклеотида в клетку-хозяин относится использование векторов ДНК и РНК. Вирусные векторы и особенно ретровирусные векторы стали наиболее широко используемым способом переноса генов в клетки млекопитающих, например клетки человека. Другие вирусные векторы могут быть получены из лентивируса, поксвируса, вируса простого герпеса I типа, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т. п. См., например, патенты США №№ 5350674 и 5585362. К химическим способам введения полинуклеотида в клетку-хозяина относятся системы коллоидной дисперсии, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, гранулы, и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы.

**[0323]** Иллюстративной коллоидной системой для применения в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo* является липосома (например, искусственная мембранная везикула). В случае, когда используется невирусная система доставки, иллюстративным носителем доставки является наночастица, например, липосома или другая подходящая система доставки субмикронного размера. Предполагается использование липидных составов для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяин (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*). В другом аспекте изобретения нуклеиновая кислота может быть связана с липидом. Нуклеиновая кислота, связанная с липидом, может быть инкапсулирована в водном внутреннем пространстве липосомы, рассеяна по липидному бислою липосомы, присоединена к липосоме посредством линкерной молекулы, которая связана как с липосомой, так и с олигонуклеотидом, заключена в липосоме, связана в комплекс с липосомой, диспергирована в растворе, содержащем липид, смешана с липидом, объединена с липидом, может содержаться в виде суспензии в липиде, содержатся или быть связана в комплекс с мицеллой или любым другим образом связана с липидом. Композиции, связанные с липидом, липидом/ДНК или липидом/вектором экспрессии, не ограничиваются какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут присутствовать в бислоевой структуре, такой как мицеллы, или иметь «разрушенную» структуру. Также они могут быть просто рассеяны в растворе, предположительно образуя агрегаты, не имеющие одинаковых размера или формы. Липиды представляют собой жиры, которые могут быть природными или синтетическими липидами. Например, липиды включают жирные капли, которые естественным образом встречаются в цитоплазме, а

также класс соединений, содержащих длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, аминоспирты и альдегиды.

**[0324]** Подходящие для использования липиды можно получить из коммерческих источников. Например, димиристоилфосфатидилхолин («DMPC») можно получить от компании Sigma, Сент-Луис, штат Миссури; дицетилфосфат («DCP») можно получить от компании K & K Laboratories (Плейнвью, штат Нью-Йорк); холестерин («Choi») можно получить от компании Calbiochem-Behring; димиристоилфосфатидилглицерин («DMPG») и другие липиды можно получить от компании Avanti Polar Lipids, Inc. (Бирмингем, штат Алабама). Исходные растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле можно хранить при температуре около -20 °С. Хлороформ используется как единственный растворитель, так как он испаряется легче, чем метанол. Термин «липосома» в контексте настоящего описания представляет собой общий термин, охватывающий множество одно- и многослойных липидных носителей, образованных путем образования замкнутых липидных бислоев или агрегатов. Липосомы можно охарактеризовать, как содержащие везикулярные структуры с фосфолипидной бислоевой мембраной и внутренней водной средой. Многослойные липосомы содержат много липидных слоев, разделенных водной средой. Они образуются спонтанно, когда фосфолипиды суспендируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты подвергаются самоорганизации перед образованием замкнутых структур и захватывают воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al, 1991 *Glycobiology* 5: 505-10).

**[0325]** Однако также охватываются композиции, которые имеют структуры в растворе, отличные от нормальной везикулярной структуры. Например, липиды могут принимать мицеллярную структуру или существовать только в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также предусмотрены комплексы липофектамин - нуклеиновая кислота. Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина или иным образом подвергания клетки воздействию ингибитора по настоящему изобретению, с целью подтверждения наличия последовательности рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине можно проводить ряд анализов. Такие анализы 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 выявление наличия или отсутствия конкретного пептида, например, иммунологическими способами (ИФА и вестерн-блоттинг) или путем анализов, описываемых в данном документе, для идентификации веществ, входящих в объем настоящего изобретения.

**[0326]** В настоящем изобретении дополнительно предлагается вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR. В одном аспекте вектор CAR можно непосредственно трансдуцировать в клетку, например, Т-клетку. В одном аспекте вектор представляет собой вектор клонирования или экспрессии, например, вектор, включающий, помимо прочего, одну или более плазмид (например, экспрессионные плазмиды, векторы клонирования, миникольца, минивекторы, двойные микрохромосомы), конструкции ретровирусных и лентивирусных векторов. В одном аспекте вектор способен экспрессировать конструкцию CAR в Т-клетках млекопитающих. В одном аспекте Т-клетка млекопитающего является Т-клеткой человека.

**[0327]** В некоторых аспектах невирусные способы можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, описанный в данном документе, в клетку или ткань или субъекту. В некоторых вариантах осуществления невирусный способ включает использование транспозона (также называемого мобильным генетическим элементом). В некоторых вариантах осуществления транспозон представляет собой фрагмент ДНК, который может встраиваться в определенное место в геноме, например, фрагмент ДНК, способный к саморепликации и встраиванию своей копии в геном, или фрагмент ДНК, который может быть сплайсирован из более длинной нуклеиновой кислоты и вставлен в другое место генома.

**[0328]** Дополнительные и иллюстративные транспозоны и способы невирусной доставки описаны на страницах 196-198 международной заявки WO 2016/164731, поданной 8 апреля 2016 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

#### Источники Т-клеток

**[0329]** Перед экспансией и генетической модификацией, например, для экспрессии CAR, описанного в данном документе, у субъекта можно получить источник клеток, например, Т-клетки или НК-клетки. Термин «субъект» предназначен для включения живых организмов, у которых может быть вызван иммунный ответ (например, млекопитающие). К примерам субъектов относятся люди, собаки, кошки, мыши, крысы и их трансгенные виды.

**[0330]** В вариантах осуществления иммунные эффекторные клетки (например, популяция иммунных эффекторных клеток), например, Т-клетки, происходят из (например, дифференцированы) стволовой клетки, например, эмбриональной стволовой клетки или плюрипотентной стволовой клетки, например, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК). В вариантах осуществления клетки являются аутологичными

или аллогенными. В вариантах осуществления, в которых клетки являются аллогенными, клетки, например, полученные из стволовых клеток (например, iPСК), модифицируют для снижения их аллореактивности. Например, клетки можно модифицировать для снижения аллореактивности, например, путем модификации (например, разрушения) их Т-клеточного рецептора. В вариантах осуществления сайт-специфичная нуклеаза может быть использована для разрушения Т-клеточного рецептора, например, после дифференцировки Т-клеток. В других примерах клетки, например, Т-клетки, полученные из iPСК, могут быть получены из вирус-специфических Т-клеток, которые с меньшей вероятностью вызывают реакцию «трансплантат против хозяина» из-за распознавания ими патогенного антигена. В еще других примерах аллореактивность может быть уменьшена, например, сведена к минимуму путем создания iPСК из общих гаплотипов HLA таким образом, чтобы они были гистосовместимы с соответствующими неродственными субъектами-реципиентами.

**[0331]** В еще других примерах аллореактивность может быть снижена, например, сведена к минимуму путем подавления экспрессии HLA посредством генетической модификации. Например, Т-клетки, полученные из iPСК, можно обрабатывать, как описано, например, в Themeli et al. Nat. Biotechnol. 31.10(2013):928-35, включенной в данный документ посредством ссылки. В некоторых примерах иммунные эффекторские клетки, например, Т-клетки, полученные из стволовых клеток, могут быть обработаны/получены с использованием способов, описанных в WO 2014/165707, включенных в данный документ посредством ссылки.

**[0332]** 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 определенных аспектах настоящего изобретения можно использовать любое количество линий Т-клеток, доступных в данной области техники. В определенных аспектах настоящего изобретения Т-клетки могут быть получены из дозы крови, собранной у субъекта с использованием ряда методов, известных специалисту в данной области техники, таких как отделение Ficoll™. В одном предпочтительном аспекте клетки из циркулирующей крови индивида получают посредством 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 одном аспекте клетки, собранные посредством афереза, могут быть промыты для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для дальнейших этапов обработки. В одном аспекте настоящего изобретения клетки промывают фосфатно-

солевым буфером (PBS). В альтернативном аспекте раствор для промывания не содержит кальций и может не содержать магний или может не содержать многие, если не все, двухвалентные катионы.

**[0333]** Начальные этапы активации при отсутствии кальция могут привести к усиленной активации. Как будет понятно специалистам в данной области техники, этап промывания можно осуществить способами, известными специалистам в данной области техники, такими как с использованием полуавтоматической «проточной» центрифуги (например, клеточного процессора Cobe 2991, Baxter CytoMate или Haemonetics Cell Saver 5) в соответствии с инструкциями производителя. После промывания клетки могут быть повторно суспендированы в различных биосовместимых буферах, таких как, например, не содержащий Ca, не содержащий Mg PBS, PlasmaLyte A, или другом солевом растворе с буфером или без него. Альтернативно, можно удалять нежелательные компоненты образца для афереза и непосредственно ресуспендировать клетки в питательной среде.

**[0334]** Признано, что в способах применения могут использовать условия культивирования в питательной среде, содержащей 5% или менее, например, 2%, сыворотки АВ человека, и использовать известные условия культивирования в питательной среде и композиции питательной среды, например те, которые описаны в Smith et al., “Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement” *Clinical & Translational Immunology* (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31.

**[0335]** В одном аспекте Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови посредством лизиса эритроцитов и истощения моноцитов, например, посредством центрифугирования в градиенте PERCOLL™ или противоточной центрифужной элютриации. 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 одном аспекте Т-клетки выделяют посредством инкубации с гранулами, конъюгированными с антителами к CD3/CD28 (например, 3x28), такими как DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 Т, в течение периода времени, достаточного для положительной селекции желаемых Т-клеток. В одном аспекте период времени составляет около 30 минут. В дополнительном аспекте период времени находится в диапазоне от 30 минут до 36 часов или более для всех целых значений в этом диапазоне. В дополнительном аспекте период времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 часов. В еще одном предпочтительном аспекте период времени составляет от 10 до 24 часов. В одном аспекте время инкубации составляет 24 часа. Большее время

инкубации можно использовать для выделения Т-клеток в любой ситуации, когда Т-клеток меньше по сравнению с другими типами клеток, как при выделении проникающих в опухоль лимфоцитов (TIL) из опухолевой ткани или у индивидов с иммунодефицитом. Более того, использование большего времени инкубации может повышать эффективность захвата CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Таким образом, простым уменьшением или увеличением времени связывания Т-клеток с частицами CD3/CD28 и/или увеличением или уменьшением соотношения частиц к Т-клеткам (как описано ниже в данном документе) 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 будет понятно, что в контексте настоящего изобретения также можно использовать многочисленные этапы селекции. В определенных аспектах может быть желательным проведение процедуры селекции и использование «неотобранных» клеток в процессе активации и экспансии. «Неотобранные» клетки также можно подвергать дополнительным этапам селекции.

**[0336]** Обогащение популяции Т-клеток посредством негативного отбора можно осуществлять с помощью комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для негативно отбираемых клеток. Один способ представляет собой сортировку и/или селекцию клеток посредством отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которых применяют смесь моноклональных антител, направленных на маркеры поверхности клетки, присутствующие на отрицательно отобранных клетках. Например, для обогащения CD4<sup>+</sup> клеток посредством отрицательной селекции, смесь моноклональных антител обычно включает антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, и CD8. В определенных аспектах может быть желательным обогащение или положительная селекция регуляторных Т-клеток, которые обычно экспрессируют CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD62Lhi, GITR<sup>+</sup> и FoxP3<sup>+</sup>.

**[0337]** Альтернативно, в определенных аспектах регуляторные Т-клетки деплецируют посредством частиц, конъюгированных с антителом к CD25, или другим аналогичным способом селекции. Способы, описанные в данном документе, могут включать, например, селекцию конкретной субпопуляции иммунных эффекторных клеток, например, Т-клеток, которые представляют собой популяцию, истощенную в отношении регуляторных Т-клеток, клетки, истощенные по CD25<sup>+</sup>, с использованием, например,

методики отрицательной селекции, например, описанной в данном документе. Предпочтительно популяция клеток, истощенных в отношении регуляторных Т-клеток, содержит менее 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% CD25+ клеток.

**[0338]** В одном варианте осуществления регуляторные Т-клетки, например, CD25+ Т-клетки, удаляют из популяции с использованием антитела к CD25 или его фрагмента, или CD25-связывающего лиганда, IL-2. В одном варианте осуществления антитело к CD25, или его фрагмент, или CD25-связывающий лиганд конъюгированы с подложкой, например, частицей, или иным образом нанесены на подложку, например, частицу. В одном варианте осуществления антитело к CD25 или его фрагмент конъюгируют с субстратом, как описано в данном документе.

**[0339]** В одном варианте осуществления регуляторные Т-клетки, например, CD25+ Т-клетки, удаляют из популяции с использованием реагента для истощения CD25 от Miltenyi™. В одном варианте осуществления соотношение клеток к реагенту для истощения CD25 составляет  $1e7$  клеток на 20 мкл, или  $1e7$  клеток на 15 мкл, или  $1e7$  клеток на 10 мкл, или  $1e7$  клеток на 5 мкл, или  $1e7$  клеток на 2,5 мкл, или  $1e7$  клеток на 1,25 мкл. В одном варианте осуществления, например, для регуляторных Т-клеток, например, истощения CD25+, используется более 500 миллионов клеток/мл. В еще одном аспекте используется концентрация клеток 600, 700, 800 или 900 миллионов клеток/мл. В одном варианте осуществления популяция иммунных эффекторных клеток, подлежащих истощению, включает приблизительно  $6 \times 10^9$  CD25+ Т-клеток. В других аспектах популяция иммунных эффекторных клеток, подлежащих истощению, включает от около  $1 \times 10^9$  до  $1 \times 10^{10}$  CD25+ Т-клеток и любое целое число между ними. В одном варианте осуществления полученная популяция клеток, истощенных в отношении регуляторных Т-клеток, содержит  $2 \times 10^9$  регуляторных Т-клеток, например, CD25+ клеток или меньше (например,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^7$  или меньше CD25+ клеток).

**[0340]** В одном варианте осуществления регуляторные Т-клетки, например, CD25+ клетки, удаляют из популяции с помощью системы CliniMAC с набором трубок для истощения клеток, например, трубкой 162-01. В одном варианте осуществления система CliniMAC работает с настройкой для истощения, такой как, например, DEPLETION2.1.

**[0341]** Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, снижение уровня негативных регуляторов иммунных клеток (например, уменьшение количества нежелательных иммунных клеток, например, регуляторных Т-клеток) у субъекта перед аферезом или во время производства продукта на основе CAR-экспрессирующих клеток может снизить риск рецидива у субъекта. Например, в данной области техники известны



способы истощения регуляторных Т-клеток. Способы снижения количества регуляторных Т-клеток включают, но не ограничиваются ими, циклофосфамид, антитело к GITR (антитело к GITR, описанное в данном документе), истощение CD25 и их комбинации.

**[0342]** В некоторых вариантах осуществления способы производства включают уменьшение количества (например, истощение) регуляторных Т-клеток перед производством клеток, экспрессирующих CAR. Например, способы производства включают приведение в контакт образца, например, образца после афереза, с антителом к GITR и/или антителом к CD25 (или его фрагментом, или лигандом, связывающим CD25), например, для истощения регуляторных Т-клеток до производства продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR, (например, Т-клеток, НК-клеток).

**[0343]** В одном варианте осуществления субъект предварительно лечится одним или более видами терапии, которые снижают количество регуляторных Т-клеток, перед сбором клеток для производства продуктов на основе клеток, экспрессирующих CAR, тем самым снижая риск рецидива лечения субъекта клетками, экспрессирующими CAR. В одном варианте осуществления способы снижения количества регуляторных Т-клеток включают, но не ограничиваются ими, введение субъекту одного или более из циклофосфамида, антитела к GITR, истощения CD25 или их комбинации. Введение одного или более из циклофосфамида, антитела к GITR, истощения CD25 или их комбинации может происходить до, во время или после инфузии продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR.

**[0344]** В одном варианте осуществления субъект предварительно лечится циклофосфамидом перед сбором клеток для производства продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR, тем самым снижая риск рецидива лечения субъекта клетками, экспрессирующими CAR. В одном варианте осуществления субъект предварительно лечится антителом к GITR перед сбором клеток для производства продукта на основе клеток, экспрессирующих CAR, тем самым снижая риск рецидива лечения субъекта клетками, экспрессирующими CAR.

**[0345]** В одном варианте осуществления популяция клеток, подлежащих удалению, не является ни регуляторными Т-клетками, ни опухолевыми клетками, а клетками, которые иначе негативно влияют на экспансию и/или функцию CART-клеток, например, клетки, экспрессирующие CD14, CD11b, CD33, CD15 или другие маркеры, экспрессируемые потенциально иммуносупрессорными клетками. В одном варианте осуществления предусмотрено удаление таких клеток одновременно с регуляторными Т-клетками и/или опухолевыми клетками, или после указанного истощения, или в другом порядке.

**[0346]** Описанные в данном документе способы могут включать более одной стадии селекции, например, более одной стадии истощения. Обогащение популяции Т-клеток посредством отрицательной селекции может быть достигнуто, например, с комбинацией антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для отрицательно отобранных клеток. Один способ представляет собой сортировку и/или селекцию клеток посредством отрицательной магнитной иммуноадгезии или проточной цитометрии, в которых применяют смесь моноклональных антител, направленных на маркеры поверхности клетки, присутствующие на отрицательно отобранных клетках. Например, для обогащения в отношении CD4<sup>+</sup> клеток посредством негативного отбора коктейль моноклональных антител может включать антитела к CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8.

**[0347]** Способы, описанные в данном документе, могут дополнительно включать удаление из популяции клеток, которые экспрессируют опухолевый антиген, например, опухолевый антиген, который не содержит CD25, например, CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 или CD11b, чтобы тем самым получить популяцию клеток, истощенных в отношении регуляторных Т-клеток, например, истощенной по CD25<sup>+</sup>, и истощенных по опухолевому антигену клеток, которые подходят для экспрессии CAR, например, CAR, описанного в данном документе. В одном варианте осуществления клетки, экспрессирующие опухолевой антиген, удаляют одновременно с регуляторными Т-клетками, например, CD25<sup>+</sup> клетками. Например, антитело к CD25 или его фрагмент и антитело к опухолевому антигену или его фрагмент можно прикрепить к одному и тому же субстрату, например, частице, который можно использовать для удаления клеток, или антитело к CD25 или его фрагмент, или антитело к опухолевому антигену, или его фрагмент можно прикрепить к отдельным частицам, смесь которых можно использовать для удаления клеток. В других вариантах осуществления удаление регуляторных Т-клеток, например, CD25<sup>+</sup> клеток, и удаление клеток, экспрессирующих опухолевый антиген, происходит последовательно и может происходить, например, в любом порядке.

**[0348]** Также предложены способы, которые включают удаление клеток из популяции, которые экспрессируют ингибитор контрольной точки, например, ингибитор контрольной точки, описанный в данном документе, например, одну или более из PD1<sup>+</sup> клеток, FAG3<sup>+</sup> клеток и TIM3<sup>+</sup> клеток, чтобы таким образом получить популяцию клеток, истощенных в отношении Т-клеток, например, клеток, истощенных по CD25<sup>+</sup>, и клеток, истощенных по ингибитору контрольной точки, например, клетки, истощенных по PD1<sup>+</sup>, FAG3<sup>+</sup> и/или TIM3<sup>+</sup>. Примеры ингибиторов контрольных точек включают B7-H1, B7-1,

CD160, P1H, 2B4, PD1, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM 5), LAG3, TIGIT, CTLA-4, BTLA. и LAIR1. В одном варианте осуществления клетки, экспрессирующие ингибитор контрольной точки, удаляют одновременно с регуляторными Т-клетками, например, CD25+ клетками. Например, антитело к CD25 или его фрагмент и антитело к ингибитору контрольной точки или его фрагмент могут быть присоединены к одной и той же частице, которую можно использовать для удаления клеток, или антитело к CD25, или его фрагмент и антитело к ингибитору контрольной точки или его фрагмент могут быть присоединены к отдельным частицам, смесь которых может быть использована для удаления клеток. В других вариантах осуществления удаление регуляторных Т-клеток, например, CD25+ клеток, и удаление клеток, экспрессирующих ингибитор контрольной точки, происходит последовательно и может происходить, например, в любом порядке.

**[0349]** В одном варианте осуществления можно выбрать такую популяцию Т-клеток, которая экспрессирует один или более из IFN-g, TNFa, IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, гранзима В и перфорина, или других соответствующих молекул, например, других цитокинов. Способы скрининга клеточной экспрессии можно определить, например, способами, описанными в публикации РСТ №: WO 2013/126712.

**[0350]** Для выделения желаемой популяции клеток посредством положительной или отрицательной селекции можно изменять концентрацию клеток и поверхность (например, частиц, таких как гранулы). В определенных аспектах может быть желательным существенное уменьшение объема, в котором гранулы и клетки смешивают друг с другом (например, увеличение концентрации клеток), для обеспечения максимального приведения в контакт клеток и частиц. Например, в одном аспекте используют концентрацию 2 миллиарда клеток/мл. В одном аспекте используют концентрацию 1 миллиард клеток/мл. В дополнительном аспекте используют концентрацию более чем 100 миллионов клеток/мл. В дополнительном аспекте используют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В еще одном аспекте используют концентрацию клеток от 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных аспектах могут использовать концентрацию 125 или 150 миллионов клеток/мл.

**[0351]** Применение высоких концентраций может приводить к повышению выхода клеток, активации клеток и экспансии клеток. Более того, использование высоких концентраций клеток обеспечивает более эффективный захват клеток, которые могут слабо экспрессировать представляющие интерес антигены-мишени, такие как CD28-отрицательные Т-клетки, или из образцов, где содержится много опухолевых клеток

(например, кровь больного лейкозом, опухолевая ткань и т. д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическое значение и их может быть желательно получать. Например, применение высоких концентраций клеток обеспечивает более эффективный отбор CD8<sup>+</sup> Т-клеток, которые обычно имеют более слабую экспрессию CD28.

**[0352]** В родственном аспекте может быть желательным использование более низких концентраций клеток. Значительным разведением смеси Т-клеток и поверхности (например, частиц, таких как гранулы) сводят к минимуму взаимодействия между частицами и клетками. Это позволяет отбирать клетки, которые экспрессируют высокие количества желаемых антигенов, которые должны связываться с частицами. Например, CD4<sup>+</sup> Т-клетки экспрессируют высокие уровни CD28, и их можно более эффективно захватывать по сравнению с CD8<sup>+</sup> Т-клетками в разведенных концентрациях.

**[0353]** В одном аспекте используемая концентрация клеток составляет  $5 \times 10^6$ /мл. В других аспектах используемая концентрация может составлять от около  $1 \times 10^5$ /мл до  $1 \times 10^6$ /мл и любое целое значение в этом диапазоне.

**[0354]** В других аспектах клетки можно инкубировать на ротационном шейкере в течение периодов времени различной продолжительности при различных скоростях при температуре 2–10°C или при комнатной температуре. Т-клетки для стимуляции также можно замораживать после этапа промывки. Не ограничиваясь теорией, этап заморозки и последующей разморозки обеспечивает 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. Несмотря на то, что многие замораживающие растворы и параметры известны в данной области техники и будут являться пригодными в этом контексте, один из способов включает в себя использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% сывороточного альбумина человека, или культуральной среды, содержащей 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% сывороточного альбумина человека и 7,5% DMSO, или 31,25% Plasmalyte-A, 31,25% декстрозы 5%, 0,45% NaCl, 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% сывороточного альбумина человека и 7,5% DMSO, или других подходящих для замораживания клеток сред, содержащих, например, Hesperan и PlasmaLyte A, затем клетки замораживают до –80°C при скорости 1 в минуту и хранят в газовой фазе в резервуаре для хранения жидкого азота. Можно использовать другие способы контролируемого замораживания, а также неконтролируемого замораживания непосредственно при температуре –20°C или в жидком азоте.

**[0355]** В определенных аспектах криоконсервированные клетки размораживают и промывают, как описано в данном документе, и оставляют оттаиваться в течение одного часа при комнатной температуре перед активацией способами по настоящему изобретению.

**[0356]** В контексте настоящего изобретения также предусмотрен сбор образцов крови или продукта афереза у субъекта в течение периода времени перед тем, когда могут потребоваться размноженные клетки, как описано в настоящем документе. 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, таких как описанные в данном документе.

**[0357]** В одном аспекте образец крови или продукт афереза получают, как правило, у здорового субъекта. В определенных аспектах образец крови или продукт афереза получают, как правило, у здорового субъекта, который подвержен риску развития заболевания, но у которого еще не развилось заболевание, и представляющие интерес клетки выделяют и замораживают для дальнейшего использования. В определенных аспектах Т-клетки можно подвергать размножению, замораживать и использовать позже. В определенных аспектах образцы собирают у пациента сразу же после диагностики конкретного заболевания, как описано в настоящем документе, но до начала какого-либо лечения.

**[0358]** В дополнительном аспекте клетки выделяют из образца крови или продукта афереза у субъекта до начала проведения любого количества подходящих способов лечения, включая, помимо прочего, лечение средствами, такими как натализумаб, эфализумаб, противовирусные средства, химиотерапию, облучение, иммунодепрессивные средства, такие как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антитела или другие иммунодеструктивные средства, такие как CAMPATH, антитела к CD3, цитоксан, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, FR901228 и облучение.

**[0359]** В дополнительном аспекте настоящего изобретения Т-клетки получают у пациента непосредственно после лечения, в результате которого у субъекта остаются функциональные Т-клетки. 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 размножению *ex vivo*.

**[0360]** Аналогичным образом, после манипуляций *ex vivo* с использованием способов, описываемых в данном документе, эти клетки могут находиться в предпочтительном состоянии для повышения приживления 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. Более того, в определенных аспектах можно использовать мобилизацию (например, мобилизацию с GM-CSF) и схемы симптоматического лечения для создания состояния у субъекта, при котором благоприятной является репопуляция, рециркуляция, регенерация и/или экспансия конкретных типов клеток, особенно в течение определенного временного окна после терапии. Иллюстративные типы клеток включают в себя Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и другие клетки иммунной системы.

**[0361]** В некоторых вариантах осуществления популяция Т-клеток дефицитна по диаглицеролкиназе (DGK). Дефицитные по DGK клетки включают клетки, которые не экспрессируют РНК или белок DGK или обладают сниженной или подавленной активностью DGK. Дефицитные по DGK клетки можно получить с помощью генетических подходов, например, путем введения РНК-интерферирующих агентов, например, киРНК, кшРНК, миРНК, для снижения или предотвращения экспрессии DGK. Альтернативно, дефицитные по DGK клетки могут быть получены путем обработки описанными в данном документе ингибиторами DGK.

**[0362]** В одном варианте осуществления популяция Т-клеток является дефицитной по Ikaros. Дефицитные по Ikaros клетки включают клетки, которые не экспрессируют РНК или белок Ikaros, или имеют сниженную или подавленную активность Ikaros. Дефицитные по Ikaros клетки могут быть созданы с помощью генетических подходов, например, путем введения РНК-интерферирующих агентов, например, киРНК, кшРНК, миРНК, для снижения или предотвращения экспрессии Ikaros.

**[0363]** В качестве альтернативы дефицитные по Ikaros клетки могут быть получены путем обработки ингибиторами Ikaros, например, леналидомидом. В вариантах осуществления популяция Т-клеток является дефицитной по DGK и дефицитной по Ikaros, например, не экспрессирует DGK и Ikaros или имеет сниженную или подавленную активность DGK и Ikaros. Такие дефицитные по DGK и Ikaros клетки можно получить любым из описанных здесь способов. В одном варианте осуществления НК-клетки

получают от субъекта. В другом варианте осуществления НК-клетки представляют собой линию НК-клеток, например, линию клеток NK-92 (Conkwest).

#### Аллогенные CAR иммунные эффекторная клетки

**[0364]** В вариантах осуществления, описанных в данном документе, иммунная эффекторная клетка может представлять собой аллогенную иммунную эффекторную клетку, например, Т-клетку или НК-клетку. Например, клетка может быть аллогенной Т-клеткой, например, аллогенной Т-клеткой, в которой отсутствует экспрессия функционального Т-клеточного рецептора (TCR) и/или человеческого лейкоцитарного антигена (HLA), например, HLA класса I и/или HLA класса II.

**[0365]** Т-клетка, лишенная функционального TCR, может быть, например, сконструирована таким образом, что она не экспрессирует никаких функциональных TCR на своей поверхности, сконструирована таким образом, что она не экспрессирует одну или более субъединиц, составляющих функциональный TCR, или сконструирована таким образом, что она продуцирует очень мало функциональных TCR на своей поверхности. Альтернативно Т-клетка может экспрессировать существенно нарушенный TCR, например, путем экспрессии мутантных или укороченных форм одной или более субъединиц TCR. Термин «существенно нарушенный TCR» означает, что этот TCR не будет вызывать неблагоприятную иммунную реакцию у хозяина.

**[0366]** Т-клетка, описанная в настоящем документе, может быть, например, сконструирована таким образом, что она не экспрессирует на своей поверхности функциональный HLA. Например, Т-клетки, описанные в данном документе, могут быть сконструированы таким образом, что экспрессия HLA на клеточной поверхности, например, HLA класса I и/или HLA класса II, снижена.

**[0367]** В некоторых вариантах осуществления в Т-клетке может отсутствовать функциональный TCR и функциональный HLA, например, HLA класса I и/или HLA класса II. Модифицированные Т-клетки, в которых отсутствует экспрессия функционального TCR и/или HLA, могут быть получены любым подходящим способом, включая нокаут или нокадаун одной или более субъединиц TCR или HLA. Например, Т-клетка может включать нокадаун TCR и/или HLA с использованием кнРНК, кшРНК, коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами, (CRISPR), нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции, (TALEN), или эндонуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN).

**[0368]** В некоторых вариантах осуществления аллогенная клетка может представлять собой клетку, которая не экспрессирует или экспрессирует на низких уровнях ингибирующую молекулу, например любым описанным в данном документе способом. Например, клетка может быть клеткой, которая не экспрессирует или экспрессирует на низких уровнях ингибирующую молекулу, например, которая может снижать способность экспрессирующей CAR клетки вызывать иммунный эффекторный ответ. Примеры ингибирующих молекул включают PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC класса I, MHC класса II, GAL9 и аденозин. Ингибирование ингибирующей молекулы, например, путем ингибирования ДНК, РНК или уровня белка, может оптимизировать эффективность CAR-экспрессирующей клетки. В вариантах осуществления можно использовать ингибирующую нуклеиновую кислоту, например, ингибирующую нуклеиновую кислоту, например, дцРНК, например, киРНК или кшРНК, короткие палиндромные повторы регулярно расположенные группами, (CRISPR), нуклеазу на основе эффектора, подобного активатору транскрипции, (TALEN), или эндонуклеазу с цинковыми пальцами (ZFN), например, как описано в данном документе.

#### киРНК и кшРНК для ингибирования TCR или HLA

**[0369]** В некоторых вариантах осуществления экспрессия TCR и/или экспрессия HLA в клетке, например, Т-клетке, может быть ингибирована с использованием киРНК или кшРНК, нацеленных на нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR и/или HLA, и/или ингибирующую молекулу (например, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC класса I, MHC класса II, GAL9 и аденозин) в клетке, например, в Т-клетке.

**[0370]** Системы экспрессии для киРНК и кшРНК, а также иллюстративные кшРНК описаны, например, в абзацах 649 и 650 международной публикации WO 2015/142675, поданной 13 марта 2015 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

#### CRISPR для ингибирования TCR или HLA

**[0371]** «CRISPR» или «CRISPR для TCR и/или HLA» или «CRISPR для ингибирования TCR и/или HLA», как используется в данном документе, относится к набору коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами, или к системе,



содержащей такой набор повторов. В контексте данного документа «Cas» относится к CRISPR-ассоциированному белку.

**[0372]** Система «CRISPR/Cas» относится к системе, полученной из CRISPR и Cas, которую можно использовать для сайленсинга или мутирования гена TCR и/или HLA, и/или ингибирующей молекулы (например, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC класса I, MHC класса II, GAL9 и аденозин) в клетке, например, Т-клетке. Система CRISPR/Cas и ее применение описаны, например, в абзацах 651-658 Международной публикации WO2015/142675, поданной 13 марта 2015 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

#### TALEN для ингибирования TCR и/или HLA

**[0373]** «TALEN» или «TALEN для HLA и/или TCR» или «TALEN для ингибирования HLA и/или TCR» относится к энуклеазе на основе эффектора, подобного активатору транскрипции, искусственной нуклеазе, которую можно использовать для редактирования гена HLA и/или TCR, и/или ингибирующую молекулу (например, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC класса I, MHC класса II, GAL9 и аденозин), в клетке, например, Т-клетке.

**[0374]** TALEN и их применение описаны, например, в абзацах 659-665 международной публикации WO20 15/142675, поданной 13 марта 2015 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

#### Нуклеаза с цинковыми пальцами для ингибирования HLA и/или TCR

**[0375]** «ZFN» или «нуклеаза с цинковыми пальцами» или «ZFN для HLA и/или TCR» или «ZFN для ингибирования HLA и/или TCR» относятся к нуклеазе с цинковыми пальцами, искусственной нуклеазе, которую можно использовать для редактирования гена HLA и/или TCR, и/или ингибирующей молекулы (например, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC класса I, MHC класса II, GAL9 и аденозин) в клетке, например, Т-клетке.

**[0376]** ZFN и их применение описаны, например, в абзацах 666-671 международной публикации WO20 15/142675, поданной 13 марта 2015 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

#### Экспрессия теломеразы

**[0377]** Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, в некоторых вариантах осуществления терапевтическая Т-клетка временно сохраняется у пациента из-за укороченных теломер в Т-клетке; соответственно, трансфекция геном теломеразы может удлинить теломеры Т-клетки и улучшить персистенцию Т-клетки у пациента. См. Carl June, "Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic", *Journal of Clinical Investigation*, 117:1466-1476 (2007). Таким образом, в одном варианте осуществления иммунная эффекторная клетка, например, Т-клетка, эктопически экспрессирует субъединицу теломеразы, например, каталитическую субъединицу теломеразы, например, TERT, например, hTERT. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложен способ получения клетки, экспрессирующей CAR, включающий приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей субъединицу теломеразы, например, каталитическую субъединицу теломеразы, например, TERT, например, hTERT. Клетку можно приводить в контакт с нуклеиновой кислотой до, одновременно или после приведения в контакт с конструкцией, кодирующей CAR.

**[0378]** В одном аспекте в описании представлен способ получения популяции иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток, НК-клеток). В одном варианте осуществления способ включает: получение популяции иммунных эффекторных клеток (например, Т-клеток или НК-клеток), приведение популяции иммунных эффекторных клеток в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR; и приведение популяции иммунных эффекторных клеток в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей субъединицу теломеразы, например, hTERT, в условиях, которые обеспечивают экспрессию CAR и теломеразы.

**[0379]** В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая субъединицу теломеразы, представляет собой ДНК. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая субъединицу теломеразы, содержит промотор, способный управлять экспрессией субъединицы теломеразы AAC5 1724.1 (Meyerson et al, "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization" *Cell* Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, страницы 785-795).

## Способы лечения

**[0380]** Настоящее изобретение относится к способам лечения, включающим введение субъекту антигенсвязывающей молекулы к GСС. В некоторых вариантах осуществления CAR к GСС и антигенсвязывающие молекулы, описанные в данном документе, можно использовать в способах лечения или предотвращения заболевания у млекопитающего. В этом отношении вариант осуществления обеспечивает способ лечения или предотвращения рака у млекопитающего, включающий введение млекопитающему CAR, нуклеиновых кислот, рекомбинантных векторов экспрессии, клеток-хозяев, популяции клеток, антител и/или их антигенсвязывающие части и/или фармацевтические композиции в количестве, эффективном для лечения или предотвращения рака у млекопитающего. Изобретение также относится к антигенсвязывающей молекуле к GСС, как описано в данном документе (например, sdAb или CAR), для применения при лечении заболевания. Данное изобретение также относится к антигенсвязывающей молекуле к GСС, как описано в данном документе (например, sdAb или CAR), для применения при лечении рака. Данное изобретение также относится к антигенсвязывающей молекуле к GСС, как описано в данном документе (например, sdAb или CAR), для применения в производстве лекарственного средства для лечения рака.

**[0381]** Введение композиций, описанных в данном документе, можно осуществлять любым удобным способом, включая аэрозольную ингаляцию, инъекцию, пероральный прием, трансфузию, имплантацию или трансплантацию. Композиции, описанные в данном документе, можно вводить пациенту трансартериально, подкожно, внутривенно, внутриопухолево, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной (в/в) инъекции или внутривенно. В одном варианте осуществления композиции, описанные в данном документе, например, содержащие экспрессирующую CAR клетку, вводят пациенту посредством интрадермальной или подкожной инъекции. В одном варианте осуществления композиции, описанные в данном документе, например, содержащие экспрессирующую CAR клетку, вводят путем в/в инъекции. Композиции, описанные в данном документе, например, содержащие экспрессирующую CAR клетку, можно вводить непосредственно в опухоль, лимфатический узел или место инфекции.

**[0382]** В целом можно утверждать, что фармацевтическую композицию, содержащую описанные в данном документе иммунные эффекторные клетки, можно вводить в дозе от  $10^4$  до  $10^9$  клеток/кг массы тела, в некоторых случаях от  $10^5$  до  $10^6$  клеток/кг массы тела, включая все целые значения в этих диапазонах. Композиции иммунных эффекторных клеток также можно вводить многократно в этих дозировках.

Клетки могут вводиться с помощью методов инфузии, которые широко известны в области иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988).

**[0383]** В определенных аспектах может быть желательным введение субъекту активированных иммунных эффекторных клеток, а затем повторный забор крови (или проведение афереза), активация полученных из нее клеток в соответствии с настоящим изобретением и повторное введение пациенту этих активированных и размноженных клеток. Этот процесс может выполняться несколько раз каждые несколько недель. В определенных аспектах клетки могут быть активированы при заборе крови объемом от 10 до 400 см<sup>3</sup>. В некоторых аспектах клетки активируют при заборе крови объемом 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 см<sup>3</sup>.

**[0384]** В некоторых вариантах осуществления CAR к GCS экспрессируется на донорских клетках. В некоторых вариантах осуществления донорские Т-клетки для применения в Т-клеточной терапии получают от пациента (например, для аутологичной Т-клеточной терапии). В других вариантах осуществления донорские Т-клетки для применения в Т-клеточной терапии получают от субъекта, который не является пациентом, (например, аллогенная Т-клеточная терапия). CAR<sup>+</sup> Т-клетки можно вводить в терапевтически эффективном количестве. Например, терапевтически эффективное количество Т-клеток может составлять по меньшей мере около 10<sup>4</sup> клеток, по меньшей мере около 10<sup>5</sup> клеток, по меньшей мере около 10<sup>6</sup> клеток, по меньшей мере около 10<sup>7</sup> клеток, по меньшей мере около 10<sup>8</sup> клеток, по меньшей мере около 10<sup>9</sup> или не менее по меньшей мере около 10<sup>10</sup>.

**[0385]** В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество Т-клеток составляет около 10<sup>4</sup> клеток, около 10<sup>5</sup> клеток, около 10<sup>6</sup> клеток, около 10<sup>7</sup> клеток или около 10<sup>8</sup> клеток. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество CAR Т-клеток составляет около 2 X 10<sup>6</sup> клеток/кг, около 3 X 10<sup>6</sup> клеток/кг, около 4 X 10<sup>6</sup> клеток/кг, около 5 X 10<sup>6</sup> клеток/кг, около 6 X 10<sup>6</sup> клеток/кг, около 7 X 10<sup>6</sup> клеток/кг, около 8 X 10<sup>6</sup> клеток/кг, около 9 X 10<sup>6</sup> клеток/кг, около 1 X 10<sup>7</sup> клеток/кг, около 2 X 10<sup>7</sup> клеток/кг, около 3 X 10<sup>7</sup> клеток/кг, около 4 X 10<sup>7</sup> клеток/кг, около 5 X 10<sup>7</sup> клеток/кг, около 6 X 10<sup>7</sup> клеток/кг, около 7 X 10<sup>7</sup> клеток/кг, около 8 X 10<sup>7</sup> клеток/кг, или около 9 X 10<sup>7</sup> клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток составляет от около 1 X 10<sup>6</sup> до около 2 X 10<sup>6</sup> CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток на кг массы тела до максимальной дозы около 1 x 10<sup>8</sup> CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток.

**[0386]** В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток составляет от около  $0,25 \times 10^6$  до  $2 \times 10^6$ . В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток составляет около  $0,25 \times 10^6$ ,  $0,3 \times 10^6$ ,  $0,4 \times 10^6$ , около  $0,5 \times 10^6$ , около  $0,6 \times 10^6$ , около  $0,7 \times 10^6$ , около  $0,8 \times 10^6$ , около  $0,9 \times 10^6$ , около  $1,0 \times 10^6$ , около  $1,1 \times 10^6$ , около  $1,2 \times 10^6$ , около  $1,3 \times 10^6$ , около  $1,4 \times 10^6$ , около  $1,5 \times 10^6$ , около  $1,6 \times 10^6$ , около  $1,7 \times 10^6$ , около  $1,8 \times 10^6$ , около  $1,9 \times 10^6$ , или около  $2,0 \times 10^6$  CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток.

**[0387]** В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток составляет от около  $0,4 \times 10^8$  до около  $2 \times 10^8$  CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток составляет около  $0,4 \times 10^8$ , около  $0,5 \times 10^8$ , около  $0,6 \times 10^8$ , около  $0,7 \times 10^8$ , около  $0,8 \times 10^8$ , около  $0,9 \times 10^8$ , около  $1,0 \times 10^8$ , около  $1,1 \times 10^8$ , около  $1,2 \times 10^8$ , около  $1,3 \times 10^8$ , около  $1,4 \times 10^8$ , около  $1,5 \times 10^8$ , около  $1,6 \times 10^8$ , около  $1,7 \times 10^8$ , около  $1,8 \times 10^8$ , около  $1,9 \times 10^8$ , или около  $2,0 \times 10^8$  CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток.

**[0388]** В некоторых вариантах осуществления доза экспрессирующих CAR клеток (например, экспрессирующих CAR клеток, описанных в данном документе, например, клетки, экспрессирующие CAR к GCC, описанные в данном документе) содержат от около  $1 \times 10^6$  клеток/м<sup>2</sup> до около  $1 \times 10^9$  клеток/м<sup>2</sup>, например, от около  $1 \times 10^7$  клеток/м<sup>2</sup> до около  $5 \times 10^8$  клеток/м<sup>2</sup>, например, около  $1,5 \times 10^7$  клеток/м<sup>2</sup>, около  $2 \times 10^7$  клеток/м<sup>2</sup>, около  $4,5 \times 10^7$  клеток/м<sup>2</sup>, около  $10^8$  клеток/м<sup>2</sup>, около  $1,2 \times 10^8$  клеток/м<sup>2</sup> или около  $2 \times 10^8$  клеток/м<sup>2</sup>.

**[0389]** Раскрытие включает (среди прочего) тип клеточной терапии, при котором Т-клетки генетически модифицируют для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), и CAR-Т-клетки вводят нуждающемуся в этом реципиенту. Вводимая клетка способна уничтожать опухолевые клетки у реципиента. В отличие от терапии антителами, CAR-модифицированные Т-клетки способны реплицироваться *in vivo*, что приводит к долговременной персистенции, что может привести к устойчивому контролю над опухолью. В различных аспектах вводимые пациенту Т-клетки сохраняются у пациента в течение по меньшей мере четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, десяти месяцев, одиннадцати месяцев, двенадцати месяцев, тринадцати месяцев, четырнадцати месяцев, пятнадцати месяцев, шестнадцати месяцев, семнадцати месяцев, восемнадцати месяцев, девятнадцати месяцев, двадцати

месяцев, двадцати одного месяца, двадцати двух месяцев, двадцати трех месяцев, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет после введения Т-клетки пациенту.

**[0390]** В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR к GCC, вводят в виде множества доз, например, первой дозы, второй дозы и, необязательно, третьей дозы. В вариантах осуществления способ включает лечение субъекта (например, взрослого субъекта), имеющего рак (например, колоректальный рак), включающий введение субъекту первой дозы, второй дозы и, необязательно, одной или более дополнительных доз, причем каждая доза включает иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие молекулу CAR, например, молекулу CAR к GCC, например, молекулу CAR, представленную в таблице 7.

**[0391]** В вариантах осуществления способ включает введение дозы  $2-5 \times 10^6$  жизнеспособных экспрессирующих CAR клеток/кг, при этом субъект имеет массу тела менее 50 кг; или введение дозы  $1,0-2,5 \times 10^8$  жизнеспособных клеток, экспрессирующих CAR, при этом субъект имеет массу тела по меньшей мере 50 кг.

**[0392]** В вариантах осуществления субъекту, например, педиатрическому субъекту или взрослому субъекту, вводят однократную дозу.

**[0393]** В вариантах осуществления дозы вводят в последовательные дни, например, первую дозу вводят в 1 день, вторую дозу вводят на 2 день, а необязательную третью дозу (если вводят) вводят на 3 день.

**[0394]** В вариантах осуществления вводят четвертую, пятую или шестую дозу или более доз.

**[0395]** В вариантах осуществления первая доза составляет около 10% от общей дозы, вторая доза составляет около 30% от общей дозы, а третья доза составляет около 60% от общей дозы, при этом вышеупомянутые проценты составляют в сумме 100%. В вариантах осуществления первая доза составляет около 9-11%, 8-12%, 7-13% или 5-15% от общей дозы. В вариантах осуществления вторая доза составляет около 29-31%, 28-32%, 27-33%, 26-34%, 25-35%, 24-36%, 23-37%, 22-38%, 21-39%, или 20-40% от общей дозы. В вариантах осуществления третья доза составляет около 55-65%, 50-70%, 45-75% или 40-80% от общей дозы. В вариантах осуществления общая доза относится к общему количеству жизнеспособных экспрессирующих CAR клеток, вводимых в течение 1 недели, 2 недель, 3 недель или 4 недель. В некоторых вариантах осуществления, когда вводят две дозы, общая доза относится к сумме количества жизнеспособных экспрессирующих CAR клеток, введенных субъекту в первой и второй дозах. В некоторых вариантах осуществления, когда

вводят три дозы, общая доза относится к сумме количества жизнеспособных экспрессирующих CAR клеток, введенных субъекту в первой, второй и третьей дозах.

**[0396]** В вариантах осуществления доза измеряется в соответствии с количеством жизнеспособных экспрессирующих CAR клеток. Экспрессию CAR можно измерить, например, с помощью проточной цитометрии с использованием молекулы антитела, которая связывает молекулу CAR, и обнаруживаемой метки. Жизнеспособность можно измерить, например, с помощью Cellometer.

**[0397]** Данное изобретение также включает тип клеточной терапии, при котором иммунные эффекторские клетки, например, NK-клетки или Т-клетки, модифицируют, например, с помощью РНК, транскрибируемой *in vitro*, для транзientной экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) и CAR-экспрессирующих (например, CART) вводят нуждающемуся в этом реципиенту. Вводимая клетка способна уничтожить раковые клетки у реципиента. Таким образом, в различных аспектах экспрессирующие CAR клетки, например, Т-клетки, вводимые пациенту, присутствуют в течение менее одного месяца, например, трех недель, двух недель, одной недели, после введения экспрессирующей CAR клетки, например, Т-клетки, пациенту.

**[0398]** Без привязки к какой-либо конкретной теории противораковый иммунный ответ, вызываемый CAR-модифицированными Т-клетками, может представлять собой активный или пассивный иммунный ответ или, альтернативно, может быть обусловлен прямым или непрямым иммунным ответом. В одном аспекте Т-клетки, трансдуцированные CAR (например, GCC - CAR), проявляют специфическую секрецию провоспалительных цитокинов и мощную цитолитическую активность в ответ на раковые клетки человека, экспрессирующие антиген-мишень (например, GCC), противостоят ингибированию растворимым антигеном-мишенью, опосредуют неспецифический цитолиз и опосредуют регрессию сформированного рака человека. Например, не содержащие антиген раковые клетки в гетерогенном поле рака, экспрессирующего антиген-мишень, могут быть подвержены непрямому разрушению Т-клетками, перенаправленными на антиген-мишень, которые ранее оказывали противодействие смежным антиген-положительным раковым клеткам.

**[0399]** В одном аспекте изобретение описывает способ лечения рака у субъекта. Способ включает введение субъекту терапии, которая включает введение клетки, экспрессирующей CAR, (например, клетки, экспрессирующей CAR к GCC), таким образом, что у субъекта излечивается рак. В одном варианте осуществления терапия экспрессирующей CAR клеткой (например, клетки, экспрессирующей CAR к GCC),

описанной в данном документе, приводит к одному или более из следующего: улучшенная или повышенная противоопухолевая активность экспрессирующей CAR клетки (например, клетки, экспрессирующей CAR к GCS); повышенная пролиферация или персистенция экспрессирующих CAR клеток; улучшенная или повышенная инфильтрация экспрессирующей CAR клетки; улучшенное ингибирование прогрессирования опухоли; задержка прогрессирования опухоли; ингибирование или снижение пролиферации раковых клеток; и/или уменьшение опухолевой массы, например, объема или размера опухоли. В одном варианте осуществления терапия приводит к повышенной персистенции экспрессирующих CAR клеток и/или повышенной персистенции экспрессирующих CAR клеток и снижению, например, снижению риска рецидива.

**[0400]** Настоящее изобретение относится к способам ингибирования пролиферации или уменьшения популяции клеток, экспрессирующих антиген (например, экспрессирующих GCS). В одном варианте осуществления способы включают проведение CAR-терапии (например, популяции клеток, экспрессирующих CAR). В определенных вариантах осуществления терапия, описанная в данном документе, снижает численность, число, количество или процент клеток и/или раковых клеток на по меньшей мере 5%, 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% у субъекта с или на животной модели антигена (например, GCS) или другого рака, связанного с экспрессирующими антиген (например, экспрессирующими GCS) клетками по отношению к численности, количеству, числу или проценту клеток и/или раковых клеток у субъекта, получавшего другую противораковую терапию. В одном варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

**[0401]** Изобретение также предоставляет способы профилактики, лечения и/или контроля нарушения, например, нарушения, связанного с экспрессирующими антиген клетками (например, экспрессирующими GCS клетками) (например, рака, описанного в данном документе), при этом способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту экспрессирующих CAR клеток (например, клеток, экспрессирующих CAR к GCS, популяции экспрессирующих CAR клеток). В одном аспекте субъект представляет собой человека.



**[0402]** В одном аспекте изобретение относится к способу ингибирования роста раковой клетки (например, раковой клетки, экспрессирующей антиген, например, экспрессирующей GCC), включающему приведение раковой клетки в контакт с экспрессирующей CAR клеткой (например, клеткой, экспрессирующей CAR к GCC), например, Т-клеткой с CAR к GCC, описанной в данном документе, так что CART активируется в ответ на антиген и нацеливается на раковую клетку, при этом рост рака ингибируется.

**[0403]** В настоящем изобретении также предложены способы профилактики, лечения и/или контроля заболевания, например, заболевания, ассоциированного с экспрессирующими антиген (например, экспрессирующими GCC) клетками, (например, рака, экспрессирующего антиген, например, GCC), при этом способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту клетки, экспрессирующей CAR, (например, экспрессирующей CAR к GCC), которая связывается с экспрессирующей антиген клеткой. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

**[0404]** В настоящем изобретении также предложены способы профилактики, лечения и/или контроля заболевания, ассоциированного с экспрессирующими антиген (например, экспрессирующими GCC) клетками, причем способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту CART-клетки (например, Т-клетки с CAR к GCC) по изобретению, которая связывается с экспрессирующей антиген (например, экспрессирующей GCC) клеткой. В одном аспекте субъект представляет собой человека.

**[0405]** В настоящем изобретении также предложены способы предотвращения рецидива рака, например, ассоциированного с экспрессирующими антиген (например, экспрессирующими GCC) клетками, причем способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту CART-клетки (например, Т-клетки с CAR к GCC) по изобретению, который связывается с экспрессирующей антиген (например, экспрессирующей GCC) клеткой. В одном аспекте способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества CART-клеток (например, Т-клеток с CAR к GCC), описанных в данном документе, которые связываются с экспрессирующей антиген (например, экспрессирующей GCC) клеткой в сочетании с эффективным объемом другой терапии.

**[0406]** Вариант осуществления дополнительно включает лимфодеплецию млекопитающего перед введением CAR, раскрытых в данном документе. Примеры лимфодеплеции включают, но не ограничиваются ими, немиелоаблативную лимфодеплетирующую химиотерапию, миелоаблативную лимфодеплетирующую химиотерапию, тотальное облучение тела и т. д.

**[0407]** В конкретном иллюстративном аспекте субъект может подвергаться лейкаферезу, при этом лейкоциты собирают, обогащают или деплецируют *ex vivo*, чтобы отобрать и/или выделить представляющие интерес клетки, например, Т-клетки. Такие Т-клеточные изоляты могут быть размножены известными в данной области техники способами и обработаны таким образом, что может быть введена одна или более конструкций CAR по настоящему изобретению, таким образом, создавая CAR-Т-клетку по настоящему изобретению. Нуждающиеся в этом субъекты могут впоследствии подвергаться стандартному лечению высокодозной химиотерапией с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В некоторых аспектах после трансплантации или одновременно с ней субъектам выполняют инфузию размноженных экспрессирующих CAR клеток по настоящему изобретению. В дополнительном аспекте размноженные клетки вводят до операции или после нее.

**[0408]** Для целей способов, в которых вводят клетки-хозяева или популяции клеток, клетки могут быть клетками, которые являются аллогенными или аутологичными по отношению к млекопитающему. Предпочтительно клетки являются аутологичными для млекопитающего. В контексте данного документа термин «аллогенный» означает любой материал, полученный от другого животного того же вида, что и индивид, которому вводится этот материал. Считается, что два или более индивидов являются аллогенными по отношению друг к другу, когда гены в одном или более локусов не являются идентичными. В некоторых аспектах аллогенный материал, полученный от индивидов одного и того же вида, может достаточно отличаться генетически для антигенного взаимодействия. В контексте данного документа термин «аутологичный» означает любой материал, полученный от того же индивида, в организм которого он позже будет повторно введен.

**[0409]** Упомянутое в данном документе млекопитающее может быть любым млекопитающим. В контексте данного документа термин «млекопитающее» относится к любому млекопитающему, включая, но не ограничиваясь этим, млекопитающих отряда Rodentia, таких как мыши и хомяки, и млекопитающих отряда Logomorpha, таких как кролики. Млекопитающие могут быть из отряда Carnivora, включая Felines (кошки) и Canines (собаки). Млекопитающие могут быть из отряда Artiodactyla, включая крупного рогатого скота (коровы) и свиней (свиньи), или отряда Perssodactyla, включая лошадиных (лошади). Млекопитающие могут относиться к отряду Primates, Ceboids, или Simoids (обезьяны) или отряду Anthropoids (люди и человекообразные обезьяны). В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой человека.

**[0410]** Что касается способов, рак может представлять собой любое раковое заболевание, включая любую из следующего: острый лимфоцитарный рак, острый миелоидный лейкоз, альвеолярную рабдомиосаркому, рак мочевого пузыря (например, карцинома мочевого пузыря), рак кости, рак головного мозга (например, медуллобластома), рак молочной железы, рак ануса, анального канала, или аноректума, рак глаза, рак внутрипеченочных желчных протоков, рак суставов, рак шеи, желчного пузыря или плевры, рак носа, носовой полости или среднего уха, рак ротовой полости, рак вульвы, хронический лимфолейкоз, хронический миелоидный лейкоз, рак толстой кишки, рак пищевода, рак шейки матки, фибросаркому, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), лимфома Ходжкина, рак гортаноглотки, рак почки, рак гортани, лейкоз, гемобластоз, рак печени, рак легкого (например, немелкоклеточная карцинома легкого и аденокарцинома легкого), лимфома, мезотелиома, мастоцитомы, меланома, множественная миелома, рак носоглотки, неходжкинская лимфома, В-хронический лимфолейкоз, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), лимфома Беркитта, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак брюшины, сальника, и рак брыжейки, рак глотки, рак предстательной железы, рак прямой кишки, рак почки, рак кожи, рак тонкой кишки, рак мягких тканей, солидные опухоли, синовиальная саркома, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы и рак мочевого пузыря.

**[0411]** В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудка. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой колоректальный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления рак имеет аномальную экспрессию GCS.

**[0412]** Термины «лечение» и «предотвращать», а также слова, производные от них, используемые в данном документе, не обязательно подразумевают 100% или полное излечение или предотвращение. Скорее, существуют различные степени лечения или предотвращения, которые специалисты в данной области техники расценивают как имеющие потенциальную пользу или терапевтический эффект. В этом отношении способы могут обеспечить любой объем или любую степень эффективности лечения или предотвращения рака у млекопитающего.

**[0413]** Кроме того, лечение или предотвращение, обеспечиваемые данным способом, могут включать лечение или предотвращение одного или более патологических

состояний или симптомов заболевания, например, рака, подлежащего лечению или профилактике. Кроме того, для целей данного документа «предотвращение» может включать отсрочку дебюта заболевания или его симптома или патологического состояния.

**[0414]** В еще одном варианте осуществления предложен способ обнаружения рака у млекопитающего, включающий: (а) приведение в контакт образца, содержащего одну или более клеток млекопитающего, с CAR, нуклеиновыми кислотами, рекомбинантными векторами экспрессии, клетками-хозяевами, популяцией клеток, антителами и/или их антигенсвязывающими частями или фармацевтическими композициями, тем самым образуя комплекс, (b) и обнаружение комплекса, причем обнаружение комплекса свидетельствует о наличии рака у млекопитающего. В некоторых вариантах приведение в контакт может осуществлять *in vitro* или *in vivo* в отношении млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт осуществляют *in vitro*.

**[0415]**

**[0416]** Образец может быть получен любым подходящим способом, например, биопсией или аутопсией. Биопсия представляет собой забор тканей и/или клеток у индивида. Такой забор может заключаться в сборе тканей и/или клеток у индивида для проведения экспериментов с извлеченными тканями и/или клетками. Это экспериментирование может включать эксперименты по определению того, есть ли у индивида и/или страдает ли он от определенного патологического состояния или болезненного состояния. Патологическое состояние или заболевание может представлять собой, например, рак.

**[0417]** Что касается варианта осуществления способа обнаружения наличия пролиферативного нарушения, например, рака, у млекопитающего, образец, содержащий клетки млекопитающего, может представлять собой образец, содержащий целые клетки, их лизаты или фракцию лизатов целых клеток, например, ядерную или цитоплазматическую фракцию, полную фракцию белков или фракцию нуклеиновой кислоты. Если образец содержит целые клетки, эти клетки могут быть любыми клетками млекопитающего, например, клетками любого органа или ткани, включая клетки крови или эндотелиальные клетки.

**[0418]** Кроме того, обнаружение комплекса может происходить любым количеством способов, известных в данной области техники. Например, описанные в данном документе CAR, полипептиды, белки, нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, клетки-хозяева, популяции клеток или антитела или их антигенсвязывающие части,

описанные в данном документе, могут быть помечены обнаруживаемой меткой, такой как, например, радиоизотоп, флуорофор (например, флуоресцеинизотиоцианат (FITC), фикоэритрин (PE)), фермент (например, щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена) и частицы элемента (например, частицы золота), как описано выше.

**[0419]** Способы тестирования CAR на способность распознавать клетки-мишени и антигенную специфичность известны в данной области техники. Например, в Clay et al., *J. Immunol*, 163: 507-513 (1999) описаны способы измерения высвобождения цитокинов (например, интерферона- $\gamma$ , гранулоцитарного/моноцитарного колониестимулирующего фактора (GM-CSF), фактора некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) или интерлейкина 2 (IL-2)). Кроме того, функцию CAR можно оценить путем измерения клеточной цитотоксичности, как описано в Zhao et al., *J. Immunol*, 174: 4415-4423 (2005).

**[0420]** В другом варианте осуществления предложено применение CAR, нуклеиновых кислот, рекомбинантных векторов экспрессии, клеток-хозяев, популяций клеток, антител или их антигенсвязывающих частей и/или фармацевтических композиций по изобретению для лечения или профилактики пролиферативного нарушения, например, рака у млекопитающего. рак может быть любым из описанных в данном документе раком.

**[0421]** Для описанных терапевтических агентов можно использовать любой способ введения, включая местное и системное введение. Например, можно использовать местное, пероральное, внутрисосудистое, такое как внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, интраназальное, интрадермальное, интратекальное и подкожное введение. Конкретный способ применения и режим дозирования выбираются лечащим врачом с учетом особенностей конкретного случая (например, субъект, заболевание, сопутствующее болезненное состояние и является ли лечение профилактическим). В случаях, когда вводят более одного агента или композиции, можно использовать один или более путей введения; например, химиотерапевтический агент можно вводить перорально, а антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат, или композицию можно вводить внутривенно. Способы введения включают инъекции, для которых CAR, CAR-T-клетки, конъюгаты, антитела, антигенсвязывающие фрагменты или композиции предложены в нетоксичном фармацевтически приемлемом носителе, таком как вода, солевой раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы, 5% сывороточный альбумин человека, нелетучие масла, этилолеат или липосомы. В некоторых вариантах осуществления можно использовать местное введение описанных соединений, например, путем нанесения антитела или антигенсвязывающего фрагмента на область ткани, из которой была удалена опухоль, или на область, предположительно предрасположенную к

развитию опухоли. В некоторых вариантах осуществления замедленное внутриопухолевое (или околоопухолевое) высвобождение фармацевтического препарата, который включает терапевтически эффективное количество антитела или антигенсвязывающего фрагмента, может быть полезным. В других примерах конъюгат наносят в виде глазных капель местно на роговицу или интравитреально в глаз.

**[0422]** Описанные терапевтические агенты могут быть получены в виде единичных лекарственных форм, подходящих для индивидуального введения точных доз. Кроме того, описанные терапевтические агенты можно вводить в виде однократной дозы или в виде многократных доз. Схема введения многократных доз представляет собой схему, при которой первичный курс лечения может состоять из более чем одной отдельной дозы, например, 1-10 доз, за которыми следуют другие дозы, вводимые через последующие интервалы времени, необходимые для поддержания или усиления действия композиций. Лечение может включать ежедневные или многократные ежедневные дозы соединения(-й) в течение периода от нескольких дней до месяцев или даже лет. Таким образом, режим дозирования также будет, по меньшей мере частично, определяться на основе конкретных потребностей субъекта, подлежащего лечению, и будет зависеть от решения лечащего врача.

**[0423]** В одном варианте осуществления CAR вводят в иммунные эффекторные клетки, например, используя транскрипцию *in vitro*, и субъекту (например, человеку) проводят начальное введение экспрессирующих CAR клеток по изобретению и одно или более последующих введений экспрессирующих CAR клеток по изобретению, где одно или более последующих введений выполняют менее чем через 15 дней, например, через 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения. В одном варианте осуществления субъекту (например, человеку) выполняют более одного введения экспрессирующих CAR клеток по изобретению в неделю, например, 2, 3 или 4 введения экспрессирующих CAR клеток по изобретению в неделю. В одном варианте осуществления субъект (например, субъект-человек) получает более одного введения экспрессирующих CAR клеток в неделю (например, 2, 3 или 4 введения в неделю) (также именуемый в данном документе циклом), за которым следует неделя без введения экспрессирующих CAR клеток, а затем субъекту выполняют одно или более дополнительных введений экспрессирующих CAR клеток (например, более одного введения экспрессирующих CAR клеток в неделю). В другом варианте осуществления субъект (например, субъект-человек) получает более одного цикла экспрессирующих CAR клеток, и время между каждым циклом составляет менее 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 дней. В

одном варианте осуществления экспрессирующие CAR клетки вводят через день 3 раза в неделю. В одном варианте осуществления экспрессирующие CAR клетки по изобретению вводят в течение по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или более недель.

**[0424]** Иллюстративные дозы антител или конъюгатов могут находиться в диапазоне от около 0,01 до около 30 мг/кг, например, от около 0,1 до около 10 мг/кг.

**[0425]** В конкретных примерах субъекту вводят терапевтическую композицию, которая включает один или более конъюгатов, антител, композиций, CAR, CAR T-клеток или дополнительных агентов, по схеме многократного ежедневного дозирования, например, по меньшей мере два дня подряд, 10 дней подряд дней и так далее, например, в течение нескольких недель, месяцев или лет. В одном примере субъекту вводят конъюгаты, антитела, композиции или дополнительные агенты в течение периода по меньшей мере 30 дней, например, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 24 месяца или по меньшей мере 36 месяцев.

**[0426]** В некоторых вариантах осуществления раскрытые способы включают хирургическое вмешательство, лучевую терапию и/или химиотерапию субъекту в сочетании с раскрытым антителом, антигенсвязывающим фрагментом, конъюгатом, CAR или T-клеткой, экспрессирующей CAR, (например, последовательно, по существу одновременно, или одновременно). Способы и терапевтические дозы таких агентов и способов лечения известны специалистам в данной области техники и могут быть определены квалифицированным клиницистом. Схемы приготовления и дозирования дополнительного агента могут быть использованы в соответствии с инструкциями производителя или же по определению практикующего специалиста. Схемы подготовки и дозирования для такой химиотерапии также описаны в *Chemotherapy Service*, (1992) Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

**[0427]** В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия может включать введение субъекту терапевтически эффективного количества дополнительного ингибитора рака. Неограничивающие примеры дополнительных терапевтических агентов, которые можно использовать с комбинированной терапией, включают агенты, связывающие микротрубочки, интеркаляторы ДНК или сшивающие ДНК агенты, ингибиторы синтеза ДНК, ингибиторы транскрипции ДНК и РНК, антитела, ферменты, ингибиторы ферментов, регуляторы генов, и ингибиторы ангиогенеза. Эти агенты (которые вводят в терапевтически эффективном количестве) и способы лечения можно использовать

по отдельности или в комбинации. Например, любой подходящий противораковый или антиангиогенный агент можно вводить в комбинации с CAR, CAR-T-клетками, антителами, антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатами, описанными в данном документе. Способы и терапевтические дозы таких агентов известны специалистам в данной области техники и могут быть определены квалифицированным клиницистом.

**[0428]** Дополнительные химиотерапевтические агенты включают, помимо прочего, алкилирующие агенты, такие как азотистые иприты (например, хлорамбуцил, хлорметин, циклофосфамид, ифосфамид и мелфалан), нитрозомочевины (например, кармустин, фотемустин, ломустин и стрептозоцин), соединения платины (например, карбоплатин, цисплатин, оксалиплатин и BBR3464), бусульфан, дакарбазин, мехлорэтамин, прокарбазин, темозоломид, тиотепа и урамустин; антиметаболиты, такие как фолиевая кислота (например, метотрексат, пеметрексед и ралтитрексед), пурины (например, кладрибин, клофарабин, флударабин, меркаптопурин и тиогуанин), пиримидин (например, капецитабин), цитарабин, фторурацил и гемцитабин; растительные алкалоиды, такие как подофиллум (например, этопозид и тенипозид), таксан (например, доцетаксел и паклитаксел), барвинок (например, винбластин, винкристин, виндезин и винорелбин); цитотоксические/противоопухолевые антибиотики, такие как члены семейства антрациклинов (например, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, идарубицин, митоксантрон и валрубицин), блеомицин, рифампицин, гидроксимочевину и митомицин; ингибиторы топоизомеразы, такие как топотекан и иринотекан; моноклональные антитела, такие как алемтузумаб, бевацизумаб, цетуксимаб, гемтузумаб, ритуксимаб, панитумумаб, пертузумаб и трастузумаб; фотосенсибилизаторы, такие как аминолевулиновая кислота, метиламинолевулинат, порфирин натрия и вертепорфин; и другие агенты, такие как алитретиноин, алтретамин, амсакрин, анагрелид, триоксид мышьяка, аспарагиназа, акситиниб, бексаротен, бевацизумаб, бортезомиб, целекоксиб, денилейкин дифтитокс, эрлотиниб, эстрамустин, gefitinib, гидроксикарбамид, иматиниб, лапатиниб, пазопаниб, пентостатин мазопрокол, митоган, пегаспаргаза, тамоксифен, сорафениб, сунитиниб, вемурафиниб, вандетаниб и третиноин. Выбор и терапевтические дозы таких агентов известны специалистам в данной области техники и могут быть определены квалифицированным клиницистом.

**[0429]** Общие химиотерапевтические агенты, рассматриваемые для использования в комбинированной терапии, включают анастрозол (Arimidex®), бикалутамид (Casodex®), сульфат блеомицина (Blenoxane®), бусульфан (Myleran®), бусульфан для инъекций (Busulfex®), капецитабин (Xeloda®), N4-пентоксикарбонил-5-дезоксид-5-фторцитидин,



карбоплатин (Paraplatin®), кармустин (BiCNU®), хлорамбуцил (Leukeran®), цисплатин (Platinol®), кладрибин (Leustatin®), циклофосфамид (Cytoxan® или Neosar®), цитарабин, цитозинарабинозид (Cytosar-U®), липосомную инъекцию цитарабин (DepoCyt®), дакарбазин (DTIC-Dome®), дактиномицин (Actinomycin D, Cosmegen), даунорубицина гидрохлорид (Cerubidine®), даунорубицин цитрат в виде липосом для инъекций (DaunoXome®), дексаметазон, доцетаксел (Taxotere®), доксорубицина гидрохлорид (Adriamycin®, Rubex®), этопозид (Vepesid®), флударабина фосфат (Fludara®), 5-фторурацил (Adrucil®, Efudex®), флутамид (Eulexin®), тезацитибин, гемцитабин (дифтордезоксцитидин), гидроксимочевину (Hydrea®), идарубицин (Idamycin®), ифосфамид (IFEX®), иринотекан (Camptosar®), L-аспарагиназу (ELSPAR®), лейковорин кальция, мелфалан (Alkeran®), 6-меркаптопурин (Purinethol®), метотрексат (Folex®), митоксантрон (Novantrone®), милотарг, паклитаксел (Taxol®), феникс (Yttrium90/MX-DTPA), пентостатин, полифепросан 20 с имплантатом из кармустина (Gliadel®), тамоксифена цитрат (Nolvadex®), тенипозид (Vumon®), 6-тиогуанин, тиотепа, тирапазамин (Tirazone®), топотекана гидрохлорид для инъекции (Nuscampitin®), винбластин (Velban®), винкристин (Oncovin®) и винорелбин (Navelbine®).

**[0430]** Примеры алкилирующих агентов раскрыты на страницах 270-271 международной заявки WO 2016/164731, поданной 8 апреля 2016 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки. Другие примеры включают, без ограничений, производные азотистого иприта, производные этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены: урамустин (Aminouracil Mustard®, Chlorethaminacil®, Demethyldopan®, Desmethyldopan®, Haemanthamine®, Nordopan®, Uracil Nitrogen Mustard®, Uracillost®, Uracilmostaza®, Uramustin®, Uramustine®), хлорметин (Mustargen®), циклофосфамид (Cytoxan®, Neosar®, Clafen®, Endoxan®, Procytox®, Revimmune™), ифосфамид (Mitoxana®), мелфалан (Alkeran®), хлорамбуцил (Leukeran®), пипоброман (Amedel®, Vercyte®), триэтиленмеламин (Hemel®, Hexalen®, Hexastat®), триэтилтиофосфорамин, темозоломид (Temodar®), тиотепа (Thioplex®), бусульфан (Busilvex®, Myleran®), кармустин (BiCNU®), ломустин (CeeNU®) и стрептозоцин (Zanosar®) и дакарбазин (DTIC-Dome®). Дополнительные иллюстративные алкилирующие агенты включают, без ограничения, оксалиплатин (Eloxatin®); темозоломид (Temodar® и Temodal®); дактиномицин (также известный как актиномицин-D, Cosmegen®); мелфалан (также известный как L-ПАМ, L-сарколизин и фенилаланиновый иприт, Alkeran®); альтретамин (также известный как гексаметилмеламин (НММ), Hexalen®); кармустин (BiCNU®); бендамустин (Treanda®); бусульфан (Busulfex® и Myleran®); карбоплатин (Paraplatin®); ломустин (также известный как CCNU, CeeNU®); цисплатин (также

известный как CDDP, Platinol® и Platinol®-AQ); хлорамбуцил (Leukeran®); циклофосфамид (Cytoxan® и Neosar®); дакарбазин (также известный как DTIC, DIC и имидазолкарбоксамид, DTIC-Dome®); альтретамин (также известный как гексаметилмеламин (HMM), Hexalen®); ифосфамид (Ifex®); преднумустин; прокарбазин (Matulane®); мехлорэтамиин (также известный как азотистый иприт, мустин и гидрохлорид мехлорэтамина, Mustargen®); стрептозоцин (Zanosar®); тиотепу (также известный как тиофосфамид, TESPА и TSPA, Thioplex®); циклофосфамид (Endoxan®, Cytoxan®, Neosar®, Procytox®, Revimmune®); и бендамустин HCl (Treanda®).

**[0431]** Иллюстративные агенты на основе платины включают, без ограничения, карбоплатин, цисплатин и оксалиплатин.

**[0432]** Примеры ингибиторов ангиогенеза включают, без ограничения, А6 (Angstrom Pharmaceuticals), АВТ-510 (Abbott Laboratories), АВТ-627 (Atrasentan) (Abbott Laboratories/Xinlay), АВТ-869 (Abbott Laboratories), актимид (CC4047, Pomalidomide) (Celgene Corporation), AdGVPEDF.IID (GenVec), ADH-1 (Exherin) (Adherex Technologies), АЕЕ788 (Novartis), AG-013736 (акситиниб) (Pfizer), AG3340 (приномастат) (Agouron Pharmaceuticals), AGX1053 (AngioGenex), AGX51 (AngioGenex), ALN-VSP (ALN-VSP 02) (Alnylam Pharmaceuticals), AMG 386 (Amgen), AMG706 (Amgen), апатиниб (YN968D1) (Jiangsu Hengrui Medicine), AP23573 (ридафоролимуc/MK8669) (Ariad Pharmaceuticals), AQ4N (Novavea), ARQ 197 (ArQule), ASA404 (Novartis/Antisoma), атипримод (Callisto Pharmaceuticals), ATN-161 (Attenuon), AV-412 (Aveo Pharmaceuticals), AV-951 (Aveo Pharmaceuticals), авастин (бевацизумаб) (Genentech), AZD2171 (цедираниб/рецентин) (AstraZeneca), BAY 57-9352 (телатиниб) (Bayer), BEZ235 (Novartis), BIBF1120 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals), BIBW 2992 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals), BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb), BMS-582664 (бриваниб) (Bristol-Myers Squibb), BMS-690514 (Bristol-Myers Squibb), кальцитриол, CCI-779 (Torisel) (Wyeth), CDP-791 (ImClone Systems), цефлатонин (гомохаррингтонин/ННТ) (ChemGenex Therapeutics), целебрекс (целекоксиб) (Pfizer), CEP-7055 (Cephalon/Sanofi), CHIR-265 (Chiron Corporation), NGR-TNF, COL-3 (Metastat) (Collagenex Pharmaceuticals), комбретаcтатин (Oxigene), CP-751, 871 (фигитумумаб) (Pfizer), CP-547,632 (Pfizer), CS-7017 (Daiichi Sankyo Pharma), CT-322 (ангиосепт) (Adnexus), куркумин, далтепарин (фрагмин) (Pfizer), дисульфирам (антабус), E7820 (Eisai Limited), E7080 (Eisai Limited), EMD 121974 (Cilengitide) (EMD Pharmaceuticals), ENMD-1198 (EntreMed), ENMD-2076 (EntreMed), эндостар (Simcere), эрбитукс (ImClone/Bristol-Myers Squibb), EZN-2208 (Enzon Pharmaceuticals), EZN-2968 (Enzon Pharmaceuticals), GC1008 (Genzyme), генистейн, GSK1363089 (форетиниб) (GlaxoSmithKline), GW786034

(пазопаниб) (GlaxoSmithKline), GT-111 (Vascular Biogenics Ltd.), IMC—1121B (рамуцирумаб) (ImClone Systems), IMC-18F1 (ImClone Systems), IMC-3G3 (ImClone LLC), INCB007839 (Incyte Corporation), INGN 241 (Introgen Therapeutics), ирессу (ZD1839/гефитиниб), LBH589 (фаридак/панобиностат) (Novartis), Lucentis (ранибизумаб) (Genentech/Novartis), LY3 17615 (Enzastaurin) (Eli Lilly and Company), Масуген (пегаптаниб) (Pfizer), MED1522 (абегрин) (MedImmune), MLN518(тандутиниб) (Millennium), неовастат (AE941/бенефин) (Aeterna Zentaris), нексавар (Bayer/Onyx), NM-3 (Genzyme Corporation), носкапин (Cougar Biotechnology), NPT2358 (Nereus Pharmaceuticals), OSI-930 (OSI), паломид 529 (Paloma Pharmaceuticals, Inc.), Panzem в капсулах (2ME2) (EntreMed), Panzem NCD (2ME2) (EntreMed), PF-02341066 (Pfizer), PF-04554878 (Pfizer), PI-88 (Progen Industries/Medigen Biotechnology), РКС412 (Novartis), полифенон Е (экстракт зеленого чая) (Polypheno E International, Inc), PPI-2458 (Praecis Pharmaceuticals), PTC299 (PTC Therapeutics), РТК787 (ваталаниб) (Novartis), PXD101 (белиностат) (CuraGen Corporation), RAD001 (эверолимус) (Novartis), RAF265 (Novartis), регорафениб (BAY73-4506) (Bayer), ревлимид (Celgene), Retaane (Alcon Research), SN38 (липосомальный) (Neopharm), SNS-032 (BMS-387032) (Sunesis), SOM230(пасиреотид) (Novartis), скваламин (Genaera), сурамин, сутент (Pfizer), тарцеву (Genentech), ТВ-403 (Thrombogenics), темпостатин (Collard Biopharmaceuticals), тетратиомолибдат (Sigma-Aldrich), TG100801 (TargeGen), талидомид (Celgene Corporation), тинзапарин натрий ТК1258 (Novartis), TRC093 (Tracop Pharmaceuticals Inc.), VEGF Тrap (Aflibercept) (Regeneron Pharmaceuticals), VEGF Тrap-Eye (Regeneron Pharmaceuticals), веглин (VasGene Therapeutics), бортезомиб (Millennium), XL184 (Exelixis), XL647 (Exelixis), XL784 (Exelixis), XL820 (Exelixis), XL999 (Exelixis), ZD6474 (AstraZeneca), вориностат (Merck), и ZSTK474.

**[0433]** Примеры ингибиторов рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) включают, но не ограничиваются ими, бевацизумаб (Avastin®), акситиниб (Inlyta®); бриваниб аланинат (BMS-582664, (S)-((R)-1-(4-(4-фтор-2-метил-1H-индол-5-илокси)-5-метилпирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-6-илокси)пропан-2-ил)2-аминопропаноат); сорафениб (Nexavar®); пазопаниб (Votrient®); сунитиниб малат (Sutent®); цедираниб (AZD2171, CAS 288383-20-1); варгатеф (BIBF1120, CAS 928326-83-4); форетиниб (GSK1363089); телатиниб (BAY57-9352, CAS 332012-40-5); апатиниб (YN968D1, CAS 811803-05-1); иматиниб (Gleevec®); понатиниб (AP24534, CAS 943319-70-8); тивозаниб (AV951, CAS 475108-18-0); регорафениб (BAY73-4506, CAS 755037-03-7); ваталаниба дигидрохлорид (РТК787, CAS 212141-51-0); бриваниб (BMS-540215, CAS 649735-46-6); вандетаниб (Caprelsa® или AZD6474); мотесаниба дифосфат (AMG706, CAS 857876-30-3, N-(2,3-дигидро-3,3-диметил-1H-индол-6-ил)-2-[(4-пиридинилметил)амино]-3-

пиридинкарбоксамид, описанный в публикации РСТ № WO 02/066470); довитиниба ангидрид молочной кислоты (TKI258, CAS 852433-84-2); линфаниб (ABT869, CAS 796967-16-3); кабозантиниб (XL184, CAS 849217-68-1); лестауртиниб (CAS 111358-88-4); N-[5-[[[5-(1,1-диметилэтил)-2-оксазолил]метил]тио]-2-тиазолил]-4-пиперидинкарбоксамид (BMS38703, CAS 345627-80-7); (3R,4R)-4-амино-1-((4-((3-метоксифенил)амино)пирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-ил)метил)пиперидин-3-ол (BMS690514); N-(3,4-дихлор-2-фторфенил)-6-метокси-7-[[3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,6 $\alpha$ ]-октагидро-2-метилциклопента[с]пиррол-5-ил]метокси]-4-хиназолинамин (XL647, CAS 781613-23-8); 4-метил-3-[[1-метил-6-(3-пиридинил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-ил]амино]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид (BHG712, CAS 940310-85-0); и афлиберцепт (Eylea®). Примеры ингибиторов пути EGF включают, без ограничения, тирфостин 46, ЕКВ-569, эрлотиниб (Tarceva®), gefитиниб (Iressa®), эрбитукс, нимотузумаб, лапатиниб (Tykerb®), цетуксимаб (мкАт к EGFR), меченый <sup>188</sup>Re нимотузумаб (мкАт EGFR), и те соединения, которые в общем и в частности раскрыты в WO 97/02266, EP 0 564 409, WO 99/03854, EP 0 520 722, EP 0 566 226, EP 0 787 722, EP 0 837 063, US 5747498, WO 98/10767, WO 97/30034, WO 97/49688, WO 97/38983 и WO 96/33980.

**[0434]** Примеры антител к EGFR включают, но не ограничиваются ими, цетуксимаб (Erbix®); панитумумаб (Vectibix®); матузумаб (EMD-72000); трастузумаб (Herceptin®); нимотузумаб (hR3); залутумумаб; TheraCIM h-R3; MDX0447 (CAS 339151-96-1); и ch806 (mAb-806, CAS 946414-09-1). Примеры ингибиторов рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) включают, но не ограничиваются ими, эрлотиниба гидрохлорид (Tarceva®), gefитиниб (Iressa®); N-[4-[(3-хлор-4-фторфенил)амино]-7-[[3"S"]-тетрагидро-3-фуранил]окси]-6-хиназолинил]-4(диметиламино)-2-бутенамид, Tovok®); вандетаниб (Caprelsa®); лапатиниб (Tykerb®); (3R,4R)-4-амино-1-((4-((3-метоксифенил)амино)пирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-5-ил)метил)пиперидин-3-ол (BMS690514); канертиниба дигидрохлорид (CI-1033); 6-[4-[(4-этил-1-пиперазинил)метил]фенил]-N-[(1R)-1-фенилэтил]-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-амин (AEE788, CAS 497839-62-0); мубритиниб (TAK165); пелитиниб (ЕКВ569); афатиниб (BIBW2992); нератиниб (HKI-272); N-[4-[[1-[(3-фторфенил)метил]-1H-индазол-5-ил]амино]-5-метилпирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-6-ил]карбаминовой кислоты, (3S)-3-морфолинилметилловый эфир (BMS599626); N-(3,4-дихлор-2-фторфенил)-6-метокси-7-[[3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,6 $\alpha$ ]-октагидро-2-метилциклопента[с]пиррол-5-ил]метокси]-4-хиназолинамин (XL647, CAS 781613-23-8); и 4-[4-[[1-фенилэтил]амино]-7A-пирроло[2,3-d]пиримидин-6-ил]фенол (PKI1 66, CAS 187724-61-4).

**[0435]** Примеры ингибиторов mTOR включают, без ограничения, рапамицин (Rapamune®) и их аналоги и производные; SDZ-RAD; темсиролимус (Torisel®; также известен как CCI-779); ридафоролимус (официально известный как деферолимус, (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2[(1R,9S,12S,15R,16E,1SR,19R,21R,23S,24 £,26 £,28Z,30S,32S,35R)-1,18-дигидрокси-19,30-диметокси-15,17,21,23,29,35-гексаметил-2,3,10,14,20-пентаоксо-11,36-диокса-4-азатрицикло[30.3.1.04,9]гексатриаконта-16,24,26,28-тетраен-12-ил]пропил]-2-метоксициклогексилдиметилфосфинат, также известный как AP23573 и MK8669, и описанный в публикации РСТ № WO 03/064383); эверолимус (Afinitor® или RAD001); рапамицин (AY22989, Sirolimus®); симапимод (CAS 164301-51-3); (5-{2,4-бис[(3S)-3-метилморфолин-4-ил]пиридо[2,3-d]пиримидин-7-ил}-2-метоксифенил)метанол (AZD8055); 2-амино-8-[транс-4-(2-гидроксиэтокси)циклогексил]-6-(6-метокси-3-пиридинил)-4-метил-пиридо[2,3-d]пиримидин-7(8H)-он (PF04691502, CAS 1013101-36-4) и 2-[1,4-диоксо-4-[[4-(4-оксо-8-фенил-4H-1-бензопиран-2-ил)морфолини-4-ил]метокси]бутил]-L-аргинилглицил-L-α-аспартил-L-серин, внутреннюю соль (SF1126, CAS 936487-67-1).

**[0436]** Примеры иммуномодуляторов включают, например, афутузумаб (доступный от Roche®); пегфилграстим (Neulasta®); леналидомид (CC-5013, Revlimid®); талидомид (Thalomid®), активид (CC4047); и IRX-2 (смесь цитокинов человека, включая интерлейкин 1, интерлейкин 2 и интерферон-гамма, CAS 951209-71-5, доступна от IRX Therapeutics). Примеры антрациклинов включают, например, доксорубин (Adriamycin® и Rubex®); блеомицин (Lenoxane®); даунорубин (дауомбицин гидрохлорид, дауномицин и рубидомицин гидрохлорид, Cembidine®); липосомальный даунорубин (липосомальную форму даунорубина цитрата, DaunoXome®); митоксантрон (DHAD, Novantrone®); эпирубин (Ellence™); идамицин (Idamycin®, Idamycin PFS®); митомицин С (Mutamycin®); гелданамицин; гербимицин; равомицин; и дезацетилравидомицин. Примеры алкалоидов барвинка включают, например, тартрат винорелбина (Navelbine®), винкристин (Oncovin®) и виндезин (Eldisine®); винбластин (также известный как винбластинсульфат, винкалейкобластин и VLB, Alkaban-AQ® и Velban®); и винорелбин (Navelbine®). Примеры ингибиторов протеосом включают бортезомиб (Velcade®); карфилзомиб (PX-171-007, (S)-4-метил-A/-((S)-1-(((S)-4-метил-1-(R)-2-метилоксиран-2-ил)-1-оксопентан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)-2-((S)-2-(2-морфолиноацетиамидо)-4-фенилбутанамидо)-пентанамид); маризомиб (NPI-0052); иксазомиба цитрат (MLN-9708); деланзомиб (CEP-18770); и С-метил-V-(2-метил-1-5-тиазол-ил)карбонил-L-серил-L-метил-V-(5)-2-[(2/∧)-2-метил-2-оксиранил]-2-оксо-1-(фенилметил)этил]-L-серинамид (ONX-09 12).

**[0437]** Примеры ингибиторов фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) включают, но не ограничиваются ими, 4-[2-(1H-индазол-4-ил)-6-[[4-(метилсульфонил)пиперазин-1-ил]метил]тиено[3,2-d]пиримидин-4-ил]морфолин (также известный как GDC 0941 и описанный в публикации РСТ-заявки № WO 09/036082 и WO 09/055730); 2-метил-2-[4-[3-метил-2-оксо-8-(хинолин-3-ил)-2,3-дигидроимидазо[4,5-с]хинолин-1-ил]фенил]пропионитрил (также известный как BEZ 235 или NVP-BEZ 235 и описанный в публикации РСТ-заявки № WO 06/122806); 4-(трифторметил)-5-(2,6-диморфолинопиримидин-4-ил)пиримидин-2-амин (также известный как ВКМ120 или NVP-ВКМ120 и описанный в публикации РСТ-заявки № WO2007/084786); тозасертиб (VX680 или МК-0457, CAS 639089-54-6); (5Z)-5-[[4-(4-пиридинил)-6-хинолинил]метилен]-2,4-тиазолидиндион (GSK1059615, CAS 958852-01-2); (1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(ацетилокси)-1-[(ди-2-пропениламино)метилен]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-октагидро-11-гидрокси-4-(метоксиметил)-4a,6a-диметил-циклопента[5,6]нафто[1,2-с]пиран-2,7,10(1H)-трион (PX866, CAS 502632-66-8); и 8-фенил-2-(морфолин-4-ил)хромен-4-он (LY294002, CAS 154447-36-6).

**[0438]** Примеры ингибиторов протеинкиназы В (PKB) или АКТ включают, но не ограничиваются ими, 8-[4-(1-аминоциклобутил)фенил]-9-фенил-1,2,4-триазоло[3,4-f][1,6]нафтиридин-3(2H)-он (МК-2206, CAS 1032349-93-1); перифозин (KRX0401); 4-додecil-N-1,3,4-тиадиазол-2-ил-бензолсульфонамид (PHT-427, CAS 1191951-57-1); 4-[2-(4-амино-1,2,5-оксадиазол-3-ил)-1-этил-7-[(3S)-3-пиперидинилметокси]-1H-имидазо[4,5-с]пиримидин-4-ил]-2-метил-3-бутин-2-ол (GSK690693, CAS 937174-76-0); 8-(1-гидроксиэтил)-2-метокси-3-[(4-метоксифенил)метокси]-6H-дибензо[b,d]пиран-6-он (паломид 529, P529 или SG-00529); трицирбин (6-амино-4-метил-8-(β-D-рибофуранозил)-4H,8H-пирроло[4,3,2-де]пиримидо[4,5-с]пиридазин); (αS)-α-[[[5-(3-метил-1H-индазол-5-ил)-3-пиридинил]окси]метил]-бензолэтанамин (A674563, CAS 552325-73-2); 4-[(4-хлорфенил)метил]-1-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)-4-пиперидинамин (CST128930, CAS 885499-61-6); 4-(4-хлорфенил)-4-[4-(1H-пиразол-4-ил)фенил]пиперидин (AT7867, CAS 857531-00-1); и арчексин (RX-0201, CAS 663232-27-7).

**[0439]** Также можно использовать лекарственные средства, которые ингибируют либо кальций-зависимую фосфатазу кальцинейрин (циклоспорин и FK506), либо 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 еще одном аспекте клеточные композиции по настоящему изобретению можно вводить пациенту в сочетании (например,

до, одновременно или после) трансплантацией костного мозга, Т-клеточной абляционной терапии с использованием химиотерапевтических агентов, например, флударабином, дистанционной лучевой терапией (ХРТ), циклофосфамидом и/или антителами, такими как ОКТ3 или САМРАТН. В одном аспекте композиции клеток по настоящему изобретению вводят после В-клеточной абляционной терапии, такой как агенты, которые реагируют с CD20, например, ритуксан. Например, в одном варианте осуществления субъекты могут пройти стандартное лечение высокодозной химиотерапией с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В определенных вариантах осуществления после трансплантации субъекты получают инфузию размноженных иммунных клеток по настоящему изобретению. В дополнительном варианте осуществления размноженные клетки вводят до или после хирургического вмешательства.

**[0440]** Комбинированная терапия может обеспечить синергизм и оказаться синергетическим, то есть эффект, достигаемый при совместном использовании активных ингредиентов, больше, чем сумма эффектов, возникающих при использовании соединений по отдельности. Синергетический эффект может быть достигнут, когда активные ингредиенты: (1) совместно составлены и введены или доставлены одновременно в комбинированном стандартном лекарственном составе; (2) доставлены путем чередования, или параллельно в виде отдельных составов; или (3) при помощи какой-либо другой схемы. При доставке попеременно синергетический эффект может быть достигнут, когда соединения вводят или доставляют последовательно, например, путем различных инъекций в отдельных шприцах. Как правило, при чередовании эффективную дозировку каждого активного ингредиента вводят последовательно, то есть последовательно, тогда как при комбинированной терапии эффективные дозировки двух или более активных ингредиентов вводят вместе.

**[0441]** В одном варианте осуществления эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связываются с одним или более антигенами, описанными в данном документе, или их конъюгатов, вводят субъекту, у которого появилась опухоль после противоракового лечения. По прошествии времени, достаточного для того, чтобы введенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат образовали иммунный комплекс с антигеном, экспрессированным на соответствующей раковой клетке, обнаруживают иммунный комплекс. Присутствие (или отсутствие) иммунного комплекса свидетельствует об эффективности лечения. Например, увеличение иммунного комплекса по сравнению с контролем, взятым до лечения,

указывает на то, что лечение неэффективно, тогда как снижение иммунного комплекса по сравнению с контролем, взятым до лечения, указывает на то, что лечение эффективно.

**[0442]** В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GСС, как описано в данном документе, может быть включено в курс лечения, который дополнительно включает введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного агента. В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации с антигенсвязывающим агентом к GСС, как описано в данном документе, может представлять собой химиотерапевтический агент. В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации с антигенсвязывающим агентом, как описано в данном документе, может представлять собой агент, который ингибирует воспаление.

**[0443]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GСС представляет собой однодоменное антитело со специфичностью в отношении GСС человека. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело к GСС может быть конъюгировано (например, связано) с терапевтическим агентом (например, химиотерапевтическим агентом и радиоактивным атомом) в отношении связывания с раковой клеткой, доставки терапевтического агента к раковой клетке, и уничтожение раковой клетки, которая экспрессирует GСС человека. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент к GСС связан с терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент, цитокин, радиоактивный атом, кнРНК или токсин. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой радиоактивный атом.

**[0444]** В некоторых вариантах осуществления способы можно применять в сочетании с другими видами терапии связанных с GСС нарушений. Например, композицию можно вводить субъекту одновременно, до или после химиотерапии. В некоторых вариантах осуществления композицию можно вводить субъекту одновременно, до или после метода адоптивной терапии.

**[0445]** В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации со связывающим агентом к GСС, как описано в данном документе, может быть введен одновременно со связывающим агентом к GСС, в тот же день, что и связывающий агент к GСС, или на той же неделе, что и связывающий агент к GСС. В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации со



связывающим агентом к GСС, как описано в данном документе, может быть введено в одном составе со связывающим агентом к GСС. В определенных вариантах осуществления дополнительный агент вводят способом, временно отделенным от введения связывающего агента к GСС, как описано в данном документе, например, за один или более часов до или после, за один или более дней до или после, за одну или более недель до или после или за один или более месяцев до или после введения связывающего агента к GСС. В различных вариантах осуществления частота введения одного или более дополнительных агентов может быть такой же, аналогичной или отличной от частоты введения связывающего агента к GСС, как описано в данном документе.

**[0446]** В состав комбинированной терапии входит схема лечения, включающая применение двух различных антител, как описано в данном документе, и/или схема лечения, включающая применение антитела, как описано в данном документе, во множестве составов и/или с помощью множества способов введения.

**[0447]** В некоторых вариантах осуществления композиции могут быть составлены с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, например, дополнительными терапевтическими средствами для лечения или профилактики связанного с GСС нарушения (например, рака или аутоиммунного нарушения) у субъекта. Дополнительные агенты для лечения связанного с GСС нарушения у субъекта будут варьироваться в зависимости от конкретного заболевания, которое лечат, но могут включать, помимо прочего, ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицин, винкристин, преднизолон, осфамид, карбоплатин, этопозид, дексаметазон, цитарабин, цисплатин, циклофосфамид или флударабин.

**[0448]** Композиция, описанная в данном документе, может заменить или дополнить ранее или в настоящее время применяемую терапию. Например, при лечении композицией, описанной в данном документе, введение одного или более дополнительных активных агентов может быть прекращено или уменьшено, например, может быть введено на более низких уровнях (например, на более низких уровнях эталонного антитела, которое перекрестно конкурирует за связывание с GСС) после введения связывающего агента к GСС, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления можно продолжать применение предыдущей терапии. В некоторых вариантах осуществления предыдущую терапию будут поддерживать до тех пор, пока уровень композиции не достигнет уровня, достаточного для обеспечения терапевтического эффекта. Эти две терапии можно применять в комбинации.

**[0449]** В некоторых вариантах осуществления субъекту можно вводить агент, который уменьшает или ослабляет побочный эффект, связанный с применением терапии или комбинации, описанной в данном документе, например, экспрессирующей CAR клеткой (например, клеткой, экспрессирующей CAR к GCC) и дополнительным агентом. Побочные эффекты, связанные с введением экспрессирующих CAR клеток, включают, но не ограничиваются ими, CRS и гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH), также называемый синдромом активации макрофагов (MAS). К симптомам CRS относится высокая температура, тошнота, преходящая гипотензия, гипоксия и т. п. Соответственно, способы, описанные в данном документе, могут включать введение субъекту терапии, описанной в данном документе, например, экспрессирующей CAR клетки (например, клетки, экспрессирующей CAR к GCC), и дополнительное введение агента для контроля повышенных уровней растворимого фактора в результате лечения экспрессирующей CAR клеткой. В одном варианте растворимый фактор, повышенный у субъекта, представляет собой один или более из IFN-гамма, TNF $\alpha$  IL-2 и IL-6. Таким образом, агент, вводимый для лечения этого побочного эффекта, может представлять собой агент, который нейтрализует один или более из этих растворимых факторов. К таким агентам относится, помимо прочего, стероид, ингибитор TNF- $\alpha$  и ингибитор IL-6. Примером ингибитора TNF- $\alpha$  является энтанерсепт. Примером ингибитора IL-6 является тоцилизумаб.

**[0450]** В одном варианте осуществления субъекту можно вводить агент, который усиливает активность терапии, описанной в данном документе, например, экспрессирующую CAR клетку (например, клетку, экспрессирующую CAR к GCC). Например, в одном варианте осуществления агент может быть таким, который ингибирует ингибирующую молекулу. Дополнительные ингибирующие молекулы, например, могут в некоторых вариантах осуществления снижать способность экспрессирующей CAR клетки сформировать иммунный эффекторный ответ. Примеры ингибирующих молекул включают PD1, PD-F1, STFA4, TIM3, FAG3, VISTA, BTFA, TIGIT, FAIR1, CD160, и 2B4.

**[0451]** Ингибирование ингибирующей молекулы, например, путем ингибирования ДНК, РНК или уровня белка, может оптимизировать эффективность CAR-экспрессирующей клетки. В вариантах осуществления ингибирующая нуклеиновая кислота, например, ингибирующая нуклеиновая кислота, например, дцРНК, например, киРНК или кшРНК, может использоваться для ингибирования экспрессии ингибирующей молекулы в CAR-экспрессирующей клетке. В одном варианте осуществления ингибитор представляет собой кшРНК. В одном варианте осуществления ингибирующая молекула ингибируется внутри экспрессирующей CAR клетки. В этих вариантах осуществления

молекула дцРНК, которая ингибирует экспрессию ингибирующей молекулы, соединена с нуклеиновой кислотой, которая кодирует компонент, например, все компоненты, CAR.

**[0452]** В некоторых вариантах осуществления ингибитор ингибирующего сигнала может представлять собой, например, антитело или фрагмент антитела, который связывается с ингибирующей молекулой. Например, агент может представлять собой антитело или фрагмент антитела, которое связывается с PD1, PD-L1, PD-L2 или CTLA4 (например, ипилимумаб (также называемый MDX-010 и MDX-101, продаваемый как Yervoy®; Bristol-Myers Squibb; тремелиумаб (моноклональное антитело IgG2, доступное от Pfizer, ранее известное как тицилимумаб, CP-675,206)). Агент, который усиливает активность, например, экспрессирующей CAR клетки (например, клетки, экспрессирующей CAR к GCC), может представлять собой, например, слитый белок, содержащий первый домен и второй домен, где первый домен представляет собой ингибирующую молекулу или ее фрагмент, а второй домен представляет собой полипептид, связанный с положительным сигналом, например, полипептид, связанный с положительным сигналом представляет собой CD28, ICOS и их фрагменты, например, внутриклеточный сигнальный домен CD28 и/или ICOS. В одном варианте осуществления слитый белок экспрессируется той же клеткой, которая экспрессирует CAR. В еще одном варианте осуществления слитый белок экспрессируется клеткой, например Т-клеткой, которая не экспрессирует CAR к GCC.

**[0453]** В еще одном варианте осуществления субъекты получают инфузию экспрессирующих CAR клеток, например, композиции по настоящему изобретению, перед трансплантацией, например, аллогенной трансплантацией стволовых клеток. В предпочтительном варианте осуществления экспрессирующие CAR клетки транзитивно экспрессируют CAR, например, путем электропорации мРНК, кодирующей CAR, посредством чего экспрессия CAR прекращается перед инфузией донорских стволовых клеток, чтобы избежать нарушения приживления.

**[0454]** У некоторых пациентов могут возникать аллергические реакции на соединения по данному изобретению и/или другой противораковый агент(-ы) во время или после введения; поэтому часто назначают противоаллергические средства, чтобы свести к минимуму риск аллергической реакции. Подходящие противоаллергические средства включают кортикостероиды, такие как, дексаметазон (например, Decadron®), беклометазон (например, Veclovent®), гидрокортизон (также известный как кортизон, гидрокортизона сукцинат натрия, гидрокортизона фосфат натрия и продаваемый под торговыми названиями Ala-Cort®, гидрокортизона фосфат, Solu-Cortef®, Hydrocort Acetate® и Lanacort®), преднизолон (продаваемый под торговыми названиями Delta-Cortel®,

Orapred®, Pediapred® и Prelone®), преднизолон (продаваемый под торговыми марками Deltasone®, Liquid Red®, Meticorten® и Orasone®), метилпреднизолон (также известный как 6-метилпреднизолон, метилпреднизолон ацетат, метилпреднизолон натрия сукцинат, продаваемый под торговыми названиями Duralone®, Medralone®, Medrol®, M-Prednisol® и Solu-Medrol®); антигистаминные препараты, такие как дифенгидрамин (например, Benadryl®), гидроксизин и ципрогептадин; и бронхолитики, такие как агонисты бета-адренорецепторов, альбутерол (например, Proventil®) и тербуталин (Brethine®). Некоторые пациенты могут испытывать тошноту во время и после введения соединения по данному изобретению и/или другого противоракового агента(-ов); поэтому противорвотный агент(-ы) используется для предотвращения тошноты (верхняя часть желудка) и рвоты. Подходящие противорвотные агенты включают апрепитант (Emend®), ондансетрон (Zofran®), гранисетрон HCl (Kytril®), лоразепам (Ativan®), дексаметазон (Decadron®), прохлорперазин (Compazine®), казопитант (Rezonic® и Zunrisa®) и их комбинации.

**[0455]** Лекарственные препараты для облегчения боли, испытываемой в период лечения, часто назначают, чтобы пациент чувствовал себя более комфортно. Часто используют обычные безрецептурные анальгетики, такие как Tylenol®. Однако опиоидные анальгетики, такие как гидрокодон/парацетамол или гидрокодон/ацетаминофен (например, Vicodin®), морфин (например, Astramorph® или Avinza®), оксикодон (например, ОхуContin® или Percocet®), оксиморфона гидрохлорид (Опана®) и фентанил (например, Duragesic®) также пригодны при умеренной или сильной боли.

**[0456]** В попытке защитить нормальные клетки от терапевтической токсичности и ограничить органную токсичность в качестве дополнительной терапии можно использовать цитопротекторы (такие как нейропротекторы, поглотители свободных радикалов, кардиопротекторы, нейтрализаторы экстравазации антрациклина, питательные вещества и т. п.). Подходящие цитопротекторные агенты включают амифостин (Ethyol®), глутамин, димесну (Tavocept®), месну (Mesnex®), дексразоксан (Zinecard® или Totect®), ксалипроден (Xapriga®) и лейковорин (также известный как лейковорин кальция, цитроворум-фактор и фолиновую кислоту).

**[0457]** Структура активных соединений, идентифицированных кодовыми номерами, общими названиями или торговыми марками, может быть взята из фактического издания стандартного сборника «The Merck Index» или из баз данных, например, Patents International (например, IMS World Publications). Вышеупомянутые соединения, которые могут использоваться в сочетании с соединением по настоящему изобретению, могут приготовить и ввести, как описано в АРТ, например, в документах, процитированных выше.

**[0458]** В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим по меньшей мере один терапевтический агент по настоящему изобретению (например, терапевтический агент по настоящему изобретению) или его фармацевтически приемлемую соль вместе с фармацевтически приемлемым носителем, подходящим для введения субъекту-человеку или субъекту-животному либо отдельно, либо вместе с другими противораковыми агентами.

**[0459]** В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложены способы лечения людей или животных, имеющих клеточное пролиферативное заболевание, такое как рак. В настоящем изобретении предложены способы лечения субъекта-человека или субъекта-животного, нуждающегося в таком лечении, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества терапевтического агента по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли либо отдельно, либо в комбинации с другими противораковыми агентами.

**[0460]** В частности, композиции будут либо составляться вместе как комбинированное терапевтическое средство, либо вводиться по отдельности. При комбинированной терапии соединение по данному изобретению и другой(-ие) противораковый(-ые) агент(-ы) можно вводить либо одновременно, параллельно или последовательно без каких-либо конкретных ограничений по времени, при этом такое введение обеспечивает терапевтически эффективные уровни двух соединений в организме пациента.

**[0461]** В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению и другой противораковый агент(-ы), как правило, вводят последовательно в любом порядке путем инфузии или перорально. Режим дозирования может варьироваться в зависимости от стадии заболевания, физической подготовки больного, профилей безопасности отдельных лекарственных средств и переносимости отдельных лекарственных средств, а также других критериев, хорошо известных лечащему врачу и практикующему(-им) врачу(-ам), вводящим комбинацию. Терапевтический агент по настоящему изобретению (например, CAR к GCC) и другой противораковый агент(-ы) можно вводить с разницей в несколько минут, часов, дней или даже недель в зависимости от конкретного цикла, используемого для лечения. Кроме того, цикл может включать введение одного лекарственного средства чаще, чем другого, в течение цикла лечения и в разных дозах за одно введение лекарственного средства.

**[0462]** Терапевтический агент (например, CAR к GCC) по настоящему изобретению также может быть использован с определенными преимуществами в сочетании в

известными терапевтическими способами, например, введением гормонов или особенно облучением. Соединение по настоящему изобретению, в частности, может быть использовано в качестве радиосенсибилизатора, особенно для лечения опухолей, которые демонстрируют слабую чувствительность к лучевой терапии.

**[0463]** В вариантах осуществления субъекту могут вводить агент, который снижает или облегчает побочный эффект, связанный с введением экспрессирующей CAR клетки. Побочные эффекты, связанные с введением экспрессирующих CAR клеток, включают, но не ограничиваются ими, CRS и гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH), также называемый синдромом активации макрофагов (MAS).

**[0464]** Соответственно, способы, описанные в данном документе, могут включать введение субъекту экспрессирующих CAR клеток, описанных в данном документе, и дополнительное введение одного или более агентов для контроля повышенных уровней растворимого фактора в результате лечения экспрессирующей CAR клеткой. В одном варианте осуществления растворимый фактор, повышенный у субъекта, представляет собой один или более из IFN-гамма, TNF $\alpha$ , IL-2 и IL-6. В одном варианте осуществления фактор, повышенный у субъекта, представляет собой один или более из IL-1, GM-CSF, IL-10, IL-8, IL-5 и фракталкина. Таким образом, агент, вводимый для лечения этого побочного эффекта, может представлять собой агент, который нейтрализует один или более из этих растворимых факторов.

**[0465]** В одном варианте осуществления агент, который нейтрализует одну или более из этих растворимых форм, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Примеры таких агентов включают, но не ограничиваются ими, стероид (например, кортикостероид), ингибитор TNF $\alpha$  и ингибитор IL-6. Примером ингибитора TNF $\alpha$  является молекула антитела к TNF $\alpha$ , такая как инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол и голимумаб. Другим примером ингибитора TNF $\alpha$  является слитый белок, такой как этанерцепт. Низкомолекулярные ингибиторы TNF $\alpha$  включают, но не ограничиваются ими, производные ксантина (например, пентоксифиллин) и бупропион. Примером ингибитора IL-6 является молекула антитела к IL-6, такая как тоцилизумаб (toe), сарилумаб, элсалимомаб, CNTO 328, ALD518/BMS-945429, CNTO 136, CPSI-2364, CDP6038, VX30, ARGX-109, FE301, и FM101. В одном варианте осуществления молекула антитела к IL-6 представляет собой тоцилизумаб. Примером ингибитора на основе IL-1R является анакинра.

**[0466]** В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят кортикостероид, такой как, например, метилпреднизолон, гидрокортизон и другие. В некоторых вариантах

осуществления субъекту вводят вазопрессор, такой как, например, норадреналин, допамин, фенилэфрин, адреналин, вазопрессин или их комбинацию.

**[0467]** В одном варианте осуществления субъекту можно вводить жаропонижающее средство. В одном варианте осуществления субъекту можно вводить анальгезирующее средство.

**[0468]** В одном варианте осуществления субъекту может быть дополнительно введен агент, который усиливает активность или приспособленность экспрессирующих CAR клеток. Например, в одном варианте осуществления агент может представлять собой агент, который ингибирует молекулу, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления молекула, которая модулирует или регулирует функцию Т-клеток, представляет собой ингибирующую молекулу. Ингибирующие молекулы, например, белок программируемой гибели клеток 1 (PD-1) или лиганд PD-1 (PD-L1), в некоторых вариантах осуществления, могут снижать способность экспрессирующих CAR клеток вызывать иммунный эффекторный ответ. Примеры ингибирующих молекул включают PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC класса I, MHC класса II, GAL9 и аденозин. Ингибирование молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клеток, например, путем ингибирования на уровне ДНК, РНК или белка, может оптимизировать эффективность экспрессирующих CAR клеток. В вариантах осуществления изобретения агент, например, ингибирующая нуклеиновая кислота, например, ингибирующая нуклеиновая кислота, например, ингибирующая нуклеиновая кислота, например, дцРНК, например, кшРНК или кшРНК, короткие палиндромные повторы регулярно расположенные группами, (CRISPR), нуклеазу на основе эффектора, подобного активатору транскрипции, (TALEN), или эндонуклеазу с цинковыми пальцами (ZFN), например, как описано в данном документе, может быть использован для ингибирования экспрессии ингибирующей молекулы в экспрессирующей CAR клетке. В одном варианте осуществления ингибитор представляет собой кшРНК. В одном варианте осуществления агент, который модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клеток, ингибируется внутри экспрессирующей CAR клетки. В этих вариантах осуществления молекула дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клеток, связана с нуклеиновой кислотой, которая кодирует компонент, например, все компоненты, CAR.

**[0469]** В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу двухцепочечной РНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, функцию Т-клеток, функционально связана с промотором, например, промотором, производным от HI- или U6, так что молекула дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, функцию Т-клетки, экспрессируется, например, экспрессируется в экспрессирующей CAR клетке. См., например, Tiscomia G., "Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA," Chapter 3, in *Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA* (eds. Friedmann and Rossi). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2007; Brummelkamp TR, et al. (2002) *Science* 296: 550-553; Miyagishi M, et al. (2002) *Nat. Biotechnol.* 19: 497-500.

**[0470]** В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу двухцепочечной РНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клеток, присутствует в том же самом векторе, например, лентивирусном векторе, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует компонент, например, все компоненты CAR. В таком варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, функцию Т-клетки, расположена в векторе, например, лентивирусном векторе, 5'- или 3'- к нуклеиновой кислоте, которая кодирует компонент, например, все компоненты, CAR. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу двухцепочечной РНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клетки, может транскрибироваться в том же или другом направлении, что и нуклеиновая кислота, которая кодирует компонент, например, все компоненты, CAR. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клеток, присутствует в векторе, отличном от вектора, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую компонент, например, все компоненты, CAR. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу дцРНК, ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клетки, транзientно экспрессируемую в экспрессирующей CAR клетке. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клетки, стабильно



интегрирована в геном экспрессирующей CAR клетки. Конфигурации иллюстративных векторов для экспрессии компонента, например, всех компонентов, CAR с молекулой дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клеток, представлены, например, на Фиг. 47 международной публикации WO20 15/090230, поданной 19 декабря 2014 г., которая включена в данный документ посредством ссылки.

**[0471]** В вариантах осуществления терапии, описанную в данном документе, например, экспрессирующую CAR клетку (например, клетку, экспрессирующую CAR к GCC), вводят в комбинации с противоэпилептическим средством, например, ацетазоламидом, биварацетамом, карбамазепином, клобазамом, клоназепамом, эсликарбазепина ацетатом, этосуксимидом, габапентином, лакосамидом, ламотриджином, леветирацетамом, окскарбазепином, перампанелом, фенобарбиталом, фенитоином, пирацетамом, прегабалином, примидоном, рудинамидом, вальпроатом натрия, стирипентолом, тиагабином, топираматом, вальповоровой кислоты, вигабатрином, зонисамидом. См., Weller et al. *Lancet* 13.9 (2012):e375-e382. В вариантах осуществления противоэпилептическое средство вводят в количестве, эффективном для предотвращения судорог, перед терапией, описанной в данном документе, например, в экспрессирующую CAR клетку (например, клетку, экспрессирующую CAR к GCC). В вариантах осуществления введение противоэпилептического средства необязательно продолжают в течение и после введения терапии, описанной в данном документе, например, экспрессирующей CAR клетки (например, клетки, экспрессирующей CAR к GCC). В вариантах осуществления терапия, описанная в данном документе, например, экспрессирующая CAR клетка (например, клетка, экспрессирующая CAR к GCC), может применяться в лечении в сочетании с противоэпилептическим средством и облучением.

**[0472]** Синдром высвобождения цитокинов (CRS)

**[0473]** Синдром высвобождения цитокинов (CRS) представляет собой потенциально опасную для жизни токсичность, связанную с цитокинами, которая может возникнуть в результате иммунотерапии рака, например, терапии противораковыми антителами или иммунотерапии Т-клетками (например, CAR-Т-клетками). CRS возникает в результате активации иммунной системы на высоком уровне, когда большое количество лимфоцитов и/или миелоидных клеток при активации высвобождает воспалительные цитокины. Степень тяжести CRS и время появления симптомов могут варьироваться в зависимости от величины активации иммунных клеток, типа проводимой терапии и/или степени опухолевой массы у субъекта. В случае Т-клеточной терапии рака появление симптомов,

как правило, наступает через несколько дней или недель после введения Т-клеточной терапии, например, когда наблюдается пик экспансии Т-клеток *in vivo*. См., например, Lee et al. *Blood*. 124.2(2014): 188-95.

**[0474]** Симптомы CRS могут включать неврологическую токсичность, синдром диссеминированной внутрисосудистой коагуляции, дисфункцию сердца, респираторный дистресс-синдром взрослых, почечную недостаточность и/или печеночную недостаточность. Например, симптомы CRS включают высокую температуру, тошноту, преходящую гипотензию, гипоксию и т.п. CRS может включать клинические конституциональные проявления и симптомы, такие как лихорадка, утомляемость, анорексия, миалгии, артралгии, тошнота, рвота и головная боль. CRS может включать клинические кожные проявления и симптомы, такие как сыпь. CRS может включать клинические желудочно-кишечные проявления и симптомы, такие как тошнота, рвота и диарея. CRS может включать клинические респираторные проявления и симптомы, такие как тахипноэ и гипоксемия. CRS может включать клинические сердечно-сосудистые проявления и симптомы, такие как тахикардия, повышенное пульсовое артериальное давление, гипотензия, повышенный сердечный выброс (на ранней стадии) и потенциально сниженный сердечный выброс (на поздней стадии). CRS может включать клинические проявления и симптомы коагуляции, такие как повышенный уровень d-димера, гипофибриногенемия с кровотечением или без него. CRS может включать клинические почечные проявления и симптомы, такие как азотемия. CRS может включать клинические печеночные проявления и симптомы, такие как трансаминит и гипербилирубинемия. CRS может включать клинические неврологические проявления и симптомы, такие как головная боль, изменения психического состояния, спутанность сознания, делирий, затруднения с подбором слов или явная афазия, галлюцинации, тремор, дисметрия, изменение походки и судороги.

**[0475]** Считается, что IL-6 является медиатором токсичности CRS. См., например, идентификатор. Высокий уровень IL-6 может инициировать провоспалительный сигнальный каскад IL-6, приводящий к одному или более симптомам CRS. В некоторых случаях уровень С-реактивного белка (CRP) (биомолекула, вырабатываемая печенью, например, в ответ на IL-6) может быть мерой активности IL-6. В некоторых случаях уровни CRP могут увеличиваться в несколько раз (например, в несколько порядков) во время CRS. Уровни CRP могут быть измерены с использованием способов, описанных в данном документе, и/или стандартных способов, доступных в данной области техники.

**[0476]** Классификатор степеней тяжести CRS

**[0477]** В некоторых вариантах осуществления CRS может быть оценен по степени тяжести от 1 до 5 следующим образом. Степени тяжести 1-3 относятся к менее тяжелому CRS. Степени тяжести 4-5 относятся к тяжелому CRS. Для CRS 1 степени тяжести требуется только симптоматическое лечение (например, тошноты, лихорадки, утомляемости, миалгии, недомогания, головной боли), и свойственны симптомы, которые не угрожают жизни. Для CRS 2 степени тяжести симптомы требуют умеренного воздействия на организм и, как правило, отвечают на умеренное воздействие на организм. У субъектов с CRS 2 степени тяжести развивается гипотензия, которая отвечает либо на введение жидкости, либо на одну низкую дозу вазопрессора; или у них развивается токсичность органов 2-й степени тяжести или легкие респираторные симптомы, которые отвечают на низкопоточный кислород (<40% кислорода).

**[0478]** У пациентов с CRS 3-й степени гипотензию, как правило, нельзя устранить с помощью инфузионной терапии или одной низкой дозы вазопрессора. Эти субъекты, как правило, нуждаются в более низкопоточном кислороде и имеют органную токсичность 3 степени тяжести (например, почечную или сердечную дисфункцию или коагулопатию) и/или трансаминит 4 степени тяжести. Субъекты CRS 3 степени тяжести требуют более агрессивного воздействия на организм, например, кислород 40% или выше, высокие дозы вазопрессора(-ов) и/или несколько вазопрессоров. Субъекты с CRS 4-й степени тяжести страдают от угрожающих жизни симптомов, включая органную токсичность 4-й степени тяжести или потребность в искусственной вентиляции легких. У субъектов с CRS 4-й степени тяжести, как правило, нет трансаминитов. У субъектов с CRS 5-й степени тяжести токсичность приводит к летальному исходу. Например, критерии классификации степеней тяжести CRS представлены в данном документе в виде таблицы 9. Если не указано иное, CRS, как используется в данном документе, относится к CRS в соответствии с критериями таблицы 9.

Таблица 9. Классификатор степеней тяжести CRS

Степень тяжести 1	Только поддерживающая терапия
Степень тяжести 2	Внутривенная терапия +/- госпитализация.

Степень тяжести 3	Гипотензия, требующая внутривенного введения жидкостей или низких доз вазоактивных веществ, или гипоксемия, требующая кислорода, СРАР или ВІРАР.
Степень тяжести 4	Гипотензия, требующая высоких доз вазоактивных веществ, или гипоксемия, требующая искусственной вентиляции легких
Степень тяжести 5	Летальный исход

### Терапия CRS

**[0479]** Терапия CRS включает ингибитор ІІ-6 или ингибиторы рецептора ІІ-6 (ІІ-6R) (например, тоцилизумаб или силтуксимаб), блокаторы sgp130, вазоактивные препараты, кортикостероиды, иммунодепрессанты и искусственную вентиляцию легких. Иллюстративные виды терапии CRS описаны в международной заявке W02014011984, которая включена в данный документ посредством ссылки.

**[0480]** Тоцилизумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело G1-каппа против человеческого ІІ-6R. См., например, идентификатор. Тоцилизумаб блокирует связывание ІІ-6 с растворимыми и связанными с мембраной рецепторами ІІ-6 (ІІ-6R) и, таким образом, ингибирует классический и транс-ІІ-6 сигналинг. В вариантах осуществления тоцилизумаб вводят в дозе около 4-12 мг/кг, например, около 4-8 мг/кг для взрослых и около 8-12 мг/кг для детей, например, вводят в течение 1 часа. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство для лечения CRS представляет собой ингибитор сигналинга ІІ-6, например, ингибитор ІІ-6 или рецептора ІІ-6. В одном варианте осуществления ингибитор представляет собой антитело к ІІ-6, например, химерное моноклональное антитело к ІІ-6, такое как силтуксимаб. В других вариантах осуществления ингибитор включает растворимый gp130 или его фрагмент, который способен блокировать сигналинг ІІ-6. В некоторых вариантах осуществления sgp130 или его фрагмент слиты с гетерологичным доменом, например, доменом Lc, например, представляет собой слитый белок gp130-Lc, такой как LE301. В вариантах осуществления ингибитор сигналинга ІІ-6 включает антитело, например, антитело к рецептору ІІ-6, такое как сарилумаб, олокизумаб (CDP6038), элсилимомаб,

симкумаб (CNTO 136), ALD518/BMS-945429, ARGX-109 или LM101. В некоторых вариантах осуществления ингибитор сигналинга IL-6 включает низкомолекулярный препарат, такую как CPST2364.

**[0481]** Примеры вазоактивных лекарственных препаратов включают, но не ограничиваются ими, ангиотензин-11, эндотелин-1, альфа-адренергические агонисты, растаноиды, ингибиторы фосфодиэстеразы, антагонисты эндотелина, инотропы (например, адреналин, добутамин, изопреналин, эфедрин), вазопрессоры (например, норадреналин, вазопрессин, метараминол, вазопрессин, метиленовый синий), инодилататоры (например, милринон, левосимендан) и допамин. Примеры вазопрессоров включают норэпинефрин, допамин, фенилэфрин, адреналин и вазопрессин, но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах осуществления высокая доза вазопрессора включает одно или более из следующего: монотерапия норэпинефрином в дозе  $>20$  мкг/мин, монотерапия допамином в дозе  $>10$  мкг/кг/мин, монотерапия фенилэфрином в дозе  $>200$  мкг/мин и/или монотерапия эпинефрином  $>10$  мкг/мин. В некоторых вариантах осуществления, если субъект принимает вазопрессин, высокая доза сосудосуживающего фактора включает эквивалент вазопрессина + норадреналина  $>10$  мкг/мин, где эквивалентная доза норадреналина = [норэпинефрин (мкг/мин)] + [допамин (мкг/кг/мин)/2] + [адреналин (мкг/мин)] + [фенилэфрин (мкг/мин)/10]. В некоторых вариантах осуществления, если субъект принимает комбинированные вазопрессоры (не вазопрессин), высокая доза вазопрессора включает эквивалент норадреналина  $>20$  мкг/мин, где эквивалентная доза норадреналина = [норэпинефрин (мкг/мин)] + [допамин (мкг/мин)/2] + [эпинефрин (мкг/мин)] + [фенилэфрин (мкг/мин)/10]. См., например, идентификатор.

**[0482]** В некоторых вариантах осуществления низкая доза вазопрессора представляет собой вазопрессор, вводимый в дозе, меньшей, чем одна или более из доз, перечисленных выше для высокой дозы вазопрессора. Примеры кортикостероидов включают, но не ограничиваются ими, дексаметазон, гидрокортизон и метилпреднизолон. В вариантах осуществления используется доза дексаметазона 0,5 мг/кг. В вариантах осуществления используется максимальная доза дексаметазона 10 мг/доза. В вариантах осуществления используется доза метилпреднизолона 2 мг/кг/день.

**[0483]** Примеры иммунодепрессантов включают, но не ограничиваются ими, ингибитор TNFa или ингибитор IL-1. В вариантах осуществления ингибитор TNFa содержит антитело к TNFa, например, моноклональное антитело, например, инфликсимаб. В вариантах осуществления ингибитор TNFa включает растворимый рецептор TNFa

(например, этанерцепт). В вариантах осуществления ингибитор IL-1 или IL-1R включает анакинру.

**[0484]** В некоторых вариантах осуществления субъекту с риском развития тяжелого CRS проводят терапию антителом к IFN-гамма или антителом к sIF2Ra, например, молекулой антитела, которая направлена против IFN-гамма или sIF2Ra.

**[0485]** В вариантах осуществления субъекту, получившему молекулу терапевтического антитела, такого как блинатумомаб, и имеющему CRS или подверженному риску развития CRS, молекулу терапевтического антитела вводят в более низкой дозе и/или с более низкой частотой, или введение терапевтического молекула антитела останавливают.

**[0486]** В вариантах осуществления субъект, имеющий CRS или подверженный риску развития CRS, лечится жаропонижающим лекарством, таким как ацетаминофен. В вариантах осуществления субъекту по данному изобретению проводят или обеспечивают один или более видов терапии CRS, описанных в данном документе, например, один или более из ингибиторов IL-6 или ингибиторов рецептора IL-6 (IL-6R) (например, тоцилизумаб), вазоактивных препаратов, кортикостероидов, иммунодепрессантов или искусственной вентиляции легких в любой комбинации, например, в комбинации с экспрессирующей CAR клеткой, описанной в данном документе.

**[0487]** В вариантах осуществления субъекту с риском развития CRS (например, тяжелым CRS) (например, с идентифицированным статусом высокого риска развития тяжелого CRS) проводят один или более видов терапии CRS, описанных в данном документе, например, один или более из ингибитора IL-6 или ингибиторов рецептора IL-6 (IL-6R) (например, тоцилизумаб), вазоактивных препаратов, кортикостероидов, иммунодепрессантов или искусственной вентиляции легких в любой комбинации, например, в комбинации с экспрессирующей CAR клеткой, описанной в данном документе.

**[0488]** В вариантах осуществления субъект по данному изобретению (например, субъект с риском развития тяжелого CRS или субъект, идентифицированный как подверженный риску развития тяжелого CRS) переводят в отделение интенсивной терапии. В некоторых вариантах осуществления субъект по данному изобретению (например, субъект с риском развития тяжелого CRS или субъект, идентифицированный как подверженный риску развития тяжелого CRS) находится под наблюдением в отношении одного или более симптомов или патологических состояний, связанных с CRS, таких как лихорадка, учащенное сердцебиение, коагулопатия, СПОН (синдром полиорганной

дисфункции), сердечно-сосудистая дисфункция, распределительный шок, кардиомиопатия, печеночная дисфункция, почечная дисфункция, энцефалопатия, клинические судороги, дыхательная недостаточность или тахикардия. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему документу включают введение терапии для лечения одного из симптомов или патологических состояний, ассоциированных с CRS. Например, в вариантах осуществления, например, если у субъекта развивается коагулопатия, способ включает введение криопреципитата. В некоторых вариантах осуществления, например, если у субъекта развивается дисфункция сердечно-сосудистой системы, способ включает проведение инфузионной поддержки вазоактивными препаратами. В некоторых вариантах осуществления, например, если у субъекта развивается распределительный шок, способ включает проведение терапии альфа-агонистом. В некоторых вариантах осуществления, например, если у субъекта развивается кардиомиопатия, способ включает проведение терапии милриноном. В некоторых вариантах осуществления, например, если у субъекта развивается дыхательная недостаточность, способ включает проведение искусственной вентиляции легких (например, инвазивной искусственной вентиляции легких или неинвазивной искусственной вентиляции легких). В некоторых вариантах осуществления, например, если у субъекта развивается шок, способ включает введение кристаллоидных и/или коллоидных жидкостей. В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку вводят до, одновременно или после введения одного или более способов лечения CRS, описанных в данном документе, например, одного или более ингибиторов IL-6 или ингибиторов рецептора IL-6 (IL-6R) (например, тоцилизумаба), вазоактивных препаратов, кортикостероидов, иммунодепрессантов или искусственной вентиляции легких. В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку вводят в течение 2 недель (например, в течение 2 или 1 недели или в течение 14 дней, например, в течение 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 дня или менее) применения одного или более видов терапии CRS, описанных в данном документе, например, одного или более ингибиторов IL-6 или ингибиторов рецептора IL-6 (IL-6R) (например, тоцилизумаба), вазоактивных препаратов, кортикостероидов, иммунодепрессантов или искусственной вентиляции легких. В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку вводят по меньшей мере 1 день (например, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 1, неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 3 месяца или более) до или после применения одного или более видов лечения CRS, описанных в данном документе, например, одного или более из ингибиторов IL-6 или ингибиторов рецептора IL-6 (IL-6R) (например, тоцилизумаба), вазоактивных препаратов, кортикостероидов, иммунодепрессантов или искусственной вентиляции легких.

**[0489]** В вариантах осуществления субъекту в данном случае (например, субъекту с риском развития тяжелого CRS или субъекту с идентифицированным риском развития тяжелого CRS) вводят однократную дозу ингибитора ИЛ-6 или ингибитора рецептора ИЛ-6 (ИЛ-6R) (например, тоцилизумаба). В вариантах осуществления субъекту вводят множество доз (например, 2, 3, 4, 5, 6 или более доз) ингибитора ИЛ-6 или ингибитора рецептора ИЛ-6 (ИЛ-6R) (например, тоцилизумаба).

**[0490]** В вариантах осуществления субъекту с низким риском развития или отсутствию риска развития CRS (например, с тяжелым CRS) (например, с идентифицированным статусом низкого риска развития тяжелого CRS) не назначают терапию для лечения СВК, описанную в данном документе, например, один или более из ингибиторов ИЛ-6 или ингибиторов рецептора ИЛ-6 (ИЛ-6R) (например, тоцилизумаба), вазоактивных препаратов, кортикостероидов, иммунодепрессантов или искусственной вентиляции легких.

**[0491]** В некоторых вариантах осуществления субъект, которого лечат способами, описанными в данном документе, имеет легкую степень тяжести CRS, например, 1 степень тяжести, 2 степень тяжести, или 3 степень тяжести.

**[0492]** В вариантах осуществления жизнеспособные клетки, экспрессирующие CAR, вводят в возрастающих дозах. В вариантах осуществления вторая доза больше первой дозы, например, больше на 10%, 20%, 30% или 50%. В вариантах осуществления вторая доза в два, три, четыре или пять раз превышает величину первой дозы. В вариантах осуществления третья доза больше второй дозы, например, больше на 10%, 20%, 30% или 50%. В вариантах осуществления третья доза в два, три, четыре или пять раз превышает величину второй дозы.

**[0493]** В некоторых вариантах осуществления способ включает один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или все из а)-h) из следующего:

**[0494]** а) количество экспрессирующих CAR жизнеспособных клеток, вводимых в первой дозе, составляет не более  $1/3$  от количества экспрессирующих CAR жизнеспособных клеток, вводимых во второй дозе;

**[0495]** б) количество экспрессирующих CAR жизнеспособных клеток, вводимых в первой дозе, не более  $1/X$ , где X равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 или 50 от общего числа введенных экспрессирующих CAR жизнеспособных клеток;

**[0496]** в) количество экспрессирующих CAR жизнеспособных клеток, вводимых в первой дозе, не более  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^7$ ,  $9 \times$



107, 1 x 108, 1,75 x 108, 2 x 108, 3 x 108, 4 x 108 или 5 x 108 экспрессирующих CAR жизнеспособных клеток, и вторая доза больше, чем первая доза;

**[0497]** d) количество экспрессирующих CAR жизнеспособных клеток, вводимых во второй дозе, составляет не более 1/2 от количества экспрессирующих CAR жизнеспособных клеток, вводимых в третьей дозе;

**[0498]** e) количество экспрессирующих CAR жизнеспособных клеток, вводимых во второй дозе, не превышает 1/Y, где Y равно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 или 50 от общего числа введенных экспрессирующих CAR жизнеспособных клеток;

**[0499]** f) количество экспрессирующих CAR жизнеспособных клеток, вводимых во второй дозе, не более 1 x 107, 2 x 107, 3 x 107, 4 x 107, 5 x 107, 6 x 107, 7 x 107, 8 x 107, 9 x 107, 1 x 108, 1,75 x 108, 2 x 108, 3 x 108, 4 x 108 или 5 x 108 экспрессирующих CAR жизнеспособных клеток, и третья доза больше, чем вторая доза;

**[0500]** h) дозировки и периоды времени введения первой, второй и необязательно третьей доз выбираются таким образом, чтобы у субъекта наблюдался CRS на уровне не выше 4, 3, 2 или 1.

**[0501]** В вариантах осуществления общая доза составляет около 5×108 экспрессирующих CAR жизнеспособных клеток. В вариантах осуществления общая доза составляет около 5×107-5×108 экспрессирующих CAR жизнеспособных клеток. В вариантах осуществления первая доза составляет около 5 x 107 (например, ± 10%, 20% или 30%) экспрессирующих CAR жизнеспособных клеток, вторая доза составляет около 1,5 x 108 (например, ± 10%, 20%, или 30%) экспрессирующих CAR жизнеспособных клеток, и третья доза составляет около 3×108 (например, ± 10%, 20% или 30%) экспрессирующих CAR жизнеспособных клеток.

**[0502]** В вариантах осуществления субъект оценивается на наличие CRS после получения дозы, например, после получения первой дозы, второй дозы и/или третьей дозы.

**[0503]** В вариантах осуществления субъект получает лечение CRS, например, тоцилизумаб, кортикостероид, этанерцепт или силтуксимаб. В вариантах осуществления лечение CRS проводят до или после первой дозы клеток, содержащих молекулу CAR. В вариантах осуществления лечение CRS проводят до или после второй дозы клеток, содержащих молекулу CAR. В вариантах осуществления лечение CRS проводят до или после третьей дозы клеток, содержащих молекулу CAR. В вариантах осуществления лечение CRS проводят между первой и второй дозами клеток, содержащих молекулу CAR, и/или между второй и третьей дозами клеток, содержащих молекулу CAR.

**[0504]** В вариантах осуществления субъекту с CRS после первой дозы, например, CRS 1, 2, 3 или 4 степени тяжести, вторую дозу вводят через по меньшей мере 2, 3, 4 или 5 дней после первой дозы. В вариантах осуществления субъекту с CRS после второй дозы, например, CRS 1, 2, 3 или 4 степени тяжести, третью дозу вводят через по меньшей мере 2, 3, 4 или 5 дней после второй дозы. В вариантах осуществления у субъекта с CRS после первой дозы введение второй дозы экспрессирующих CAR клеток отсрочивается по сравнению с тем, когда вторая доза была бы введена, если бы у субъекта не было CRS. В вариантах осуществления у субъекта с CRS после второй дозы введение третьей дозы экспрессирующих CAR клеток отсрочивается по сравнению с тем, когда третья доза была бы введена, если бы у субъекта не было CRS.

**[0505]** В вариантах осуществления у субъекта с раком с высокой степенью тяжести до введения первой дозы. В вариантах осуществления субъект имеет уровни бластных клеток в костном мозге по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25 %, 30%, 35%, 40%, 45% или 50%, например, по меньшей мере 5%. В вариантах осуществления субъект имеет рак стадии I, II, III или IV. В вариантах осуществления субъект имеет массу опухоли по меньшей мере 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 или 1000 г, например, в одной опухоли или во множестве опухолей.

**[0506]** В некоторых вариантах осуществления субъект имеет рак (например, колоректальный рак). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой заболевание, ассоциированное с экспрессией GCC, например, как описано в данном документе. В вариантах осуществления молекула CAR представляет собой молекулу CAR, как описано в данном документе.

**[0507]** В одном аспекте экспрессирующие CAR клетки, например, клетки, экспрессирующие CAR к GCC, получают с использованием лентивирусных вирусных векторов, таких как лентивирус. Полученные таким образом экспрессирующие CAR клетки будут иметь стабильную экспрессию CAR. Векторы, полученные из ретровирусов, таких как лентивирус, являются пригодными инструментами для достижения длительного переноса генов, поскольку они обеспечивают длительную стабильную интеграцию трансгена и его распространение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы имеют дополнительное преимущество перед векторами, полученными из онкоретровирусов, таких как вирусы мышиноного лейкоза, в том, что они могут трансдуцировать непролиферирующие клетки, такие как гепатоциты. Они также обладают дополнительным преимуществом низкой иммуногенности. Ретровирусный вектор также может представлять собой, например, гаммаретровирусный вектор. Гаммаретровирусный вектор может включать,

например, промотор, сигнал упаковки ( $\psi$ ), сайт связывания праймера (PBS), один или более (например, два) длинных концевых повтора (LTR) и представляющий интерес трансген, например, ген, кодирующий CAR. Гаммаретровирусный вектор может не иметь вирусных структурных генов, таких как gag, pol и env. Примеры гаммаретровирусных векторов включают вирус лейкемии мышей (MLV), вирус некроза селезенки (SFFV), и вирус миелопролиферативной саркомы (MPSV) и полученные из них векторы. Другие гаммаретровирусные векторы описаны, например, в Tobias Maetzig et al, "Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application" Viruses. 2011 Jun; 3(6): 677-713.

**[0508]** В одном аспекте экспрессирующие CAR клетки транзистентно экспрессируют векторы CAR в течение 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 дней после трансдукции. На транзистентную экспрессию CAR может влиять доставка РНК-вектора CAR. В одном аспекте РНК CAR трансдуцируют в Т-клетку путем электропорации.

**[0509]** Потенциальной проблемой, которая может возникнуть у пациентов, получающих лечение с помощью Т-клеток, транзистентно экспрессирующих CAR (в частности с помощью экспрессирующих CAR Т-клеток, несущих мышинный scFv), является анафилаксия после проведения нескольких курсов лечения. Не ограничиваясь данной теорией, считается, что подобный анафилактический ответ может быть вызван развивающимся гуморальным ответом против CAR у пациента, т. е. антителами к CAR, имеющими изотип против IgE. Полагают, что клетки пациента, вырабатывающие антитела, подвергаются переключению класса с изотипа IgG (который не вызывает анафилаксию) на изотип IgE, когда существует перерыв в воздействии антигена, составляющий от десяти до четырнадцати дней.

**[0510]** Если у пациента имеется высокий риск образования антител к CAR во время курса временной терапии CAR (например, вызванной трансдукцией РНК), перерывы в инфузии клеток, экспрессирующих CAR, не должны длиться более десяти-четырнадцати дней.

### **Композиции**

**[0511]** В настоящем документе предложены композиции для применения в генной терапии, иммунотерапии и/или клеточной терапии, которые включают один или более описанных CAR, или Т-клеток, экспрессирующих CAR, антитела, антигенсвязывающие фрагменты, конъюгаты, CAR или Т-клетки, экспрессирующие CAR, который специфически связывается с одним или более антигенами, описанными в данном документе, в носителе (таком как фармацевтически приемлемый носитель). Композиции могут быть

приготовлены в виде единичных дозированных форм для введения субъекту. Количество и время введения находятся на усмотрении лечащего врача для достижения желаемого результата. Композиции могут быть приготовлены для системного (например, внутривенного) или местного (например, внутриопухолевого) введения. В одном примере раскрытые CAR или Т-клетки, экспрессирующие CAR, антитело, антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат, готовят для парентерального введения, такого как внутривенное введение. Композиции, содержащие CAR или Т-клетку, экспрессирующую CAR, конъюгат, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, можно использовать, например, для лечения и обнаружения опухоли, например, и не ограничиваясь этим, нейробластомы. В некоторых примерах композиции полезны для лечения или обнаружения карциномы. Композиции, содержащие CAR или Т-клетку, экспрессирующую CAR, конъюгат, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, также можно использовать, например, для обнаружения патологического ангиогенеза.

**[0512]** Композиции для введения могут включать раствор CAR или Т-клеток, экспрессирующих CAR, конъюгат, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые растворены в фармацевтически приемлемом носителе, таком как водный носитель. Можно использовать различные водные носители, например забуференный солевой раствор и т.п. Данные растворы являются стерильными и, как правило, не содержат нежелательных веществ. Данные композиции могут быть стерилизованы обычными, хорошо известными способами стерилизации. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения их к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH агенты и буферные агенты, агенты, регулирующие токсичность, адъювантные агенты и т.п., например, ацетат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, лактат натрия и т.п. Концентрация CAR или Т-клеток, экспрессирующих CAR, антитело или антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат, в этих составах может широко варьироваться и будет выбираться в первую очередь на основе объемов жидкости, вязкости, массы тела и т.п. в соответствии с выбранным способом введения и потребностями субъекта. Специалистам в данной области техники известны или очевидны актуальные способы получения таких дозированных форм для применения в генной терапии, иммунотерапии и/или клеточной терапии.

**[0513]** В некоторых вариантах осуществления композиция содержит CAR к GCC в сочетании с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами. Такие композиции могут содержать

буферы, например, нейтральный буферный раствор, фосфатно-буферный раствор и т.п.; углеводороды, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатные средства, такие как ЭДТА или глутатион; вспомогательные средства (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции по настоящему изобретению в одном аспекте составлены для внутривенного введения.

**[0514]** Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут вводиться таким способом, который соответствует заболеванию, подлежащему лечению (или предотвращению). Количество и частота введения будут определяться такими факторами, как состояние пациента, а также тип и степень тяжести заболевания пациента, хотя соответствующие дозы могут быть установлены в клинических исследованиях.

**[0515]** В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по существу не содержит, например, отсутствуют определяемые уровни загрязняющего вещества, например, выбранного из группы, состоящей из эндотоксина, микоплазмы, компетентного по репликации лентивируса (RCL), p24, нуклеиновой кислоты VSV-G, ВИЧ gag, остаточных частиц, покрытых антителами к CD3/CD28, мышинных антител, смешанной сыворотки человека, бычьего сывороточного альбумина, бычьей сыворотки, компонентов культуральной среды, упаковывающей вектор клетки или плазмидных компонентов, а также бактерии и гриба. В одном варианте осуществления бактерия представляет собой по меньшей мере одну, выбранную из группы, состоящей из *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes* группы А.

**[0516]** В одном аспекте настоящее изобретение относится к популяции экспрессирующих CAR клеток, например, CART-клеток или экспрессирующих CAR NK-клеток. В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам, включающим введение популяции экспрессирующих CAR клеток (например, CART-клеток или экспрессирующих CAR NK-клеток) в комбинации с другим агентом, например, ингибитором киназы, таким как ингибитор киназы, описанный в данном документе.

**[0517]** В еще одном аспекте изобретение относится к клетке, содержащей описанный в данном документе вектор. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку, описанную в данном документе, например, человеческую Т-клетку, например, человеческую Т-клетку, описанную в данном документе. В одном варианте осуществления Т-клетка человека представляет собой CD8<sup>+</sup> Т-клетку.

**[0518]** В еще одном аспекте изобретение относится к способу получения клетки, включающему трансдукцию клетки, описанной в данном документе, например, Т-клетки, описанной в данном документе, вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, например, CAR, описанный в данном документе.

**[0519]** Настоящее изобретение также относится к способу создания популяции клеток, сконструированных с помощью РНК, например, клеток, описанных в данном документе, например, Т-клеток, транзистентно экспрессирующих экзогенную РНК. Способ включает введение транскрибируемой *in vitro* РНК или синтетической РНК в клетку, где РНК содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую описанную в данном документе молекулу CAR.

**[0520]** В вариантах осуществления любого из способов и композиций, описанных в данном документе, клетка, содержащая CAR, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, представляет собой лентивирусный вектор. В одном варианте осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, вводят в клетки путем лентивирусной трансдукции. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая CAR, представляет собой РНК, например, РНК, транскрибируемую *in vitro*. В одном варианте осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, вводят в клетки путем электропорации.

**[0521]** В вариантах осуществления любого из способов и композиций, описанных в данном документе, клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку. В одном варианте осуществления Т-клетка представляет собой аутологичную или аллогенную Т-клетку.

**[0522]** Типичная композиция для внутривенного введения включает от около 0,01 до около 30 мг/кг антитела или антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата на субъекта в день (или соответствующую дозу CAR или Т-клеток, экспрессирующих CAR, конъюгат, включающий антитело или антигенсвязывающий фрагмент). Реальные способы приготовления композиций для введения известны или очевидны специалистам в данной области техники и более подробно описаны в таких публикациях, как Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1995).

**[0523]** CAR или Т-клетка, экспрессирующая CAR, антитела, антигенсвязывающие фрагменты или конъюгаты могут поставляться в лиофилизированной форме и регидратироваться стерильной водой перед введением, хотя они также поставляются в виде стерильных растворов известной концентрации. CAR или Т-клетки, экспрессирующие

CAR, антитело или антигенсвязывающий фрагмент или раствор конъюгата, затем добавляют в пакет для инфузии, содержащий 0,9% хлорида натрия, USP, и в некоторых случаях вводят в дозе от 0,5 до 15 мг/кг массы тела. В данной области техники имеется значительный опыт введения антител или антигенсвязывающих фрагментов и конъюгированных лекарственных средств; например, препараты на основе антител поступили в продажу в США с момента утверждения RITUXAN® в 1997 году. CAR или Т-клетка, экспрессирующая CAR, антитела, антигенсвязывающие фрагменты и их конъюгаты можно вводить путем медленной инфузии, а не путем внутривенного введения или болюса. В одном примере вводят более высокую нагрузочную дозу, а последующие поддерживающие дозы вводят на более низком уровне. Например, начальная нагрузочная доза 4 мг/кг антитела или антигенсвязывающего фрагмента (или соответствующая доза конъюгата, включающего антитело или антигенсвязывающий фрагмент) может вводиться путем инфузии в течение около 90 минут с последующим еженедельным введением поддерживающих доз в течение 4-8 недель по 2 мг/кг вводят в течение 30 минут, если предыдущая доза хорошо переносится.

**[0524]** Парентеральные составы с контролируемым высвобождением могут быть изготовлены в виде имплантатов, масляных растворов для инъекций или систем частиц. Для общего обзора систем доставки белков см. Banga, A.J., *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995). Системы частиц включают микросферы, микрочастицы, микрокапсулы, нанокapsулы, наносферы и наночастицы. Микрокапсулы содержат терапевтический белок, такой как цитотоксин или лекарственное средство, в качестве центрального ядра. В микросферах терапевтическое средство распределено по всей частице. Частицы, микросферы и микрокапсулы размером менее около 1 мкм обычно называют наночастицами, наносферами и нанокapsулами, соответственно. Капилляры имеют диаметр около 5 мкм, поэтому внутривенно вводятся только наночастицы. Микрочастицы, как правило, имеют диаметр около 100 мкм и вводятся подкожно или внутримышечно. См., например, Kreuter, J., *Colloidal Drug Delivery Systems*, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., pp. 219-342 (1994); и Tice & Tabibi, *Treatise on Controlled Drug Delivery*, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y., pp. 315-339, (1992).

**[0525]** Полимеры можно использовать для ионно-контролируемого высвобождения CAR или Т-клеток, экспрессирующих CAR, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или композиции конъюгатов, описанных в данном документе. В данной области техники известны различные разлагаемые и неразлагаемые полимерные матрицы для использования

в контролируемой доставке лекарственных средств (Langer, *Accounts Chem. Res.* 26:537-542, 1993). Например, блок-сополимер, полаксамер 407, существует в виде вязкой, но подвижной жидкости при низких температурах, но образует полутвердый гель при температуре тела. Было показано, что он является эффективным средством для составления и устойчивой доставки рекомбинантного интерлейкина-2 и уреазы (Johnston et al., *Pharm. Res.* 9:425-434, 1992; and Pec et al., *J. Parent. Sci. Tech.* 44(2):58-65, 1990). Альтернативно, гидроксипатит использовали в качестве микроносителя для контролируемого высвобождения белков (Jntema et al., *Int. J. Pharm.* 112:215-224, 1994). В еще одном аспекте липосомы используют для контролируемого высвобождения, а также для нацеливания лекарственного средства в липидной капсуле (Betageri et al., *Liposome Drug Delivery Systems*, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa. (1993)). Известны многочисленные дополнительные системы для контролируемой доставки терапевтических белков (см. патенты США № 5055303; 5188837; 4235871; 4501728; 4837028; 4957735; 5019369; 5055303; 5514670; 5413797; 5268164; 5004697; 4902505; 5506206; 5271961; 5254342 и 5534496).

## **Наборы**

**[0526]** В одном аспекте также предложены наборы, в которых используются CAR, описанные в данном документе. Например, наборы для лечения опухоли у субъекта или создания CAR-T-клетки, которая экспрессирует один или более CAR, описанных в данном документе. Наборы, как правило, включают описанное антитело, антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат, молекулу нуклеиновой кислоты, CAR, или T-клетку, экспрессирующую CAR, как описано в данном документе. В набор может быть включено более одного из описанных антител, антигенсвязывающих фрагментов, конъюгатов, молекул нуклеиновых кислот, CAR или T-клеток, экспрессирующих CAR.

**[0527]** Набор 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. Контейнер, как правило, содержит композицию, включающую одно или более описанных антител, антигенсвязывающих фрагментов, конъюгатов, молекул нуклеиновой кислоты, CAR или T-клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления контейнер может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). На этикетке или на листке-вкладыше указано, что композицию применяют для лечения конкретного патологического состояния.



**[0528]** Этикетка или листок-вкладыш, как правило, дополнительно включают инструкции по применению раскрытых антител, антигенсвязывающих фрагментов, конъюгатов, молекул нуклеиновых кислот, CAR или Т-клеток, экспрессирующих CAR, например, в способе лечения или предотвращения опухоли или создания CAR-Т-клетки. Листок-вкладыш, как правило, включает инструкции, обычно включаемым в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, противопоказаниях и/или предостережениях относительно применения таких терапевтических продуктов. Учебные материалы могут быть в письменном виде, в электронной форме (например, на компьютерной дискете или компакт-диске) или могут быть визуальными (например, в виде видеофайлов). Наборы могут также включать дополнительные компоненты для облегчения конкретного применения, для которого предназначен набор. Так, например, набор может дополнительно содержать средства для обнаружения метки (такие как ферментные субстраты для ферментативных меток, наборы фильтров для обнаружения флуоресцентных меток, соответствующие вторичные метки, такие как вторичное антитело и т.п.). Наборы могут дополнительно включать буферы и другие реагенты, как правило, используемые для практического применения конкретного способа. Такие наборы и соответствующее их содержимое хорошо известны специалистам в данной области техники.

### **Стратегии регуляции химерных антигенных рецепторов**

**[0529]** Существует множество способов регуляции активности CAR. В некоторых вариантах осуществления регулируемый CAR (RCAR), в котором активность CAR можно контролировать, желателен для оптимизации безопасности и эффективности терапии CAR. Например, индукцию апоптоза с использованием, например, каспазы, слитой с доменом димеризации, (см., например, Di et al., *N Engl. J. Med.* 2011 Nov. 3; 365(18):1673- 1683), можно использовать в качестве защитного переключателя в терапии CAR по настоящему изобретению. В еще одном примере экспрессирующие CAR клетки могут также экспрессировать молекулу индуцируемой каспазы-9 (iCaspase-9), которая при введении димеризирующего лекарственного средства (например, римидуцида (также называемого AP1903 (Bellicum Pharmaceuticals) или AP20187 (Ariad)) приводит к активации каспазы-9 и апоптозу клеток. Молекула iCaspase-9 содержит домен связывания химического индуктора димеризации (CID), который опосредует димеризацию в присутствии CID. Это приводит к индуцируемому и селективному истощению экспрессирующих CAR клеток. В некоторых случаях молекула iCaspase-9 кодируется молекулой нуклеиновой кислоты, отдельной от вектора(-ов), кодирующего CAR. В некоторых случаях молекула iCaspase-9 кодируется той

же молекулой нуклеиновой кислоты, что и кодирующий CAR вектор. iCaspase-9 может обеспечить защитный переключатель, чтобы избежать любой токсичности клеток, экспрессирующих CAR. См., например, Song et al. *Cancer Gene Ther.* 2008; 15(10):667-75; Clinical Trial Id. No. NCT02107963; и Di Stasi et al. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365:1673-83.

**[0530]** Альтернативные стратегии регулирования терапии CAR по настоящему изобретению включают применение низкомолекулярных препаратов или антител, которые деактивируют или блокируют активность CAR, например, путем удаления клеток, экспрессирующих CAR, например, путем индукции антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ). Например, экспрессирующие CAR клетки, описанные в данном документе, могут также экспрессировать антиген, который распознается молекулами, способными индуцировать гибель клеток, например, АЗКЦ или гибель клеток, индуцированную комплементом. Например, экспрессирующие CAR клетки, описанные в данном документе, могут также экспрессировать рецептор, на который может быть нацелено антитело или фрагмент антитела. Примеры таких рецепторов включают ЕрсАМ, VEGFR, интегрины (например, интегрины  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 1 \beta 3$ ,  $\alpha 4 \beta 7$ ,  $\alpha 5 \beta 1$ ,  $\alpha n \beta 3$ ,  $\alpha n$ ), члены надсемейства рецепторов TNF (например, TRAIL-R1, TRAIL-R2), рецептор PDGF, рецептор интерферона, рецептор фолиевой кислоты, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, рецептор IL-6, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD11, CD11a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, рецептор CD23/IgE, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/басигин, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7 и EGFR, а также их укороченные версии (например, версии, сохраняющие один или более внеклеточных эпитопов, но лишенные одной или более областей внутри цитоплазматический домен). Например, экспрессирующие CAR клетки, описанные в данном документе, могут также экспрессировать укороченный рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), который не обладает сигнальной способностью, но сохраняет эпитоп, распознаваемый молекулами, способными индуцировать АЗКЦ, например, цетуксимаб (ERBITUX®), так что введение цетуксимаба индуцирует АЗКЦ и последующее истощение клеток, экспрессирующих CAR (см., например, WO2011/056894 и Jonnalagadda et al., *Gene Ther.* 2013; 20(8)853-860).

**[0531]** Другая стратегия включает экспрессию высококомпактного маркерного/суицидного гена, который объединяет эпитопы-мишени антигенов CD32 и CD20 в клетках, экспрессирующих CAR, описанных в настоящем документе, который связывает ритуксимаб, что приводит к селективному истощению клеток, экспрессирующих

CAR, например, с помощью АЗКЦ (см., например, Philip et al., Blood. 2014; 124(8)1277-1287). Другие способы истощения экспрессирующих CAR клеток, описанные в данном документе, включают введение CAMPATH®, моноклонального антитела к CD52, которое селективно связывает и нацелено на зрелые лимфоциты, например, экспрессирующие CAR клетки, для разрушения, например, путем индукции АЗКЦ. В других вариантах осуществления экспрессирующие CAR клетки могут быть селективно нацелены с использованием лиганда CAR, например, антиидиотипического антитела. В некоторых вариантах осуществления антиидиотипическое антитело может вызывать активность эффекторных клеток, например активность АЗКЦ или ADC, тем самым снижая количество экспрессирующих CAR клеток. В других вариантах осуществления лиганд CAR, например, антиидиотипическое антитело, может быть связан с агентом, вызывающим гибель клеток, например, токсином, тем самым уменьшая количество экспрессирующих CAR клеток. В качестве альтернативы, сами молекулы CAR могут быть сконфигурированы таким образом, чтобы их активность можно было регулировать, например, включать и выключать, как описано ниже.

**[0532]** В некоторых вариантах осуществления RCAR содержит набор полипептидов, обычно два в простейших вариантах осуществления, в которых компоненты стандартного CAR, описанные в данном документе, например, антигенсвязывающий домен и внутриклеточный сигнальный домен, разделены на отдельные полипептиды или члены. В некоторых вариантах осуществления набор полипептидов включает переключатель димеризации, который в присутствии молекулы димеризации может связывать полипептиды друг с другом, например, может связывать антигенсвязывающий домен с внутриклеточным сигнальным доменом.

**[0533]** Дополнительное описание и иллюстративные конфигурации таких регулируемых CAR представлены в данном документе и в международной публикации № WO 2015/090229, полностью включенной в данный документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления RCAR содержит два полипептида или члена: 1) внутриклеточный сигнальный член, содержащий внутриклеточный сигнальный домен, например, первичный внутриклеточный сигнальный домен, описанный в данном документе, и первый домен переключения; 2) антигенсвязывающий член, содержащий антигенсвязывающий домен, например, который нацеливается на опухолевый антиген, описанный в данном документе, как описано в данном документе, и второй домен переключения. Необязательно, RCAR содержит описанный в данном документе трансмембранный домен. В одном варианте осуществления трансмембранный домен может быть расположен во внутриклеточном

сигнальном элементе, в антигенсвязывающем элементе или в обоих. (Если не указано иное, когда в данном документе описываются члены или элементы RCAR, порядок может быть таким, как предусмотрено, но также включаются другие порядки. Другими словами, в варианте осуществления порядок указан в тексте, но в других вариантах осуществления порядок может быть другим. Например, порядок элементов на одной стороне трансмембранной области может отличаться от приведенного в примере, например, расположение домена переключения относительно внутриклеточного сигнального домена может быть другим (например, обратным).

**[0534]** В варианте осуществления первый и второй домены переключения могут образовывать внутриклеточный или внеклеточный переключатель димеризации. В одном варианте осуществления переключатель димеризации может представлять собой переключатель гомодимеризации, например, когда первый и второй домены переключения являются одними и теми же, или переключатель гетеродимеризации, например, когда первый и второй домены переключения отличаются друг от друга.

**[0535]** В вариантах осуществления RCAR может содержать «мультипереключатель». Мультипереключатель может содержать домены переключения гетеродимеризации или домены переключения гомодимеризации. Мультипереключатель содержит множество, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 доменов переключения независимо в первом члене, например, антигенсвязывающем элементе, и втором элементе, например, внутриклеточном сигнальном члене. В варианте осуществления первый элемент может содержать множество первых доменов переключения, а второй элемент может содержать множество вторых доменов переключения. В варианте осуществления первый элемент может содержать первый и второй домены переключения, а второй элемент может содержать первый и второй домены переключения.

**[0536]** В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный член содержит один или более внутриклеточных сигнальных доменов, например, первичный внутриклеточный сигнальный домен и один или более костимулирующих сигнальных доменов.

**[0537]** В одном варианте осуществления антигенсвязывающий член может содержать один или более внутриклеточных сигнальных доменов, например, один или более костимулирующих сигнальных доменов. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий член содержит множество, например, 2 или 3 костимулирующих сигнальных домена, описанных в данном документе, например, выбранных из 4-1BB, CD28, CD27, ICOS и OX40, и в вариантах осуществления не содержит первичный

внутриклеточный сигнальный домен. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий член содержит следующие костимулирующие сигнальные домены, от внеклеточного к внутриклеточному направлению: 4-1BB-CD27; CD27-4-1BB; 4-1BВCD28; CD28-4-1BB; OX40-CD28; CD28-OX40; CD28-4-1BB; или 4-1BB-CD28. В таких вариантах осуществления внутриклеточный связывающий член содержит домен CD3-дзета. В одном таком варианте осуществления RCAR содержит (1) антигенсвязывающий элемент, содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и два костимулирующих домена, а также первый домен переключения; и (2) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий трансмембранный домен или домен прикрепления к мембране и по меньшей мере один первичный внутриклеточный сигнальный домен, и второй домен переключения.

**[0538]** В одном варианте осуществления предложены RCAR, в которых антигенсвязывающий член не связан с поверхностью CAR-клетки. Это позволяет удобно соединять клетку, имеющую внутриклеточный сигнальный член, с одним или более антигенсвязывающими доменами без трансформации клетки последовательностью, кодирующей антигенсвязывающий член. В таких вариантах осуществления RCAR содержит: 1) внутриклеточный сигнальный элемент, содержащий: первый домен переключения, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен, например, первичный внутриклеточный сигнальный домен и первый домен переключения; и 2) антигенсвязывающий член, содержащий: антигенсвязывающий домен и второй домен переключения, при этом антигенсвязывающий член не содержит трансмембранный домен или домен прикрепления к мембране и, необязательно, не содержит внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления RCAR может дополнительно содержать 3) второй антигенсвязывающий член, содержащий: второй антигенсвязывающий домен, например, второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген, отличный от того, который связывается антигенсвязывающим доменом; и второй домен переключения.

**[0539]** В данном документе также предложены RCAR, в которых антигенсвязывающий член обладает биспецифической способностью к активации и нацеливанию. В этом варианте осуществления антигенсвязывающий член может содержать множество, например, 2, 3, 4 или 5 антигенсвязывающих доменов, например, scFv, где каждый антигенсвязывающий домен связывается с антигеном-мишенью, например, разными антигенами или одним и тем же антигеном, например, одинаковыми или разными эпитопами на одном и том же антигене. В одном варианте осуществления множество

антигенсвязывающих доменов расположены последовательно, и, необязательно, между отдельными антигенсвязывающими доменами расположен линкер или шарнирная область. Подходящие линкеры и шарнирные области описаны в данном документе.

**[0540]** В варианте осуществления предложены RCAR, имеющие конфигурацию, позволяющую переключать пролиферацию. В этом варианте осуществления RCAR содержит: 1) внутриклеточный сигнальный элемент, содержащий: необязательно трансмембранный домен или домен прикрепления к мембране; один или более костимулирующих сигнальных доменов, например, выбранных из 4-1BB, CD28, CD27, ICOS и OX40, и домена переключателя; и 2) антигенсвязывающий элемент, содержащий: антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и первичный внутриклеточный сигнальный домен, например, домен CD3-дзета, где антигенсвязывающий элемент не содержит домен переключения, или не содержит домен переключения, который димеризуется с доменом переключения во внутриклеточном сигнальном элементе. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий член не содержит костимулирующий сигнальный домен. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный член содержит домен переключения из переключателя гомодимеризации. В одном варианте осуществления внутриклеточный сигнальный элемент содержит первый домен переключения из переключателя гетеродимеризации, а RCAR содержит второй внутриклеточный сигнальный элемент, который содержит второй домен из переключателя гетеродимеризации. В таких вариантах осуществления второй внутриклеточный сигнальный член содержит те же внутриклеточные сигнальные домены, что и внутриклеточный сигнальный член. В одном варианте осуществления переключатель димеризации является внутриклеточным. В одном варианте осуществления переключатель димеризации является внеклеточным.

**[0541]** Также в данном документе предложены нуклеиновые кислоты и векторы, содержащие последовательности, кодирующие RCAR. Последовательности, кодирующие различные элементы RCAR, могут находиться в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты, например, в одной и той же плазмиде или векторе, например, вирусном векторе, например, лентивирусном векторе.

**[0542]** В одном варианте осуществления (i) последовательность, кодирующая антигенсвязывающий элемент, и (ii) последовательность, кодирующая внутриклеточный сигнальный элемент, могут присутствовать в одной и той же нуклеиновой кислоте, например, векторе. Продуцирование соответствующих белков может быть достигнуто, например, с использованием отдельных промоторов или с использованием продукта

бицистронной транскрипции (что может привести к продукции двух белков путем расщепления одного продукта трансляции или путем трансляции двух белков отдельных белковых продуктов). В одном варианте осуществления последовательность, кодирующая расщепляемый пептид, например последовательность P2A или F2A, расположена между (i) и (ii). В одном варианте осуществления последовательность, кодирующая IRES, например, IRES EMCV или EV71, расположена между (i) и (ii). В этих вариантах осуществления (i) и (ii) транскрибируются как одна РНК. В одном варианте осуществления первый промотор функционально связан с (i), а второй промотор функционально связан с (ii), так что (i) и (ii) транскрибируются как отдельные мРНК.

**[0543]** Альтернативно, последовательность, кодирующая различные элементы RCAR, может находиться в разных молекулах нуклеиновой кислоты, например, в разных плаزمиды или векторах, например, в вирусном векторе, например, в лентивирусном векторе. Например, (i) последовательность, кодирующая антигенсвязывающий член, может находиться в первой нуклеиновой кислоте, например, первом векторе, и (ii) последовательность, кодирующая внутриклеточный сигнальный член, может находиться во второй нуклеиновой кислоте, например, втором векторе.

**[0544]** Если не указано иное, все технические и научные термины и фразы, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, можно использовать при практической реализации или испытании настоящего изобретения, далее описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки.

**[0545]** Стандартные методики могут быть использованы для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, а также культуры и трансформации тканей (например, электропорация, липофекция). Методики ферментативных реакций и очищения могут осуществляться в соответствии с указаниями производителя или как обычно принято в данной области техники, или как описано в данном документе. Приведенные выше методики и процедуры могут, как правило, выполняться в соответствии с обычными способами, хорошо известными в данной области техники, и как описано в различных общих и более конкретных справочных материалах, которые указаны и обсуждены в данном описании. См. например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2-е изд., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y. (1989)), которая включена в данный документ посредством ссылки для любых целей.

**[0546]** Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упоминаемые в данном документе, в полном объеме включены посредством ссылки. Данное изобретение станет более понятным из следующих примеров.

## **ПРИМЕРЫ**

**[0547]** Эти примеры приведены для помощи в понимании изобретения, но не предназначены и не должны толковаться как ограничивающие каким-либо образом его объем. Примеры не включают подробное описание обычных способов, которые были бы хорошо известны специалистам в данной области техники (методы молекулярного клонирования и т.д.).

### **Пример 1. Выделение и селекция антител VH к GCC**

**[0548]** Были созданы однодоменные антитела, содержащие только тяжелые цепи, (vH), которые специфически нацелены на человеческий GCC (например, связывающие вещества к GCC, представленные в таблицах 1-3). Как показано в таблице 5, рекомбинантные однодоменные конструкции VH к GCC оценивали на аффинность связывания с GCC *in vitro*. Кинетику связывания определяли с использованием анализа связывания Octet. Они были измерены биослойным интерферометром в реальном времени на основе биосенсора Octet (ForteBio). Все исследования связывания проводили в буфере для кинетических исследований Octet HBS-ET. Между стадиями биосенсоры всегда промывали буфером для кинетических исследований Octet. Была проведена серия двукратных разведений каждой VH по семи точкам. Время контакта для каждой из стадий ассоциации составляло 300 секунд, а стадия диссоциации была в диапазоне 400-600 секунд. Константы скорости кинетической ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли путем обработки и аппроксимации данных к модели связывания 1:1 с использованием программного обеспечения ForteBio Analysis. Рассчитанные константы аффинности и кинетики показаны в таблице 5.

**[0549]** Связывание однодоменных антител с клетками CT26 измеряли с помощью проточной цитометрии. Клетки CT26 инкубировали с серийно разведенной VH и измеряли флуоресценцию с помощью проточной цитометрии. Было подтверждено, что антитела VH к GCC связываются с клетками CT26 с помощью анализа доза-ответ на основе FACS с получением EC50 связывания клеток (нМ), как показано в таблице 5.

*Таблица 5. Аффинность связывания антител VH к GCC*



Агент, связывающий антиген GCC	Koff (1/с)	KD(M)	EC50 связывания клеток (M)
V1	0,00020795	3.935E-10	7.2E-10
V5	0,000718667	7.713E-09	1.52E-09
V36	0,0035	0,000000105	Н/Д
V48	0,000341	1.375E-09	1.01E-09
V51	0,00185	9.544E-09	Н/Д

**[0550]** Для определения стабильности конструкции VH подвергали эксклюзионной хроматографии (ЭХ). Вкратце, очищенные VH хранили в различных концентрациях в буфере PBS в течение ночи при 4°C, а затем анализировали в различные моменты времени с использованием колонки для ЭХ. Образцы вводили в натрий-фосфатный буфер. Данные собирали в зависимости от времени и рассчитывали площадь пика мономера, оставшегося после хранения, по сравнению с площадью пика, присутствующей в начале (T=0). Результаты по стабильности получали, как показано в таблице 6 ниже.

*Таблица 6. Стабильность в течение ночи с использованием ЭХ*

Антитело VH к GCC	% мономера при 4°C (%)	Чистота (%)	КТ (мин)
V1	108,4	91,5	3,586
V5	123,04	79,2	3,17
V36	92,43	79,36	3,08
V48	104,54	73,91	3,208
V51	109,2	59,22	3,304

**[0551]** ИФА проводили для измерения связывания VH с человеческими легкими цепями. Значения связывания для каждого из VH (измеряемые при ОП450 нм) были менее 0,1, что является фоновым сигналом для этого анализа.

## **Пример 2. Дизайн и характеристика химерных антигенных рецепторов к GCC**

**[0552]** Конструкции химерного антигенного рецептора конструируют так, чтобы они включали внеклеточный связывающий домен (например, связывающую последовательность к GCC), содержащий однодоменные антитела, описанные выше (например, VH, представленные в таблице 2 или таблице 3). Конструкции CAR-T создают путем связывания связывающей последовательности в рамке с шарнирными/трансмембранными доменами CD28 и костимулирующим доменом и сигнальным доменом CD3 дзета-1xx. Схемы иллюстративных конструкций CAR показаны на Фиг. 1А и 1В. Иллюстративные последовательности конструкции CAR, протестированные в этом примере, представлены в таблице 4. Ожидается, что V1 (SEQ ID NO:1) и V1-01 (SEQ ID NO:20) будут функционировать в приведенных ниже примерах.

**[0553]** Нуклеиновые кислоты, кодирующие последовательности конструкции CAR (SEQ ID No: 61-70), клонировали в остов ретровирусной плазмиды. Супернатанты, содержащие ретровирусный вектор, получали путем транзientной трансфекции клеток phenix ampho (ATCC CRL-3213), и супернатанты, содержащие ретровирусный вектор, собирали и хранили при -80°C.

**[0554]** Первичные Т-клетки человека от здоровых доноров очищали из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), выделенных из лейкопаков (приобретенных у коммерческого поставщика с письменного согласия донора), с использованием иммуномагнитной селекции CD3<sup>+</sup> клеток в соответствии с протоколом производителя (набор для выделения человеческих Т-клеток EasySep™, Stem Cell Technologies #17951). Т-клетки культивировали в среде X-vivo 15 (Lonza #04-744Q) с добавлением 10% пенициллин/стрептомицина (Gibco 15140-122) и 2 нг/мл IL-2 (Miltenyi 130-097-743) при плотности 1 млн клеток/мл. Клетки активировали реагентом CD3/CD28 MACS® T Cell TransAct (Miltenyi Biotec MACS #130-111-160) и трансдуцировали на 2-й или 3-й день ретровирусными векторами, кодирующими конструкции CAR, в течение ночи. На следующий день культуры CAR-T-клеток переносили в шестилуночный планшет G-Rex6® (WilsonWolf P/N 80240M) и размножали в среде X-vivo 15 (Lonza #04-744Q) с добавлением 10% пенициллина/стрептомицина (Gibco 15140-122) и 2 нг/мл ИЛ-2 (Miltenyi 130-097-743) до сбора на 7-10 день. Смену среды и восполнение IL-2 проводили каждые 2-3 дня.

**[0555]** Экспрессию CAR-T-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием антитела к EGFR (R&D Systems: FAB9577R) или растворимого рекомбинантного белка внеклеточного домена GCC для поверхностной экспрессии CAR.

### Пример 3. Активность Т-клеток с CAR к GCC *in vitro*

[0556] В настоящем примере описана активность Т-клеток с CAR к GCC *in vitro*. CAR-Т-клетки, экспрессирующие CAR к GCC (SEQ ID NO: 48-52), исследовали на цитотоксичность в отношении GCC-экспрессирующих и GCC-отрицательных линий раковых клеток-мишеней. Линии раковых клеток-мишеней включали GSU, LS1034 и HT55, которые эндогенно экспрессируют GCC, а также HT29-GCC, линию клеток колоректального рака человека, сконструированную для стабильной экспрессии GCC, и ее линию клеток с векторным контролем, которая является GCC-отрицательной, HT29-vec. Каждую линию клеток-мишеней высевали в 384-луночный планшет и добавляли Т-клетки с CAR к GCC или нецелевые CAR-Т клетки (отрицательный контроль) в соотношении эффектор-мишень (Е:Т) 10:1, 3:1, 1:1 и 0,3:1. В качестве контроля использовали лунки только с клетками-мишенями и лунки только с эффекторными клетками. Через два дня жизнеспособность клеток измеряли с помощью One Solution Assay от CellTiter-Glo® (Promega, G8462). Процентную жизнеспособность клеток-мишеней рассчитывали по сигналам люминесценции лунок с совместными культурами после первого вычитания сигналов лунок только с эффекторными клетками, а затем деления на сигналы лунок только с клетками-мишенями. Процент уничтожения рассчитывали путем вычитания процента жизнеспособности клеток-мишеней из 100% Т-клеток с CAR к GCC.

[0557] Связывающие вещества VH к GCC продемонстрировали уничтожение линий клеток-мишеней, экспрессирующих GCC, в отличие от нецелевых Т-клеток с CAR к CD19 (1928z-1xx), используемых в качестве контроля. Как показано на Фиг. 2A-2D, CAR-Т-клетки, экспрессирующие CAR к GCC, в отсутствие усеченного EGFR (tEGFR), продемонстрировали цитотоксичность *in vitro* в отношении экспрессирующих GCC клеток HT29-GCC, линии клеток колоректального рака человека HT29, сконструированной для стабильной экспрессии GCC) (Фиг. 2A); и эндогенно экспрессирующих GCC линии клеток GSU (Фиг. 2C) и LS1034 (Фиг. 2D). Как показано на Фиг. 3A-3D, CAR-Т-клетки, экспрессирующие CAR к GCC, в присутствии укороченного EGFR (tEGFR) (SEQ ID NO: 56-60), также продемонстрировали цитотоксичность *in vitro* в отношении экспрессирующих GCC клеток HT29-GCC (Фиг. 3A); GSU (Фиг. 3C) и LS1034 (Фиг. 3D). Столбцы представляют средние значения + стандартное отклонение из трех технических повторов. Данные являются репрезентативными для >3 независимых экспериментов, проведенных с Т-клетками с CAR к GCC от >3 доноров. Т-клетки с CAR к GCC не демонстрировали уничтожение GCC-отрицательных клеток HT29-vec (Фиг. 2B и Фиг. 3B), что указывает на то, что активность уничтожения Т-клеток с CAR к GCC была антигензависимой.

**[0558]** В дополнение к антиген-зависимому уничтожению клеток активность Т-клеток с CAR к GCC *in vitro* также оценивали путем оценки их антиген-зависимой секреции IFN $\gamma$  и IL2. Т-клетки с CAR к GCC со связывающими веществами VH к GCC совместно культивировали с экспрессирующими GCC и отрицательными по GCC линиями раковых клеток-мишеней при соотношениях E:T 10:1, 3:1, 1:1 и 0,3:1. Супернатант собирали через два дня совместного культивирования. Секретируемые IFN $\gamma$  и IL2 в супернатанте определяли с помощью набора Intellicyt QBeads Human PlexScreen (Sartorius, 90702). Т-клетки с CAR к GCC со всеми связывающими веществами VH секретируют IFN $\gamma$  как в присутствии tEGFR (5A-5D), так и в его отсутствие (4A-4D) при совместном культивировании с клетками-мишенями, экспрессирующими GCC, но не при совместном культивировании с GCC-отрицательными клетками-мишенями (Фиг. 4B и 5B), что указывает на антиген-зависимое высвобождение цитокинов. Т-клетки с CAR к GCC со всеми связывающими веществами VH секретируют IL2 как в присутствии (7A-7D), так и в отсутствие tEGFR (6A-6D) при совместном культивировании с клетками-мишенями, экспрессирующими GCC, но не при совместном культивировании с GCC-отрицательными клетками-мишенями (Фиг. 6B и 7B), что указывает на антиген-зависимое высвобождение цитокинов.

#### **Пример 4. Активность Т-клеток с CAR к GCC *in vivo***

**[0559]** В настоящем примере описана активность Т-клеток с CAR к GCC *in vivo*. Противоопухолевую активность Т-клеток с CAR к GCC с различными связывающими веществами VH изучали на множественных моделях опухолевых ксенотрансплантатов колоректального рака человека, эндогенно экспрессирующих гуанилатциклазу С (GCC). Мышам с диабетом без ожирения/тяжелым комбинированным иммунодефицитом/ $\gamma$ -цепью-/- (NSG) инокулировали подкожно клетки HT55, клетки LS1034 или клетки GSU. Когда средний объем опухоли достигал приблизительно 150 мм<sup>3</sup>, Т-клетки с CAR к GCC или ложно-трансдуцированные Т-клетки (нецелевые CAR-T) вводили внутривенно (в/в) однократно. Различные уровни доз и донорские источники оценивали и обозначали, как показано на Фиг. 8A-18. Объем опухоли и массу тела измеряли два раза в неделю в течение 50 дней.

**[0560]** Изменение среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (40 дней) определяли в модели HT55 (эндогенно экспрессирующей GCC колоректальный рак,

гистологический счет H-score для GСC = 300/300), которую лечили Т-клетками с CAR к GСC, полученными из двух разных здоровых доноров D393 (Фиг. 8А) и D686 (Фиг. 8В). Изменение среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (42 дня) определяли на модели HT55, которую лечили Т-клетками с CAR к GСC, полученными от трех разных здоровых доноров D393 (Фиг. 9А), D797 (Фиг. 9В) и D954 (Фиг. 9С). Изменение среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (42 дня) определяли на модели HT55, которую лечили коэкспрессирующими tEGFR Т-клетками с CAR к GСC, полученными от здоровых доноров D393 (Фиг. 10А), D797 (Фиг. 10В) и D954 (Фиг. 10С), и которую лечили Т-клетками с CAR к GСC в отсутствие tEGFR, полученными от здоровых доноров D393. Изменение среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (42 дня) определяли на модели HT55, которую лечили Т-клетками с CAR к GСC, полученными от трех разных здоровых доноров D393 (Фиг. 11А), D954 (Фиг. 11В) и D686 (Фиг. 11С). Изменение среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (42 дня) определяли на модели HT55, которую лечили коэкспрессирующими tEGFR Т-клетками с CAR к GСC v48, полученными от здоровых доноров D393 (Фиг. 12А), D954 (Фиг. 12В) и D686 (Фиг. 12С) в дозах 0,25×10<sup>6</sup> CAR+ клеток, 0,5×10<sup>6</sup> CAR+ клеток или 1×10<sup>6</sup> CAR+ клеток.

**[0561]** Изменение среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (42 дня) определяли в модели GSU (эндогенно экспрессирующий GСC рак желудка, гистологический счет H-score для GСC = 170/300), которую лечили Т-клетками с CAR к GСC, полученными от двух здоровых доноров D393 (Фиг. 13А), D954 (Фиг. 13В), D393 (Фиг. 15А), D954 (Фиг. 15В) и D686 (Фиг. 15С) в отсутствие tEGFR. Изменение среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (42 дня) определяли в модели GSU (эндогенно экспрессирующий GСC рак желудка, гистологический счет H-score для GСC = 170/300), которую лечили коэкспрессирующими tEGFR Т-клетками с CAR к GСC, полученными от разных здоровых доноров D393 (Фиг. 14А) и D954 (Фиг. 14В), D393 (Фиг. 16А), D954 (Фиг. 16В) и D686 (Фиг. 16С).

**[0562]** Изменение среднего объема опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от времени (42 дня) определяли в модели LS1034 (эндогенно экспрессирующий GСC колоректальный рак, гистологический счет H-score для GСC = 300/300), которую лечили Т-клетками CAR к GСC, полученными от здорового донора с коэкспрессией tEGFR (Фиг. 18) или в отсутствие tEGFR (Фиг. 17).

**[0563]** Однократное внутривенное введение Т-клеток с CAR к GСC от нескольких доноров приводило к значительному ингибированию роста опухоли во всех моделях опухолей по сравнению с их соответствующей контрольной группой. Не наблюдали

значительной потери массы тела у мышей NSG с опухолями LS1034 или GSU, получавших Т-клетки с CAR к GCC, по сравнению с их соответствующей контрольной группой. В модели опухоли HT-55 наблюдаемая потеря массы тела обусловлена опухолевой массой. Снижение опухолевой массы после лечения Т клетками с CAR к GCC приводит к увеличению массы тела.

**[0564]** Таким образом, после описания нескольких аспектов по меньшей мере одного варианта осуществления настоящего изобретения следует понимать, что специалистам в данной области техники будут очевидны различные изменения, модификации и усовершенствования. Предполагается, что такие изменения, модификации и усовершенствования являются частью настоящего изобретения и находятся в пределах сущности и объема изобретения. Соответственно, вышеприведенное описание и фигуры приведены только в качестве примера, и изобретение подробно описывается следующей формулой изобретения.

#### **Таблица последовательностей**

**[0565]** В таблице 7 ниже приведены описания и последовательности, описанные в данном документе.

*Таблица 7. Таблица последовательностей*

<b>SEQ ID NO</b>	<b>Описание</b>	<b>Последовательность</b>
1	V1 vH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWS WFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKS RVAMS VDTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWS EWNSDLWGRGTLTVSS
2	CD8 transmembrane domain	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
3	4-1BB Intracellular domain	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCEL

4	CD3-zeta signaling domain	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM AEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR
5	Hinge sequence	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH TRGLDFACD
6	Leader Sequence (v1)	MKHLWFFLLLVAAPRWVLS
7	Leader Sequence (v5, v36, v48, v51)	MELGLSWVFLVAILEGVQC
8	V1 HCDR1	HYYWS
9	V5 HCDR1	RYWMS
10	V36 HCDR1	RYWMT
10	V48 HCDR1	RYWMT
10	V51 HCDR1	RYWMT
11	V1 HCDR2	RIYPSGSTSYPNSLKS
12	V5 HCDR2	KIRHDGGEKYYVDSVKG
13	V36 HCDR2	KIKYDGSEKYYADSVKG
14	V48 HCDR2	KIRHDGGEKYYPDSVKG
15	V51 HCDR2	KIRHDGGEKYYADSVKG
16	V1 HCDR3	DRSTGWSEWNSDL
17	V5 HCDR3	DYTRDV
18	V36 HCDR3	DYNKDY
19	V48 HCDR3	DYNKDL
18	V51 HCDR3	DYNKDY
20	V1	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWS WFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYPNSLKS RVAMS VDTPKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWS EWNSDLWGRGTLVTVSS
21	V5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWM SWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKG R FTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYT RDVWGQGTAVTVSS

22	V8	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWM SWVRQAPGKGLEWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGR FTISRDNKNSVYLQMNSLRAEDTGVYYCATDFT RDVWGQGTTVTVSS
23	V9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWM TWVRQAPGRGLEWVAKIRYDGGEKYYVDSVKGR FTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFT RDVWGQGTTVTVSS
24	V30	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFGRYWM SWVRQAPGKGREWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGR FTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFT RDVWGQGTTVTVSS
25	V31	QVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTFSRYWM SWVRQAPGKGREWVAKIKYDGSEKYYADSVKGR FTISRDNKNSLYLQMNSLRADDTAVYYCATDFT RDVWGQGTTVTVSS
26	V36	EVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWM TWVRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGR FTISRDNKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTRDYN KDYWGQGTLVTVSS
27	V48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWM TWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGR FTVSRDNKNSLYLQMDNLRAEDTAMYYCTRDY NKDLWGQGTLVTVSS
28	V51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWM TWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGR FTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDYN KDYWGQGTLVTVSS
29	CD28 hinge domain	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGP SKP
30	CD28 Transmembran e domain	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV



31	CD28 hinge/transmembrane domain	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGP SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
32	CD28 signal domain	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR DFAAYRS
33	CD3z-1XX mutant signaling domain	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKM AEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTF DALHMQALPPR
34	COMBINED CAR transmembrane and intracellular domains	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGP SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRS RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKD KMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKD TFDALHMQALPPR
35	V1-01 CAR	MGWSCIIFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSE TSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRI YPSGSTSYPNSLKS RVAMSVDTPKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTV SSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLF GPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSK RSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFA AYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQK DKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATK DTFDALHMQALPPR
36	V5 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWV AKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSS IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGP SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRS RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY

		RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKD KMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTATKD TFDALHMQUALPPR
37	V36 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPG GSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEWV AKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MDSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGLVTVSS IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRS RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR DFAAY RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNEL QKD KMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTAT KD TFDALHMQUALPPR
38	V48 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPG GSLRLTCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWV AKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNKNSLYLQ MDNLRAEDTAMYYCTRDYNKDLWGQGLVTVSS IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRS RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR DFAAY RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNEL QKD KMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTAT KD TFDALHMQUALPPR
39	V51 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWV AKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGLVTVSS IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV R SKRS RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR DFAAY RSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG

		RREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLFNE LQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLST ATKDTFDALHMQUALPPR
40	heat-stable enterotoxin	NTFYCCELCCNPACAGCY
41	GCC AA Sequence	MKTLLLDLALWLLFQPGWLSFSSQVSQNCHNGS YEISVLMMGNSAF AEPLKNLEDAVNEGLEIVRGRGL QNAGLNVTVNATFMYS DGLIHNSGDCRSSTCEGL DLLRKISNAQRMGCVLIGPSCTYSTFQMYLDTELS YPMISAGSFGLS CDYKETL TRLMSPARKLMYFLVN FWKTNDLPFKTYSWSTSYVYKNGTETEDCFWYLN ALEASVSYSFHELGFKV VLRQDKEFQDILMDHNR KSNVIIMCGGPEFLYKLGDR AEAEDIVILVDFLN DQYFEDNVTAPDYMKNV LVLTLSPGNSLLNSSFSR NLSPTKRDFALAYLNGILLFGHMLKIFLENGENITT PKFAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDVDSTMVLL YTSVDTKKYKVLLTYDTHVNKTYPVDMSPFTTW KNSKLPNDITGRGPQILMIAVFTLTGAVVLLLLVAL LMLRKYRKDYELRQKKW SHIPPENIFPLETNETNH VSLKIDDDKRRDTIQRLRQCKYDKKR VILKDLKHN DGNFTEKQKIELNKLLQIDYYNLTKFYGTVKLDT MIFGVIEYCERGLREVLNDTISYPDGT FMDWEFKI SVLYDIAKGMSYLHSSKTEVHGRLKSTNCVVDSR MVVKITDFGCNSILPPKKDLWTAPEHLRQANISQK GDVYSYGIIAQEILRKETFYTLSCRDRNEKIFRVEN SNGMKPFRPDLFLETAEEKELEVYLLVKNCWEED PEKRPDFKKIETT LAKIFGLFHDQKNESYMDTLIRR LQLYSRNLEHLVEERTQLYKAERDRADRLNFMLL PRLVVKSLKEKGFVEPELYEEVTIYFSDIVGFTTICK YSTPMEVVDMLNDIYKSFHDHVDHHDVYK VETIG DAYMVASGLPKRNGNRHAIDIAKMALEILSFMGT FELEHLPGLPIWIRIGVHSGPCAAGVVGIKMPRYCL FGDTVNTASRMESTGLPLRIHVSGSTIAILKRTECQ FLYEVRGETY LKGRGNETTYWLTGMKDQKFNLP

		PPTVENQQRLQAEFSDMIANSLOKRQAAGIRSQKP RRVASYYKGTLEYLQLNTTDKESTYF
42	лидер v31	MEFGLSWVFLVAIKGVQC
43	tEGFR	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDS LSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTP PLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFE NLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD GDVIISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNR GENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRN VSRGRECVDKCNLLEGEPPREFVENSECIQCHPECLP QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCRAG VMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGTGP GLEGCPTNGPKIPSIATGMVGAALLLVVALGIGLF M
44	P2A	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
45	Лидерная последователь ность	MALPVTALLPLALLHAARP
46	V1 CAR	MGWSCILFLVATATGVHS QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWS WFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKS RVAMS VDTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWS EWNSDLWGRGTLVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSN TIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVGGVLAC YSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPG PTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQ QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGFLNELQKDKMAEAFSEIGMKGERR RGKGDGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR
47	V1 CAR	MGWSCILFLVATATGVHS QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWS WFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKS RVAMS VDTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWS EWNSDLWGRGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNE

		KSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVVGG VLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT RRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAP AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKG ERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR
48	V1-01 CAR	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSE TSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRI YPSGSTSYPNSLKS RVAMSV DTPKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTV SSRAAAIEVMYPPPYLDNEK SNGTIIHVKGKHLCP SPLPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFW VRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP RDFAAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFN ELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLS TATKDTFDALHMQUALPPR
49	V5 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWV AKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEK SNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFW VRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRD FAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNEL QKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTA TKDTFDALHMQUALPPR
50	V36 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPG GSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEWV AKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MDSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTAVTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEK SNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFW VRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRD

		SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRD FAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNEL QKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTA TKDTFDALHMQALPPR
51	V48 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPG GSLRLTCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWV AKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQ MDNLRAEDTAMYCYTRDYNKDLWGQGTLVTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRD FAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNEL QKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTA TKDTFDALHMQALPPR
52	V51 CAR	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWV AKIRHDGGEKYYPADSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLVTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNE LQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLST ATKDTFDALHMQALPPR
53	Линкерная последователь ность	RAAA
54	Линкерная последователь ность	GGGGS

55	V1 CAR (28z1xx- tEGFR)	<p>MGWSCIIFLVATATGVHS</p> <p>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWS</p> <p>WFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKS RVAMS</p> <p>VDTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWS</p> <p>EWNSDLWGRGTLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNE</p> <p>KSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGG</p> <p>VLACYSLLVTVAFIIFWVRSKR S RLLHSDYMNMT P</p> <p>RRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAP</p> <p>AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE</p> <p>MGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKG</p> <p>ERRRGKGHDGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR</p> <p>GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP</p> <p>MLLVT SLLLCELPHPAFL LIPRKVCNGIGIGEFKDS</p> <p>LSINATNIKHFKNCT SISGDLHILPVAFRGDSFTHTP</p> <p>PLDPQELDILKT VKEITGFL LIQAWPENRTDLHAFE</p> <p>NLEIIRGRTKQH GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD</p> <p>GDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNR</p> <p>GENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRN</p> <p>VSRGRECVDKCNLLEGEPR E FVENSEC IQCHPECLP</p> <p>QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAG</p> <p>VMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGP</p> <p>GLEGCP TNGP</p> <p>KIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFM</p>
56	V1-01 CAR (28z1xx- tEGFR)	<p>MGWSCIIFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPS E</p> <p>TLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRI</p> <p>YPSGSTSYNPSLKS RVAMSV DTPKNQFSLKLSSVT</p> <p>AADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTV</p> <p>SSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP S</p> <p>PLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFW</p> <p>VRSKR S RLLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYPYAPP</p> <p>RDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL</p> <p>GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFN</p> <p>ELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLS</p> <p>TATKDTFDALHMQALPPR</p>

		<p>GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP</p> <p>MLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDS</p> <p>LSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTP</p> <p>PLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFE</p> <p>NLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD</p> <p>GDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNR</p> <p>GENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRN</p> <p>VSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLP</p> <p>QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAG</p> <p>VMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGP</p> <p>GLEGCP TNGP</p> <p>KIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFM</p>
57	V5 CAR (28z1xx- tEGFR)	<p>MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPG</p> <p>GSLRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWV</p> <p>AKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQ</p> <p>MNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSS</p> <p>RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP</p> <p>FPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR</p> <p>SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRD</p> <p>FAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR</p> <p>REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNEL</p> <p>QKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTA</p> <p>TKDTFDALHMQUALPPR</p> <p>GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP</p> <p>MLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDS</p> <p>LSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTP</p> <p>PLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFE</p> <p>NLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD</p> <p>GDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNR</p> <p>GENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRN</p> <p>VSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLP</p> <p>QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAG</p> <p>VMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGP</p>



		GLEGCPTNGP KIPSIATGMV GALLLLLVVALGIGLFM
58	V36 CAR (28z1xx- tEGFR)	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQP GSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEWV AKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MDSLRAEDTAVYYCTRDYNDYWGQGTLLTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSKPFWVLLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPRD FAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGFLNEL QKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTA TKDTFDALHMQUALPPR GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP MLLVTSLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDS LSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTP PLDPQELDILKTVEITGFLLIQAWPENRTDLHAFE NLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD GDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNR GENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRN VSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLP QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTC PAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTY GCTGP GLEGCPTNGP KIPSIATGMV GALLLLLVVALGIGLFM
59	V48 CAR (28z1xx- tEGFR)	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPG GSLRLTCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWV AKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNKNSLYLQ MDNLRAEDTAMYYCTRDYNDLWGGQGTLLTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPLFPGPSKPFWVLLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPRD

		<p>FAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR  REEDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNEL  QKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTA  TKDTFDALHMQUALPPR  GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP  MLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDS  LSINATNIKHFNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTP  PLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFE  NLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD  GDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNR  GENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRN  VSRGRECVDKCNLLEGEPRREFVENSEC IQCHPECLP  QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTC PAG  VMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTY GCTGP  GLEGCPTNGP  KIPSIATGMV GALLLLLVVALGIGLFM</p>
60	V51 CAR (28z1xx- tEGFR)	<p>MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPG  GSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWV  AKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQ  MNSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGT LVTVSS  RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP SPL  FPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR  SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YQPYAPPRD  FAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR  REEDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNEL  QKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQGLSTA  TKDTFDALHMQUALPPR  GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP  MLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDS  LSINATNIKHFNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTP  PLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFE  NLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD  GDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNR  GENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRN</p>

		<p>VSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLP  QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAG  VMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGP  GLEGCPTNGP  KIPSIATGMV GALLLLLVVALGIGLFM</p>
61	<p>V1-01 CAR  Последовательность  нуклеиновой  кислоты</p>	<p>ATGGGCTGGTCTTGTATTATCTTGTTTCTCGTCG  CAACTGCTACAGGCGTTCATTCTGAAGTTCAACT  CCAAGAATCTGGTCCTGGCCTGGTGAAACCTTCC  GAAACTCTCTCACTCACCTGTACCGTCTCAGGCG  CTTCAATATCACACTATTATTGGTCTTGGTTCCG  GCAACCTGCAGGCAAAGGTCTCGAATGGATAGG  CAGAATATATCCCAGTGGAAGCACCTCCTATAA  TCCCTCTCTCAAGTCAAGAGTTGCAATGAGCGTT  GACACACCCAAGAACCAATTCTCCCTCAAGCTG  TCATCTGTA ACTGCCGCCGATACTGCCGTTTACT  ACTGCGCTAGAGATAGATCAACCGGATGGTCAG  AATGGAATTCAGATCTGTGGGGACGGGGAAACC  TCGTGACCGTATCTTCTCGGGCGGCCGCAATTGA  AGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAG  AAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGG  AAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGAC  CTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGG  TGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACA  GTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGA  GGAGCAGGCTCCTGCACAGT GACTACATGAACA</p>

		<p>TGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGC  ATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGC  AGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAG  CGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAA  CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAG  AGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG  CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAA  GGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAAC  TGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTG  AGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGC  AAGGGGCACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGT  ACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGCCCTTAC  ATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC</p>
62	<p>V5 CAR  Последовательность  нуклеиновой  кислоты</p>	<p>ATGGAACTGGGACTGTCTTGGGTGTTCTGGTTCG  CTATATTGGAAGGAGTACAGTGCCAGGTCCAGC  TCGTCGAGTCCGGGGGTGGCCTGGTGCAGCCCG  GCGGCAGCCTCCGGCTGAGCTGCACAGCCTCAG  GGTTTACATTCAGCAGGTAAGTGGATGAGTTGGG  TTAGGCAAGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGGG  TGGCCAAAATCCGACATGATGGGGGCGAAAAGT  ACTATGTGGATAGTGTGAAGGGACGGTTCACAA  TATCACGAGACAATGCCAAAACTCTTTGTACCT  GCAAATGAACTCCCTGCGCGCCGAAGACACAGC  TGTGTACTACTGCGCTACAGACTACACTAGGGA  CGTCTGGGGTCAAGGAACAGCCGTCACCGTGAG  TAGTCGGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCT  CCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGA  ACCATATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGT  CCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCT  TTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGC  TTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATT  ATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTC  CTGCACAGTGAATGACATGAACATGACTCCCCGC  CGCCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCC  TATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCT</p>

		<p>CCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCC  CCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATA  ACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACG  ATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTG  AGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCT  CAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGAT  AAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATG  AAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGA  TGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAG  GACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGC  CCCCTCGCTAA</p>
63	<p>V36 CAR  Последовательность  нуклеиновой  кислоты</p>	<p>ATGGAGCTGGGATTGTCCTGGGTTTTCTGGTGG  CTATACTCGAAGGCGTACAGTGTGAAGTGCAGT  TGGTGGAGAGTGGCGGTGGCCTGGCCCAGCCGG  GAGGCTCTTTGAGACTCTCCTGCGCTGCCTCCGG  CTTCACTTTCTCCCGCTATTGGATGACCTGGGTC  CGGCAGGCGCCCGGCGGACGCCTGGAGTGGGTG  GCTAAGATCAAGTATGATGGATCAGAAAAATAT  TACGCAGATAGCGTAAAAGGCCGGTTCACAATA  TCCAGGGATAATGCAAAAAACTCCCTGTATCTG  CAGATGGATAGCCTGCGCGCTGAAGACACCGCC  GTATATTATTGCACAAGAGACTACAATAAAGAT  TACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTTACGGTGAGC  TCACGGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTC  CTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAA  CCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCC  AAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTT  TGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTT  GCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTAT  TTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCT  GCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCG  CCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTA  TGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC  AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCC  GCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC</p>

		GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGAT GTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCA GGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAA GATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAA AGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATG GCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGG ACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCC CCCTCGC
64	V48 CAR Последовательность нуклеиновой кислоты	ATGGAGCTGGGGCTTTCTTGGGTGTTTCTGGTAG CCATCCTCGAGGGAGTCCAGTGCGAGGTCCAGC TCGTGGAATCTGGCGGGGGGCTGGTCCAGCCTG GCGGTTCTCTCCGCCTGACCTGTGCGGCCTCAGG GTTCACTTTCAGCCGGTACTGGATGACATGGGTG AGACAGGCCCCCGGCAAGGGACTGGAATGGGTA GCAAAGATTAGGCACGACGGCGGTGAGAAATAC TATCCCGACAGTGTC AAGGGGCGGTTTACTGTCT CCCGAGATAATGCCAAAACTCACTCTACCTGC AGATGGATAATCTGCGAGCGGAGGATACTGCTA TGTA TACTGTACTCGAGACTACAACAAGGACC TGTGGGGGCAGGGGACACTGGTGACGGTTAGTT CTCGGGCGGCCGAATTGAAGTTATGTATCCTCC TCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAAC CATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCC AAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTT TGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTT GCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTAT TTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCT GCACAGTGA CTACATGAACATGACTCCCCGCCG CCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTA TGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCC GCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGAT GTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG

		<p>ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCA  GGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAA  GATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAA  AGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATG  GCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGG  ACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCC  CCCTCGC</p>
65	<p>V51 CAR  Последовательность  нуклеиновой  кислоты</p>	<p>ATGGAAGTGGGACTGTCATGGGTCTTTCGTGG  CCATTCTCGAGGGGGTCCAGTGTGAGGTTCAGC  TGGTGGAGAGCGGGGGGGTCTGGTTCAGCCAG  GTGGCAGTCTTAGGTTGTCATGTGCCGCGAGCG  GGTTCACGTTCTCACGATATTGGATGACCTGGGT  TCGCCAGGCACCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGT  CGCCAAGATCAGGCACGACGGCGGAGAAAAT  ATTACGCGGATTCCGTGAAAGGCAGATTCACAA  TCTCTAGGGATAACGCCAAAAATCCCTTTATCT  TCAGATGAATAGCCTGAGGGCTGAAGACACTGC  CGTGTACTACTGCACGCGGGATTACAACAAAGA  TTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACCGTCAG  CTCTCGGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCT  CCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGA  ACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGT  CCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCT  TTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGC  TTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATT  ATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTC  CTGCACAGTGACTIONACATGAACATGACTCCCCGC  CGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCC  TATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCT  CCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCC  CCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATA  ACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACG  ATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTG  AGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCT  CAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGAT</p>

		<p>AAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATG  AAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGA  TGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAG  GACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGC  CCCCTCGC</p>
66	<p>V1-01 CAR +  tEGFR  Последовательность  нуклеиновой  кислоты</p>	<p>ATGGGCTGGTCTTGTATTATCTTGTTTCTCGTCG  CAACTGCTACAGGCGTTCATTCTGAAGTTCAACT  CCAAGAATCTGGTCCTGGCCTGGTGAACCTTCC  GAAACTCTCTCACTCACCTGTACCGTCTCAGGCG  CTTCAATATCACACTATTATTGGTCTTGGTTCCG  GCAACCTGCAGGCAAAGGTCTCGAATGGATAGG  CAGAATATATCCCAGTGGAAGCACCTCCTATAA  TCCCTCTCTCAAGTCAAGAGTTGCAATGAGCGTT  GACACACCCAAGAACCAATTCTCCCTCAAGCTG  TCATCTGTAAGTCCGCGGATACTGCCGTTTACT  ACTGCGCTAGAGATAGATCAACCGGATGGTCAG  AATGGAATTCAGATCTGTGGGGACGGGGAACCC  TCGTGACCGTATCTTCTCGGGCGGCCGCAATTGA  AGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAG  AAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGG  AAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGAC  CTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGG  TGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACA  GTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGA  GGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTIONACATGAACA  TGACTIONCCCGCCCGCCCGGGCCACCCGCAAGC  ATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGC  AGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAG  CGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAA  CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAG  AGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGG  CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAA  GGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTTCAATGAAC  TGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTTCAGTG  AGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGC</p>



		<p>AAGGGGCACGATGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGT ACAGCCACCAAGGACACCTTCGACGCCCTTCAC ATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGAAGCGGAGCT ACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGAC GTGGAGGAGAACCCTGGACCCATGCTTCTCCTG GTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACC CAGCATTCCTCCTGATCCCACGCAAAGTGTGTAA CGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGACTCACT CTCCATAAATGCTACGAATATTAACACTTCAA AAACTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATC CTGCCGGTGGCATTAGGGGTGACTCCTTCACAC ATACTCCTCCTCTGGACCCACAGGAACTGGATAT TCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTT GCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGA CCTCCATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGC GGCAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTTCTCTT GCAGTCGTCAGCCTGAACATAACATCCTGGGA TTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGAT GTGATAATTCAGGAAACAAAATTTGTGCTAT GCAAATACAATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGG ACCTCCGGTCAGAAAACCAAATTATAAGCAAC AGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCA GGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCCGAGGGCTGC TGGGGCCCGGAGCCCAGGGACTGCGTCTCTTGC CGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGAC AAGTGCAACCTTCTGGAGGGTGAGCCAAGGGAG TTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGCCAC CCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACC TGCACAGGACGGGGACCAGACAACCTGTATCCAG TGTGCCACTACATTGACGGCCCCACTGCGTCA AGACCTGCCCCGGCAGGAGTCATGGGAGAAAACA ACACCTGGTCTGGAAGTACGCAGACGCCGGCC ATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACCTA CGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCC CACGAATGGGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCAC</p>
--	--	--

		TGGGATGGTGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTG GTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTTCATG
67	V5 CAR + tEGFR Последовательность нуклеиновой кислоты	ATGGA ACTGGGACTGTCTTGGGTGTTCTGGTCCG CTATATTGGAAGGAGTACAGTGCCAGGTCCAGC TCGTCGAGTCCGGGGGTGGCCTGGTGCAGCCCG GCGGCAGCCTCCGGCTGAGCTGCACAGCCTCAG GGTTTACATTCAGCAGGTA CTGGATGAGTTGGG TTAGGCAAGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGGG TGGCCAAAATCCGACATGATGGGGGCGAAAAGT ACTATGTGGATAGTGTGAAGGGACGGTTCACAA TATCACGAGACAATGCCAAAACTCTTTGTACCT GCAAATGAACTCCCTGCGCGCCGAAGACACAGC TGTGTACTACTGCGCTACAGACTACACTAGGGA CGTCTGGGGTCAAGGAACAGCCGTCACCGTGAG TAGTGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCCT CCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACC ATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCA AGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTT GGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTT GCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTAT TTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCT GCACAGTGA CTACATGAACATGACTCCCCGCCG CCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTA TGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCC GCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGAT GTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCA GGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAA GATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAA AGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATG GCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGG ACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCC CCCTCGCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCT

		GCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACC CTGGACCCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCT GCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCTCCTG ATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATT GGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTA CGAATATTAACACTTCAAAAACCTGCACCTCCA TCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATT TAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTG GACCCACAGGAACCTGGATATTCTGAAAACCGTA AAGGAAATCACAGGGTTTTTGCTGATTCAGGCTT GGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTG AGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGC AACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCCT GAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAA GGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTCAGG AAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAA CTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAA AACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACA GCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCT TGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGC CCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCC GAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTC TGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACT CTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGC CTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGG GACCAGACAACCTGTATCCAGTGTGCCCACTACA TTGACGGCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGG CAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCT GGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACC TGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTG GGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCCACGAATGGGC CTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGG GGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGG GATCGGCCTCTTCATG
--	--	---

68	V36 CAR + tEGFR Последовательность нуклеиновой кислоты	ATGGAGCTGGGATTGTCCTGGGTTTTCTGGTGG CTATACTCGAAGGCGTACAGTGTGAAGTGCAGT TGGTGGAGAGTGGCGGTGGCCTGGCCCAGCCGG GAGGCTCTTTGAGACTCTCCTGCGCTGCCTCCGG CTTCACTTTCTCCCGCTATTGGATGACCTGGGTC CGGCAGGCGCCCGGCGGACGCCTGGAGTGGGTG GCTAAGATCAAGTATGATGGATCAGAAAAATAT TACGCAGATAGCGTAAAAGGCCGGTTCACAATA TCCAGGGATAATGCAAAAAACTCCCTGTATCTG CAGATGGATAGCCTGCGCGCTGAAGACACCGCC GTATATTATTGCACAAGAGACTACAATAAAGAT TACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTTACGGTGAGC TCACGGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTC CTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAA CCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCC AAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTT TGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTT GCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTAT TTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCT GCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCG CCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTA TGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCC GCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGAT GTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCA GGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAA GATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAA AGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATG GCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGG ACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCC CCCTCGCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCT GCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACC CTGGACCCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCT
----	--	--

		<p>GCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCCTCCTG  ATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATT  GGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTA  CGAATATTAACAACACTTCAAAAACACTGCACCTCCA  TCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATT  TAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTG  GACCCACAGGAACCTGGATATTCTGAAAACCGTA  AAGGAAATCACAGGGTTTTTGCTGATTCAGGCTT  GGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTG  AGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGC  AACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCCT  GAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAA  GGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTCAGG  AAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAA  CTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAA  AACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACA  GCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCT  TGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGC  CCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCC  GAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTC  TGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACT  CTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGC  CTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGG  GACCAGACAACCTGTATCCAGTGTGCCCACTACA  TTGACGGCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGG  CAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCT  GGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACC  TGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTG  GGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCCACGAATGGGC  CTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGG  GGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGG  GATCGGCCTCTTCATG</p>
69	V48 CAR + tEGFR	<p>ATGGAGCTGGGGCTTTCTTGGGTGTTTCTGGTAG  CCATCCTCGAGGGAGTCCAGTGCGAGGTCCAGC  TCGTCGAATCTGGCGGGGGGCTGGTCCAGCCTG</p>

<p>Последовательность нуклеиновой кислоты</p>	<p>GCGGTTCTCTCCGCCTGACCTGTGCGGCCTCAGG  GTTCACTTTCAGCCGGTACTGGATGACATGGGTG  AGACAGGCCCCCGGCAAGGGACTGGAATGGGTA  GCAAAGATTAGGCACGACGGCGGTGAGAAATAC  TATCCCGACAGTGTC AAGGGGCGGTTTACTGTCT  CCCGAGATAATGCCAAAACTCACTCTACCTGC  AGATGGATAATCTGCGAGCGGAGGATACTGCTA  TGTACTIONTACTCGAGACTACAACAAGGACC  TGTGGGGGCAGGGGACACTGGTGACGGTTAGTT  CTCGGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCC  TCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAAC  CATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCC  AAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTT  TGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTT  GCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTAT  TTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCT  GCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCG  CCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTA  TGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC  AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCC  GCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAAC  GAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGAT  GTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG  ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCA  GGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGATAA  GATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATGAA  AGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATG  GCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGG  ACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCC  CCCTCGCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCT  GCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACC  CTGGACCCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCT  GCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCCTCCTG  ATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATT  GGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTA</p>
---	--

		CGAATATTAACACTTCAAAAACCTGCACCTCCA TCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATT TAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTG GACCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTA AAGGAAATCACAGGGTTTTTGCTGATTCAGGCTT GGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTG AGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGC AACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCCT GAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAA GGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTTAGG AAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAA CTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAA AACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACA GCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCT TGTGCTCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGC CCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCC GAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTC TGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACT CTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGC CTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGG GACCAGACAACCTGTATCCAGTGTGCCCACTACA TTGACGGCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGG CAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCT GGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACC TGTGCCATCCAACTGCACCTACGGATGCACTG GGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCACGAATGGGC CTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGG GGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGG GATCGGCCTCTTCATG
70	V51 CAR + tEGFR Последовательность	ATGGAACCTGGGACTGTCATGGGTCTTTCTCGTGG CCATTCTCGAGGGGGTCCAGTGTGAGGTTACGC TGGTGGAGAGCGGGGGGGTCTGGTTCAGCCAG GTGGCAGTCTTAGGTTGTCATGTGCCGCGAGCG

<p>нуклеиновой кислоты</p>	<p>GGTTCACGTTCTCACGATATTGGATGACCTGGGT  TCGCCAGGCACCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGT  CGCCAAGATCAGGCACGACGGCGGAGAAAAAT  ATTACGCGGATTCCGTGAAAGGCAGATTCACAA  TCTCTAGGGATAACGCCAAAAATCCCTTTATCT  TCAGATGAATAGCCTGAGGGCTGAAGACACTGC  CGTGTACTACTGCACGCGGGATTACAACAAAGA  TTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTGACCGTCAG  CTCTCGGGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCT  CCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGA  ACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGT  CCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCT  TTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGC  TTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATT  ATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTC  CTGCACAGTGACTIONACATGAACATGACTCCCCGC  CGCCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCC  TATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCT  CCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCC  CCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATA  ACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACG  ATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTG  AGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCT  CAGGAAGGCCTGTTCAATGAACTGCAGAAAGAT  AAGATGGCGGAGGCCTTCAGTGAGATTGGGATG  AAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGA  TGGCCTTTTCCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAG  GACACCTTCGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGC  CCCCTCGCGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCC  TGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACC  CTGGACCCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCT  GCTCTGTGAGTTACCACACCAGCATTCCCTCTG  ATCCCACGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATT  GGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTA  CGAATATTAACACTTCAAAAAGTGCACCTCCA</p>
--------------------------------	---



		<p>TCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATT  TAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTG  GACCCACAGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTA  AAGGAAATCACAGGGTTTTTGCTGATTCAGGCTT  GGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCTTTG  AGAACCTAGAAATCATAACGCGGCAGGACCAAGC  AACATGGTCAGTTTTCTCTTGCAGTCGTCAGCCT  GAACATAACATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAA  GGAGATAAGTGATGGAGATGTGATAATTCAGG  AAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACAATAAA  CTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAA  AACCAAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACA  GCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCT  TGTGCTCCCCCGAGGGCTGCTGGGGCCCGGAGC  CCAGGGACTGCGTCTCTTGCCGGAATGTCAGCC  GAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTC  TGGAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACT  CTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCTGC  CTCAGGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGG  GACCAGACAACGTATCCAGTGTGCCCACTACA  TTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCGG  CAGGAGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCT  GGAAGTACGCAGACGCCGGCCATGTGTGCCACC  TGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACTG  GGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCACGAATGGGC  CTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGG  GGGCCCTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGG  GATCGGCCTCTTCATG</p>

## Эквиваленты

**[0566]** Использование в формуле изобретения порядковых терминов, таких как «первый», «второй», «третий» и т. д., для модификации элемента пункта формулы изобретения само по себе не подразумевает какого-либо приоритета, первоочередности или порядка одного элемента формулы изобретения относительно другого или временного порядка, в котором проводятся действия для осуществления способа, но они используются исключительно как метки для отличия одного элемента формулы изобретения, имеющего определенное название, от другого элемента, имеющего такое же название (за исключением использования порядкового термина), для отличия элементов формулы изобретения.

**[0567]** В контексте данного документа под упоминаниями единственного числа в описании и формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать также ссылки на множественное число. Пункты формулы изобретения или описания, которые включают «или» между одним или более членами группы, считаются удовлетворительными, если один, более одного или все члены группы присутствуют, применяются или имеют отношение к определенному продукту или способу, если не указано иное или это иным образом не очевидно из контекста. Описание данного изобретения включает в себя варианты осуществления изобретения, в которых ровно один член группы присутствует в, применяется в или иным образом относится к данному продукту или способу. Изобретение также включает в себя варианты осуществления изобретения, в которых вся группа членов присутствует в, применяется в или иным образом относится к данному продукту или способу. Кроме того, следует понимать, что изобретение охватывает все варианты, комбинации и перестановки, в которых одно или несколько ограничений, элементов, положений, описательных терминов и т. д. одного или нескольких из перечисленных пунктов формулы изобретения вводятся в другой пункт формулы изобретения, зависимый от того же независимого пункта (или, если применимо, любого другого пункта), если не указано иное, или если специалисту в данной области техники не будет очевидно потенциальное противоречие или несоответствие. Когда элементы представлены в виде списков (например, в формате группы Маркуша или схожих форматах), следует понимать, что каждая подгруппа элементов также раскрывается, и любой элемент (элементы) можно удалить из группы. Следует понимать, что, в общем, когда изобретение или аспекты изобретения упоминаются как содержащие конкретные элементы, признаки и т. д. некоторые варианты осуществления изобретения или аспекты изобретения состоят или состоят по существу из таких элементов, признаков и т. д. В целях упрощения такие варианты осуществления не во всех случаях конкретно изложены здесь в

таком количестве слов. Следует также понимать, что любой вариант осуществления или аспект изобретения могут быть явно исключены из формулы изобретения, независимо от того, указано ли конкретное исключение в описании. Публикации, веб-сайты и другие справочные материалы, на которые даны ссылки в данном документе для описания предпосылок создания изобретения и предоставления дополнительных подробностей относительно его практического применения, включены в данный документ посредством ссылки.

## Формула изобретения

1. Химерный антигенный рецептор (CAR) к гуанилатциклазе С (GCC), содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с гуанилатциклазой С (GCC), трансмембранный домен и по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный домен.
2. CAR к GCC по п. 1, отличающийся тем, что антигенсвязывающий домен содержит  
вариабельную область тяжелой цепи ( $V_H$ ) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) HYYWS (HCDR1) (SEQ ID NO: 8), RIYPSGSTSYNPSLKS (HCDR2) (SEQ ID NO: 11) и DRSTGWSEWNSDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 16);  
вариабельную область тяжелой цепи ( $V_H$ ) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMS (HCDR1) (SEQ ID NO: 9), KIRHDGGEKYYVDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 12) и DYTRDV (HCDR3) (SEQ ID NO: 17);  
вариабельную область тяжелой цепи ( $V_H$ ) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10), KIKYDGSEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 13) и DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18);  
вариабельную область тяжелой цепи ( $V_H$ ) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10), KIRHDGGEKYYPDSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 14) и DYNKDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 19) или  
вариабельную область тяжелой цепи ( $V_H$ ) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10), KIRHDGGEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 15) и DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18).
3. CAR к GCC по п. 1, отличающийся тем, что антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи ( $V_H$ ), которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 20.
4. CAR к GCC по п. 1, отличающийся тем, что антигенсвязывающий домен содержит

вариабельную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 21;

вариабельную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 26;

вариабельную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 27; или

вариабельную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 28.

5. CAR к GCC по любому из пп. 1–4, отличающийся тем, что антигенсвязывающий домен включает антигенсвязывающий домен к GCC только вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина.
6. CAR к GCC по любому из пп. 1–5, отличающийся тем, что внеклеточному антигенсвязывающему домену к GCC предшествует лидерная нуклеотидная последовательность, кодирующая лидерный пептид.
7. CAR к GCC по п. 28, отличающийся тем, что лидерный пептид включает SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 42.
8. CAR к GCC по любому из пп. 1–7, дополнительно содержащий шарнирный домен.
9. CAR к GCC по п. 8, отличающийся тем, что шарнирный домен включает шарнирный домен CD28.
10. CAR к GCC по п. 9, отличающийся тем, что шарнирный домен CD28 включает SEQ ID NO: 29
11. CAR к GCC по любому из пп. 8–10, отличающийся тем, что шарнирный домен слит с трансмембранным доменом.

12. CAR к GCC по любому из пп. 1–11, отличающийся тем, что трансмембранный домен включает трансмембранный домен белка, выбранного из альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD8, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD83, CD86, CD134, CD137, CD154 и TNFRSF19, и любой их комбинации.
13. CAR к GCC по п. 12, отличающийся тем, что трансмембранный домен включает трансмембранный домен CD28.
14. CAR к GCC по п. 13, отличающийся тем, что трансмембранный домен CD28 включает SEQ ID NO: 30.
15. CAR к GCC по любому из пп. 1–14, отличающийся тем, что по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный домен содержит костимулирующий домен и первичный сигнальный домен.
16. CAR к GCC по п. 15, отличающийся тем, что костимулирующий домен содержит функциональный сигнальный домен из OX40, CD70, CD27, CD28, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), DAP10, DAP12 и 4-1BB (CD137), или любой их комбинации.
17. CAR к GCC по п. 16, отличающийся тем, что костимулирующий домен содержит функциональный сигнальный домен CD28.
18. CAR к GCC по п. 17, отличающийся тем, что костимулирующий домен CD28 включает SEQ ID NO: 32.
19. CAR к GCC по пп. 15–18, отличающийся тем, что первичный сигнальный домен включает сигнальный домен CD3-дзета.
20. CAR к GCC по п. 19, отличающийся тем, что сигнальный домен CD3-дзета включает SEQ ID NO: 33.
21. CAR к GCC, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 47–52.

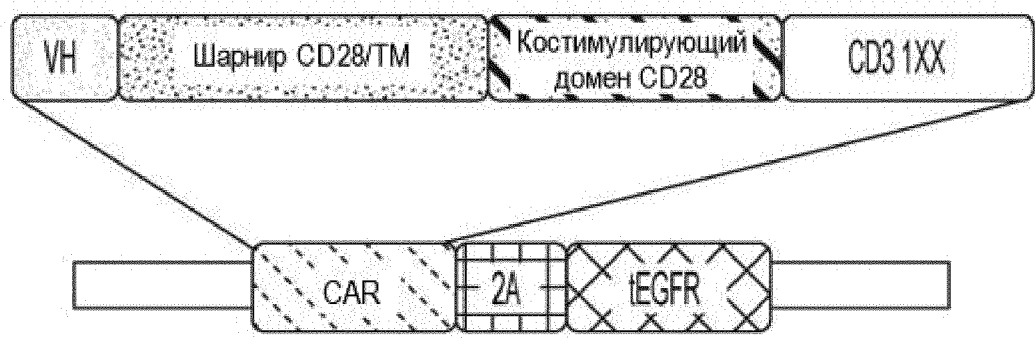
22. Выделенный полинуклеотид, кодирующий CAR к GCS по любому из пп. 1–21.
23. Выделенный полинуклеотид по п. 22, дополнительно содержащий укороченную последовательность рецептора эпидермального фактора роста (tEGFR).
24. Выделенный полинуклеотид по п. 23, отличающийся тем, что tEGFR включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с SEQ ID NO: 43.
25. Выделенный полинуклеотид по п. 24, отличающийся тем, что tEGFR включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность, которая идентична SEQ ID NO: 43.
26. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 22–25, дополнительно содержащий сайт распознавания фурином и расположенную ниже последовательность саморасщепляющегося пептида 2A, предназначенную для одновременной бицистронной экспрессии последовательности метки и последовательности CAR.
27. Выделенный полинуклеотид по п. 26, отличающийся тем, что саморасщепляющийся пептид 2A выбран из F2A, P2A, E2A и T2A.
28. Выделенный полинуклеотид по п. 27, отличающийся тем, что саморасщепляющийся пептид 2A представляет собой P2A.
29. Вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по любому из пп. 22–28.
30. Вектор по п. 29, причем вектор представляет собой аденовирусный вектор, аденовирус-ассоциированный вектор, ДНК-вектор, лентивирусный вектор, плазмиду, ретровирусный вектор или РНК-вектор.
31. Клетка, содержащая вектор по п. 29 или п. 30.
32. Клетка по п. 31, причем клетка представляет собой Т-клетку, аллогенную Т-клетку, аутологичную Т-клетку или инфильтрирующий опухоль лимфоцит (TIL).

33. Популяция клеток, содержащая CAR к GCC по любому из пп. 1–20 или нуклеиновую кислоту по любому из пп. 22–32.
34. Набор, содержащий популяцию клеток по п. 33.
35. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток по п. 31 или п. 32.
36. Фармацевтическая композиция по п. 35, отличающаяся тем, что более 70%, 80%, 90% или 95% клеток в популяции экспрессируют CAR к GCC.
37. Способ лечения рака, включающий введение фармацевтической композиции или популяции клеток, содержащих CAR к GCC по любому из пп. 1–20, субъекту, нуждающемуся в лечении.
38. Способ по п. 37, отличающийся тем, что рак выбран из рака желудочно-кишечного тракта, колоректального рака, колоректальной аденокарциномы, колоректальной лейомиосаркомы, колоректальной лимфомы, колоректальной меланомы, колоректальной нейроэндокринной опухоли, метастатического рака толстой кишки, рака желудка, аденокарциномы желудка, лимфомы желудка, саркомы желудка, рака пищевода, плоскоклеточной карциномы, аденокарциномы пищевода или рака поджелудочной железы.
39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.
40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что рак желудочно-кишечного тракта представляет собой рак толстой кишки, колоректальный рак, рак желудка или рак пищевода.
41. Способ уменьшения роста опухоли или размера опухоли, включающий введение фармацевтической композиции или популяции клеток, содержащих CAR к GCC по любому из пп. 1–21, субъекту, нуждающемуся в лечении

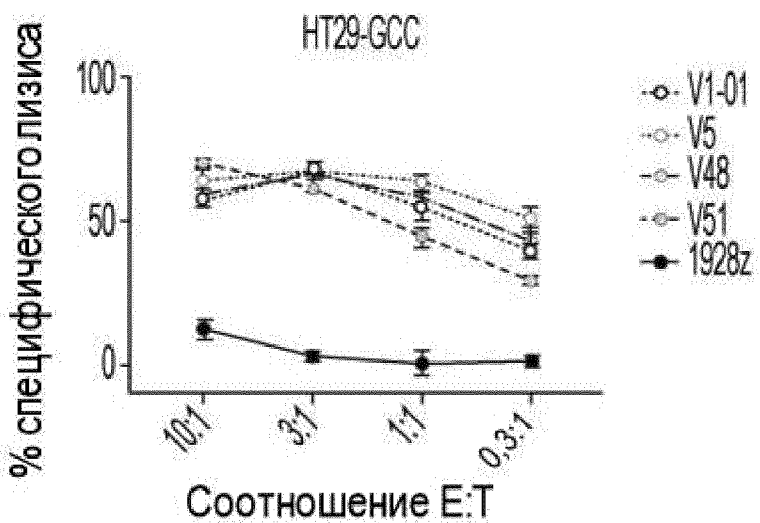




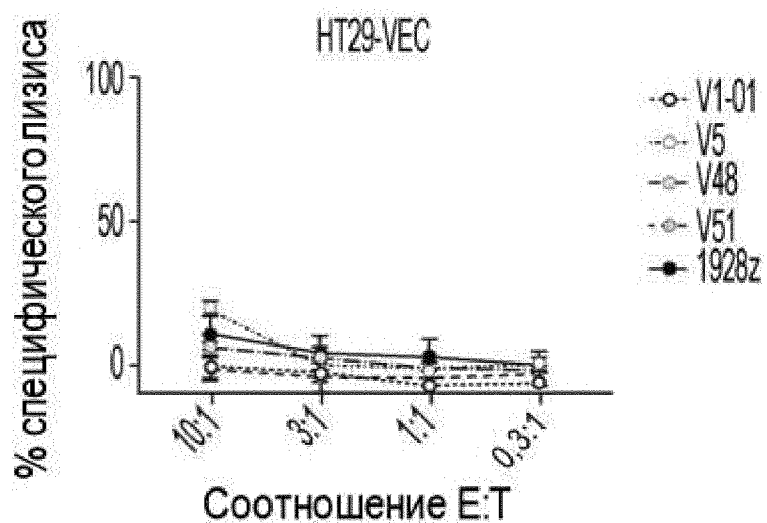
Фиг. 1А



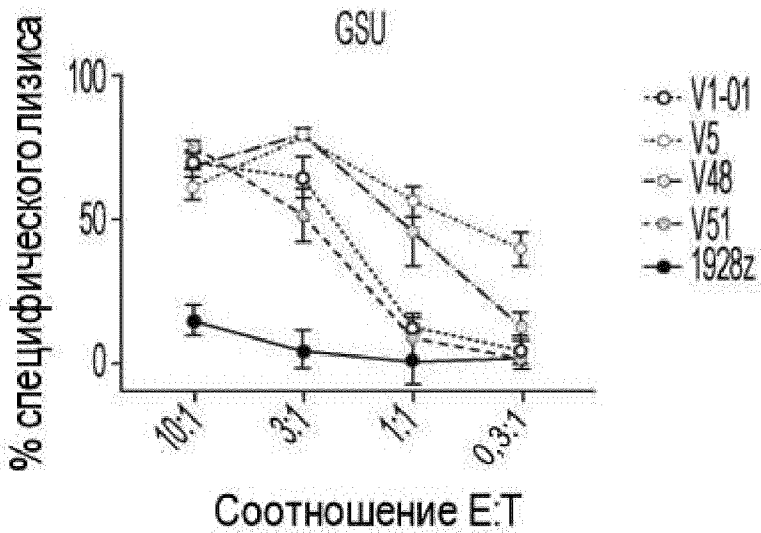
Фиг. 1В



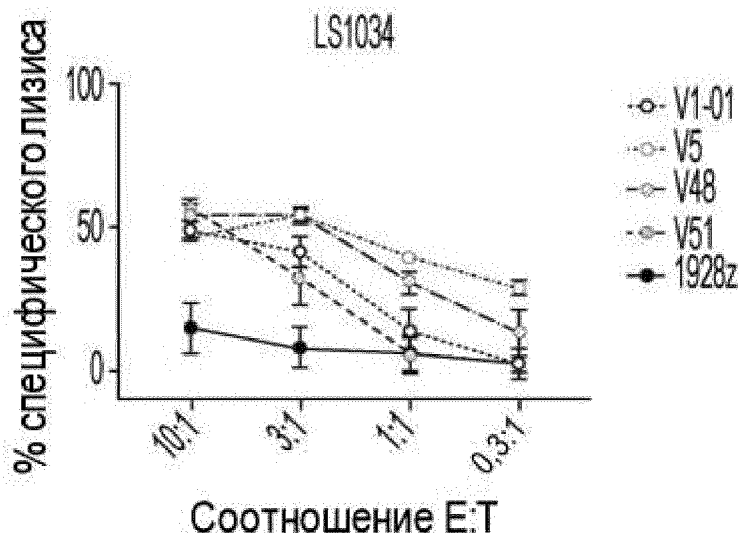
Фиг. 2A



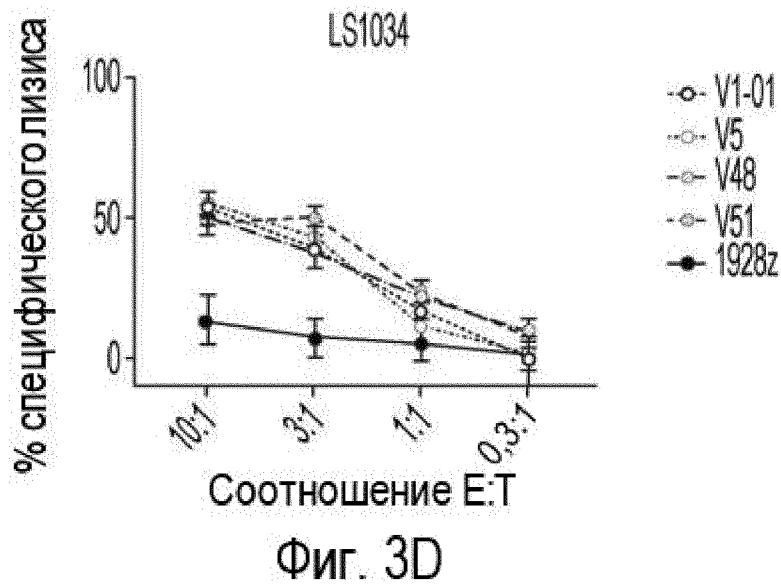
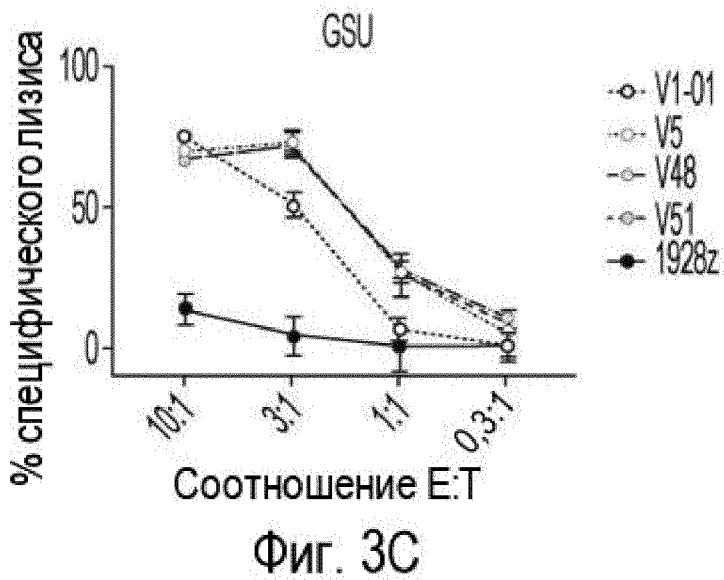
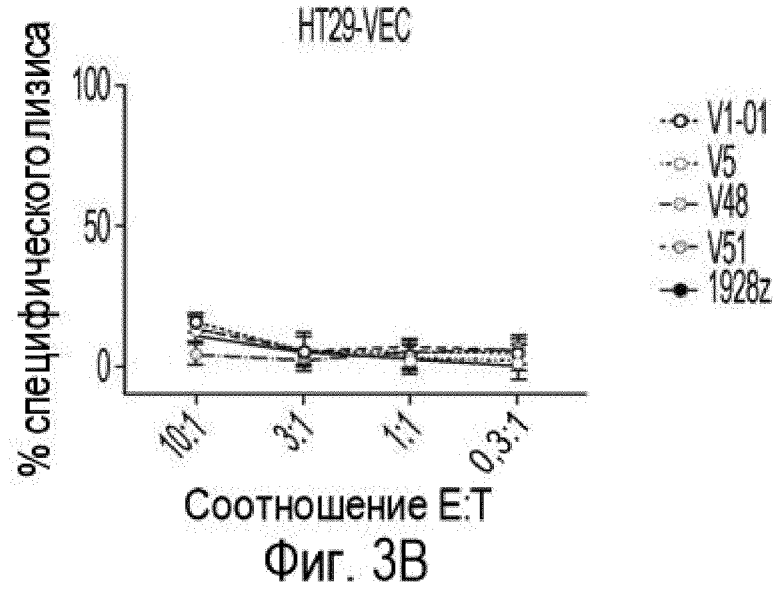
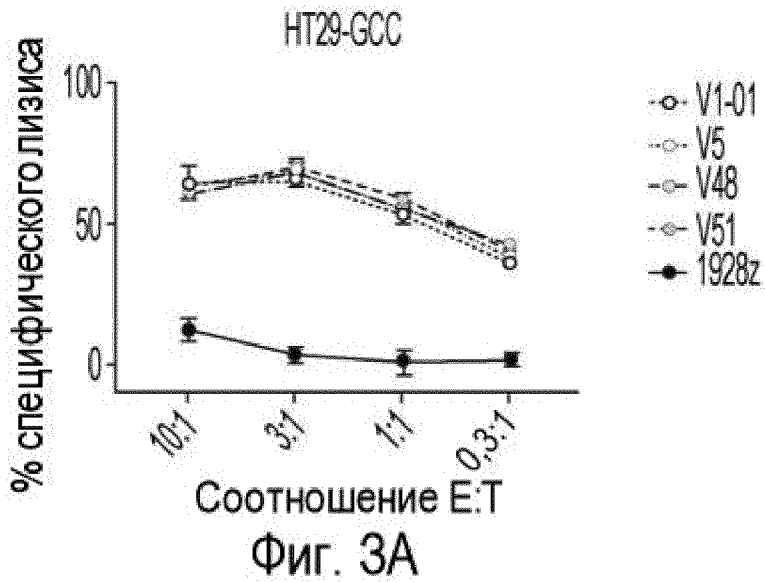
Фиг. 2B

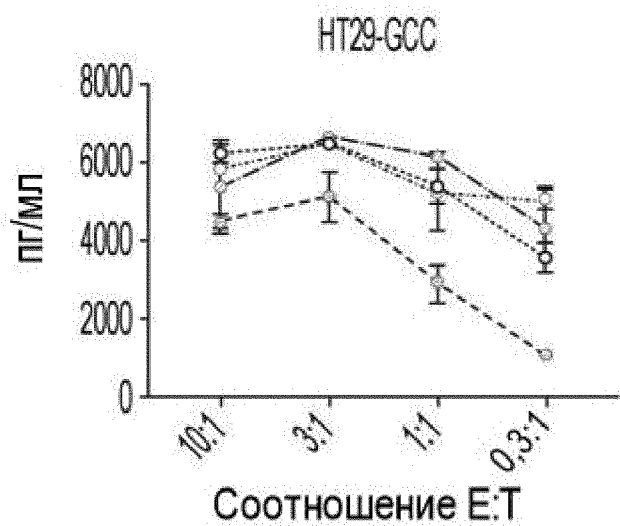


Фиг. 2C

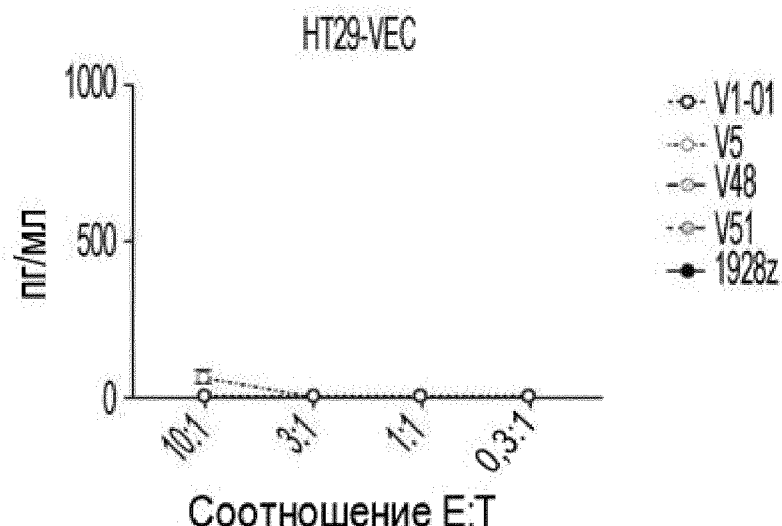


Фиг. 2D

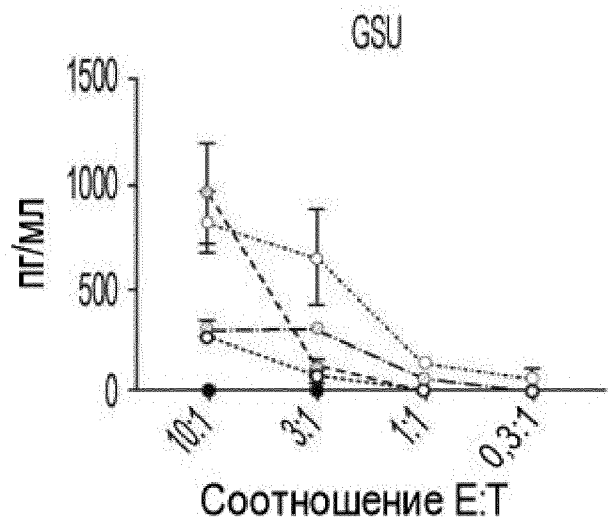




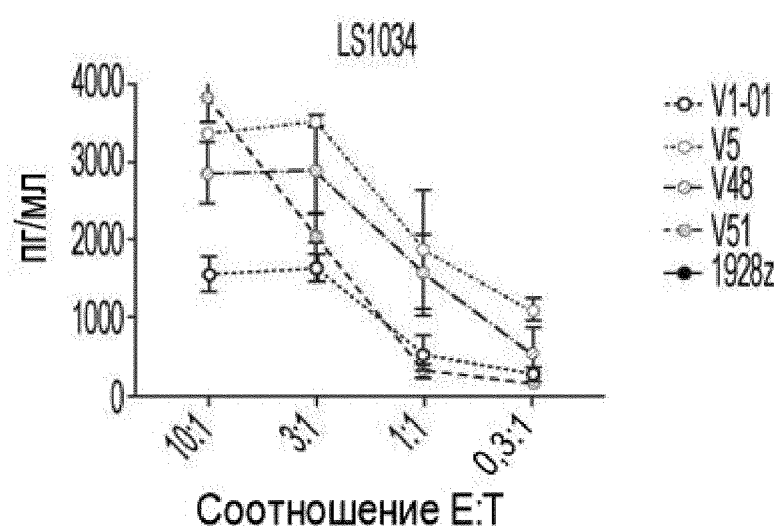
Фиг. 4А



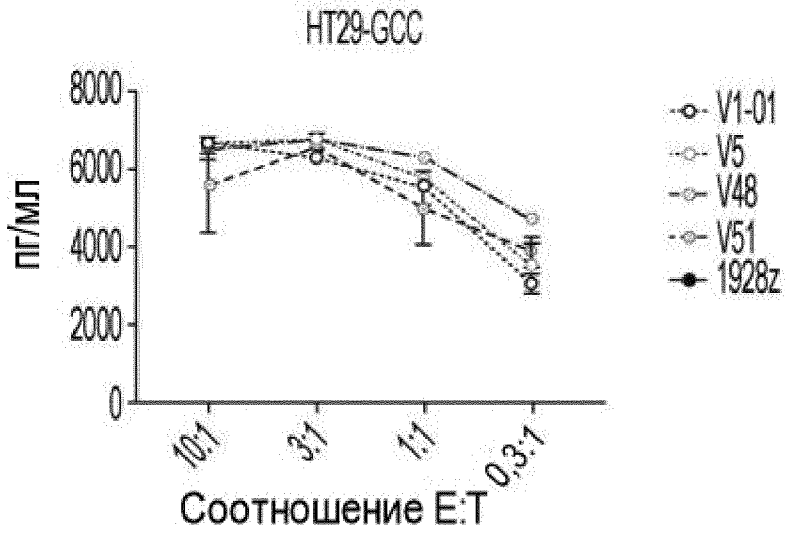
Фиг. 4В



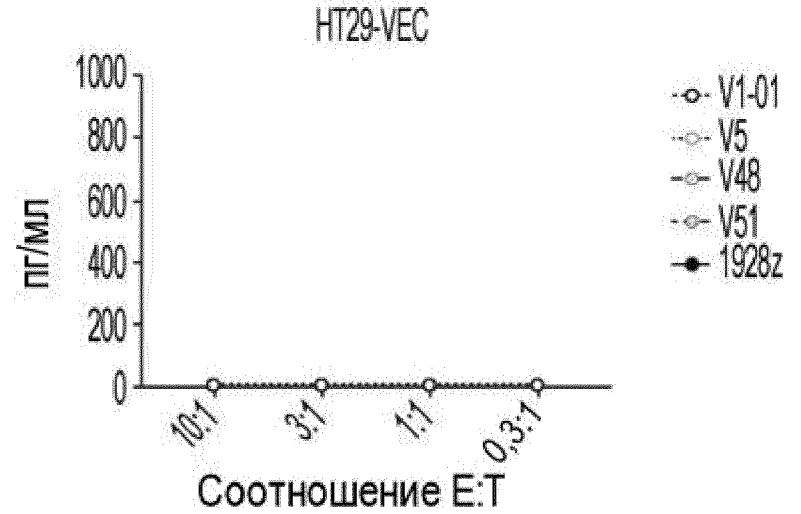
Фиг. 4С



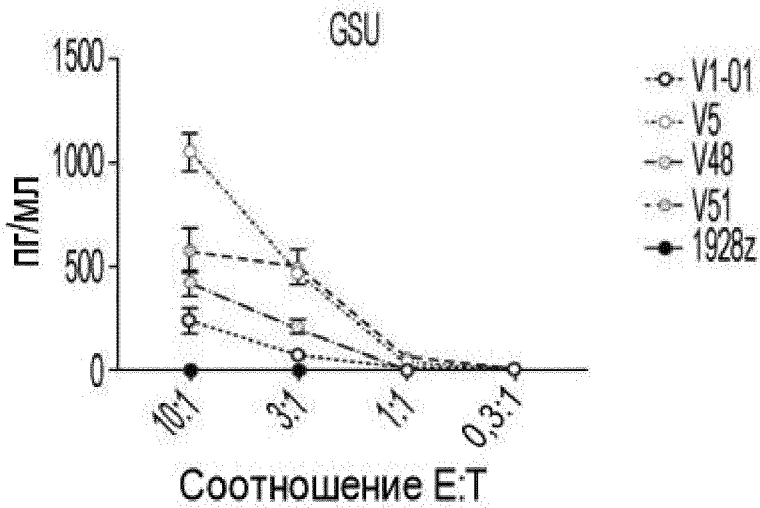
Фиг. 4D



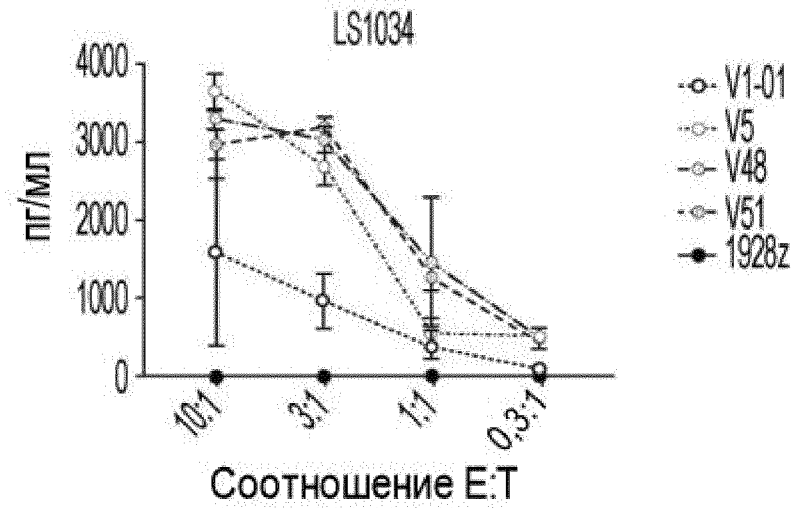
Фиг. 5А



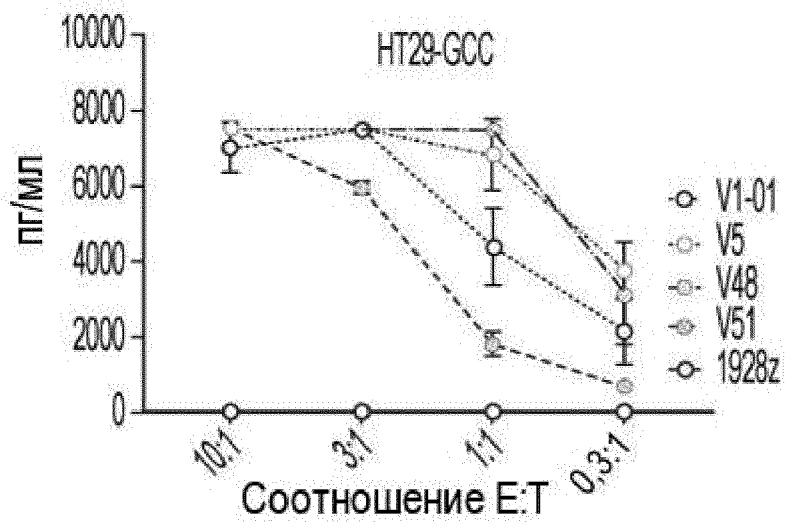
Фиг. 5В



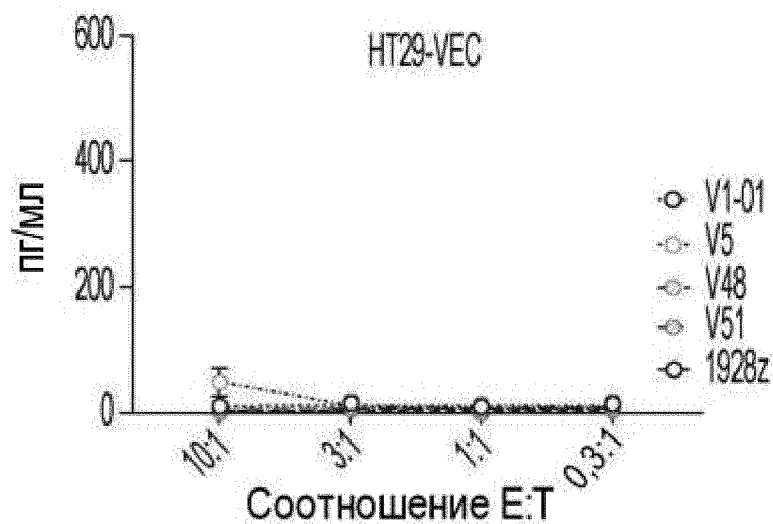
Фиг. 5С



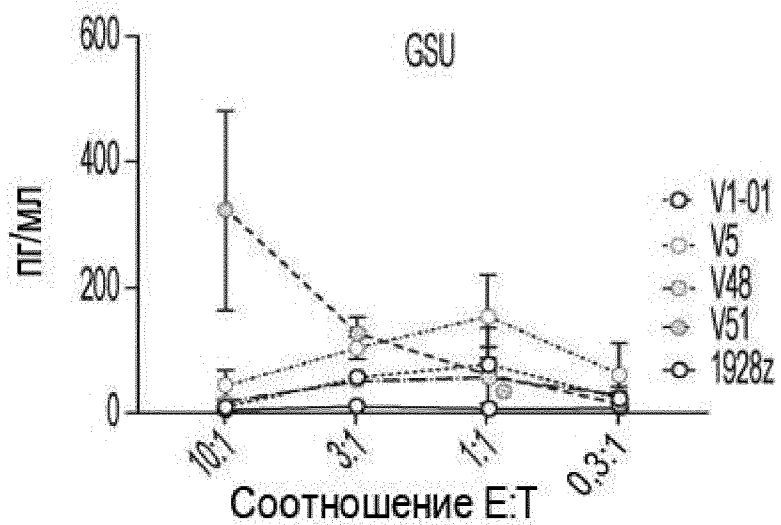
Фиг. 5D



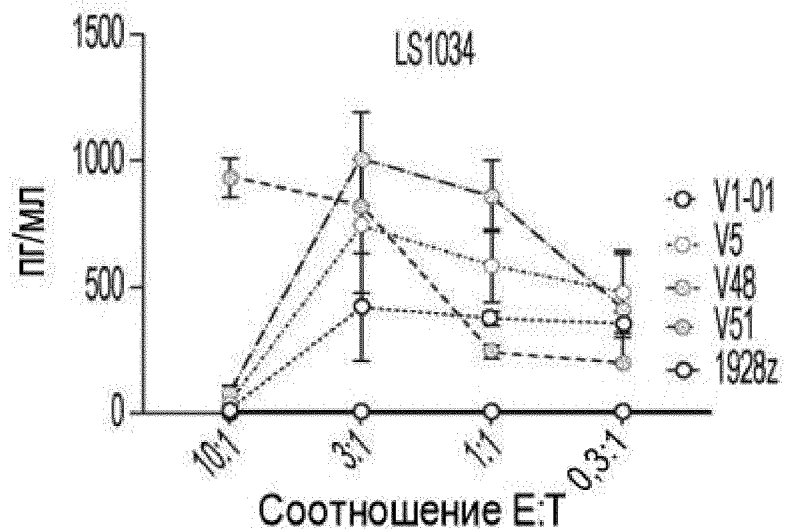
Фиг. 6А



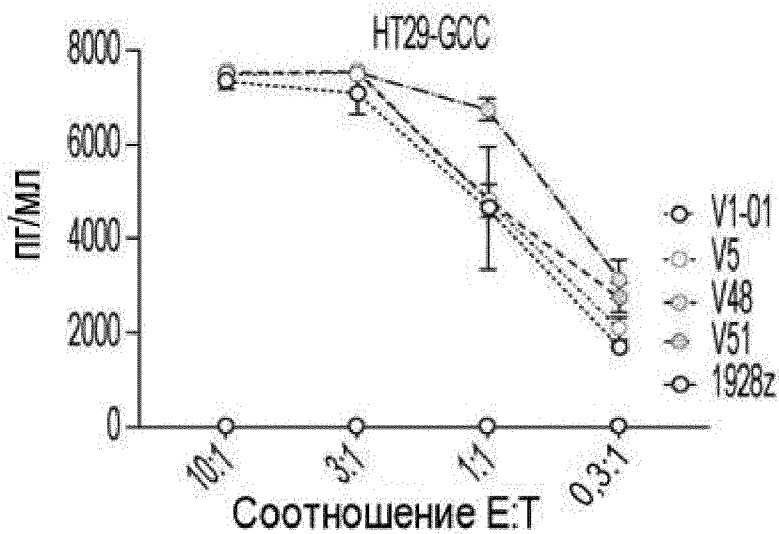
Фиг. 6В



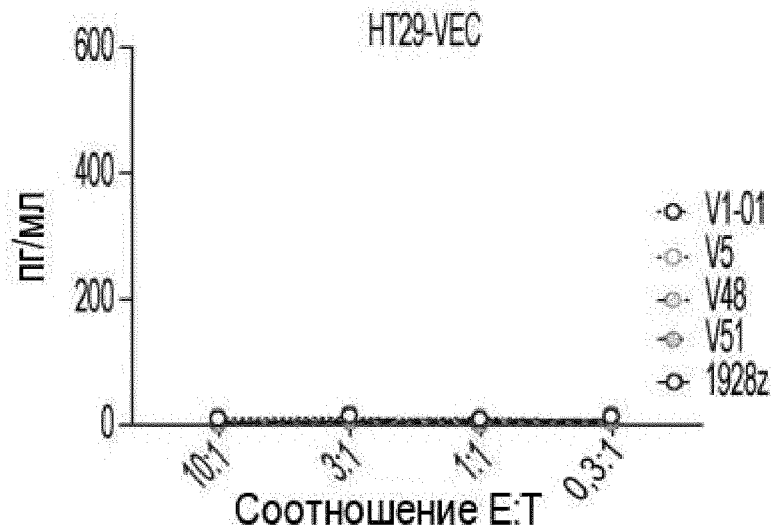
Фиг. 6С



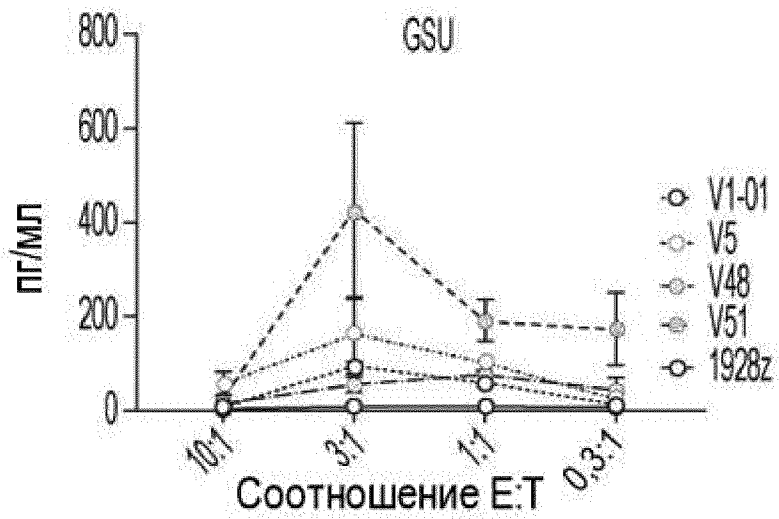
Фиг. 6D



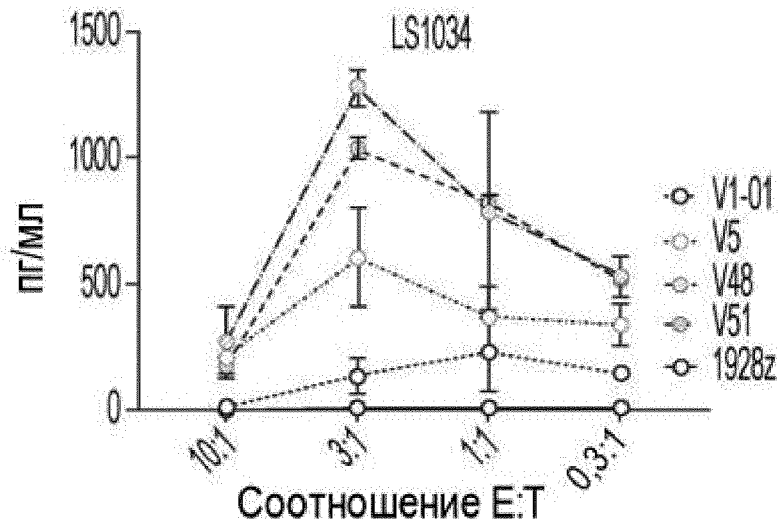
Фиг. 7А



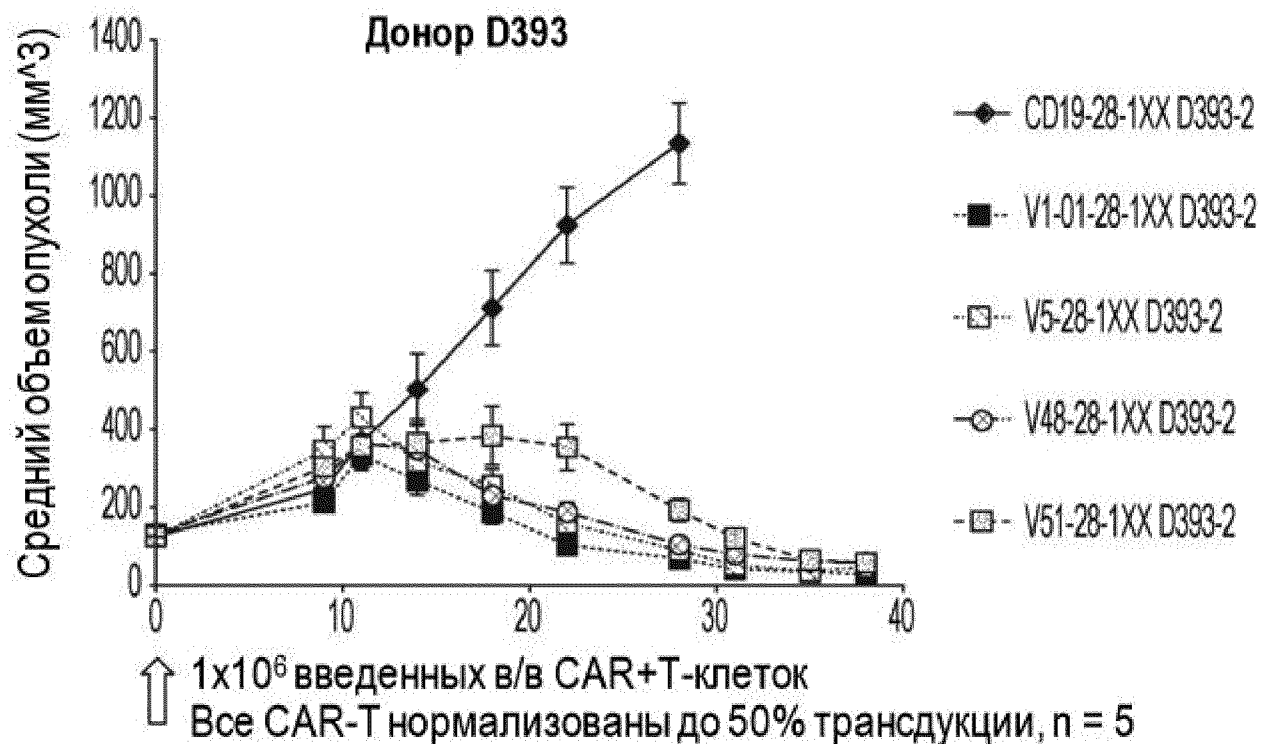
ФИГ. 7В



Фиг. 7С

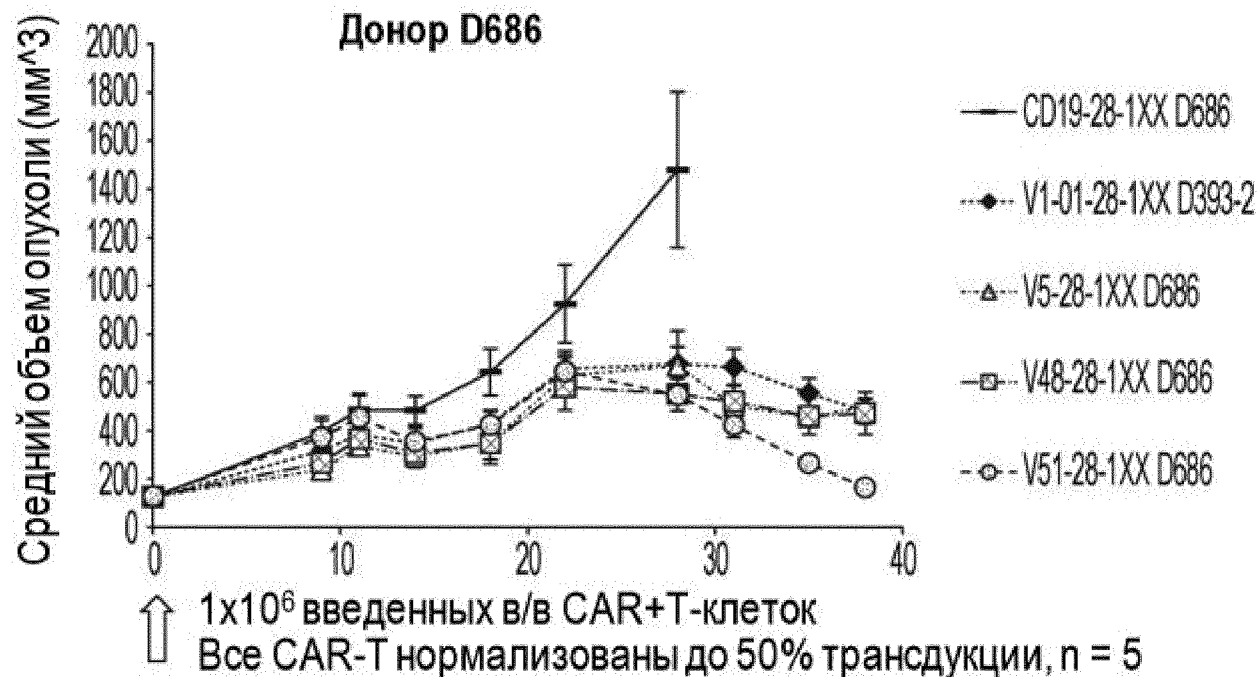


Фиг. 7D

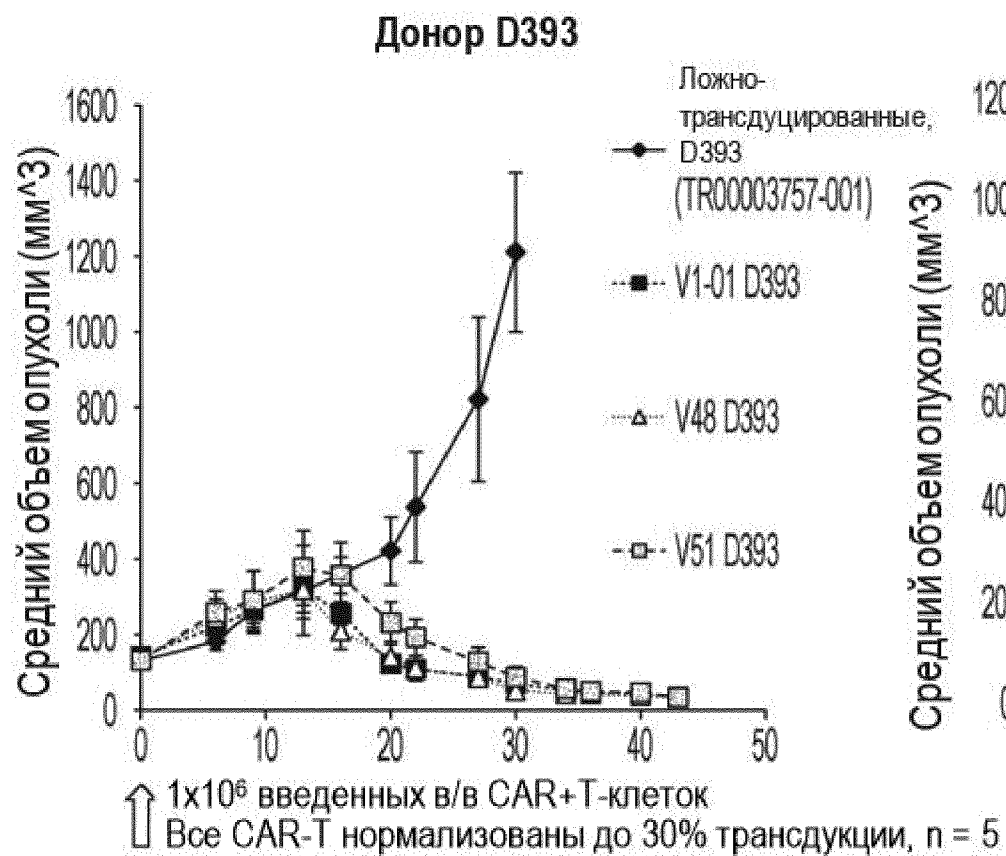


Фиг. 8А

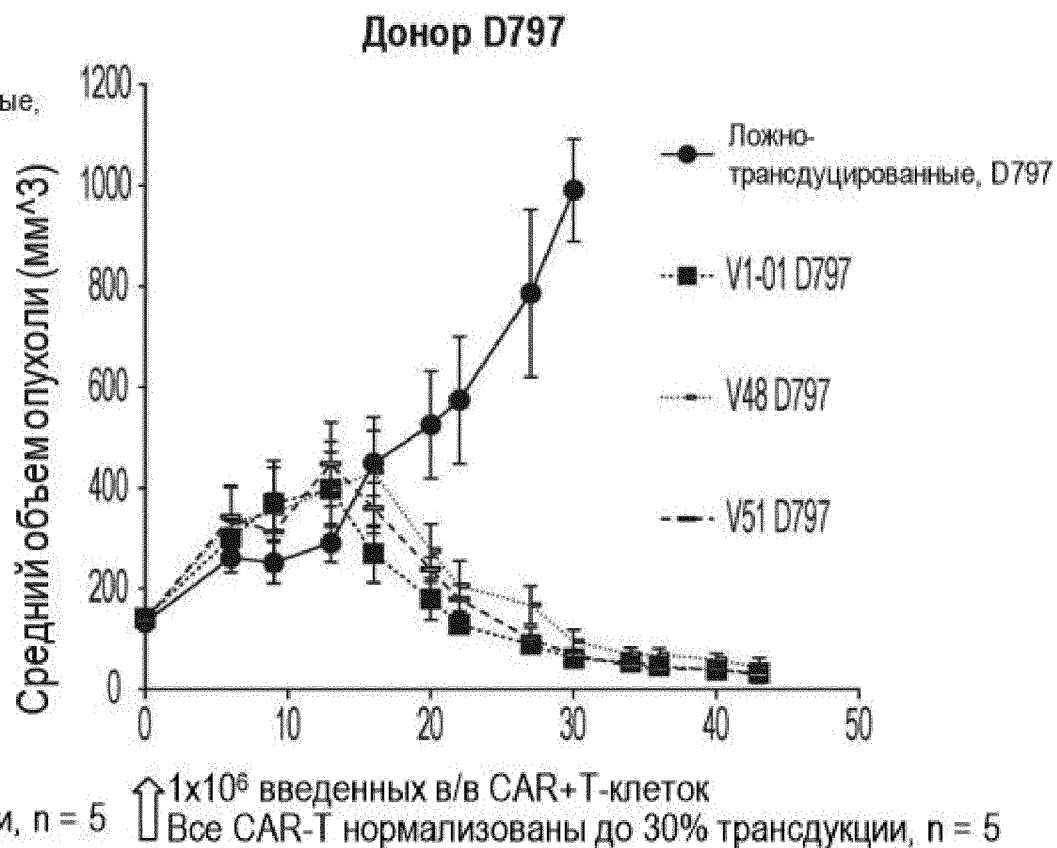




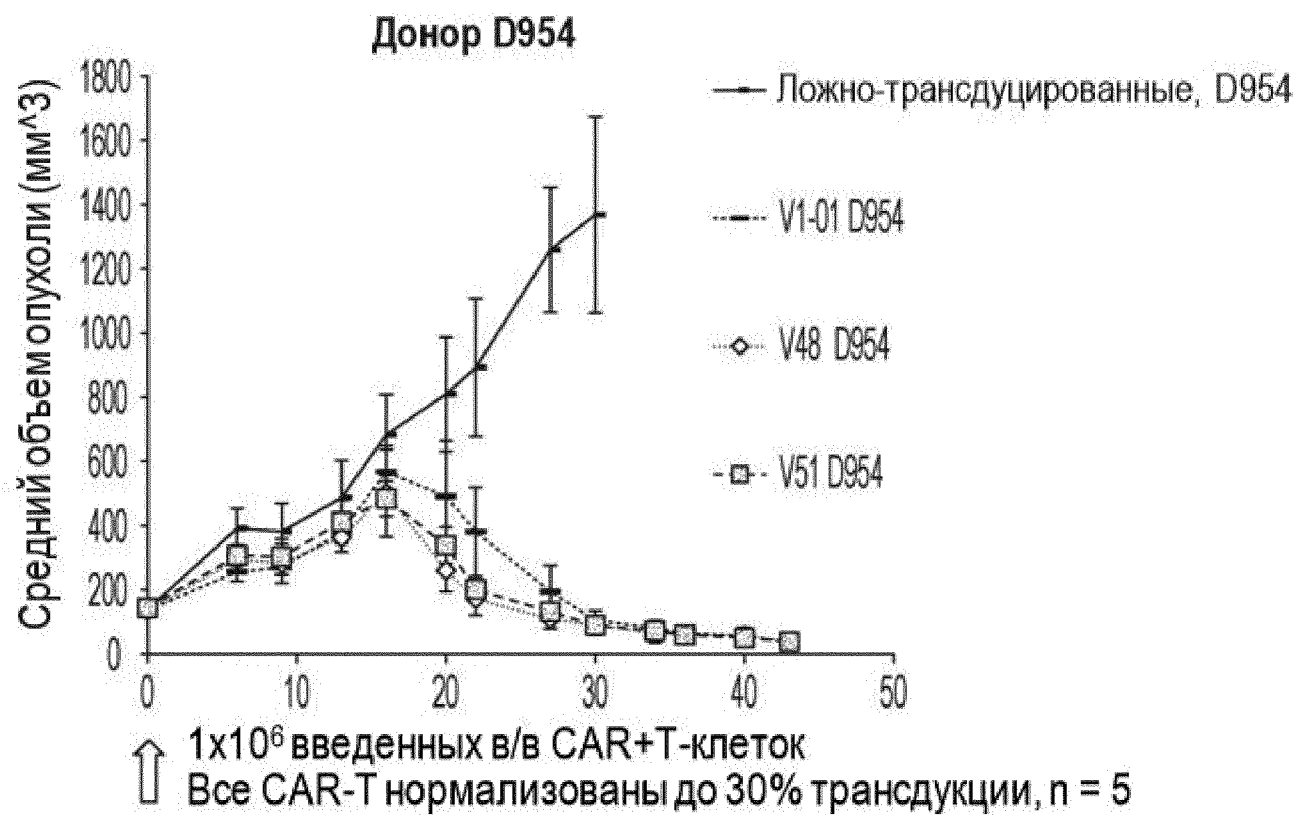
Фиг. 8В



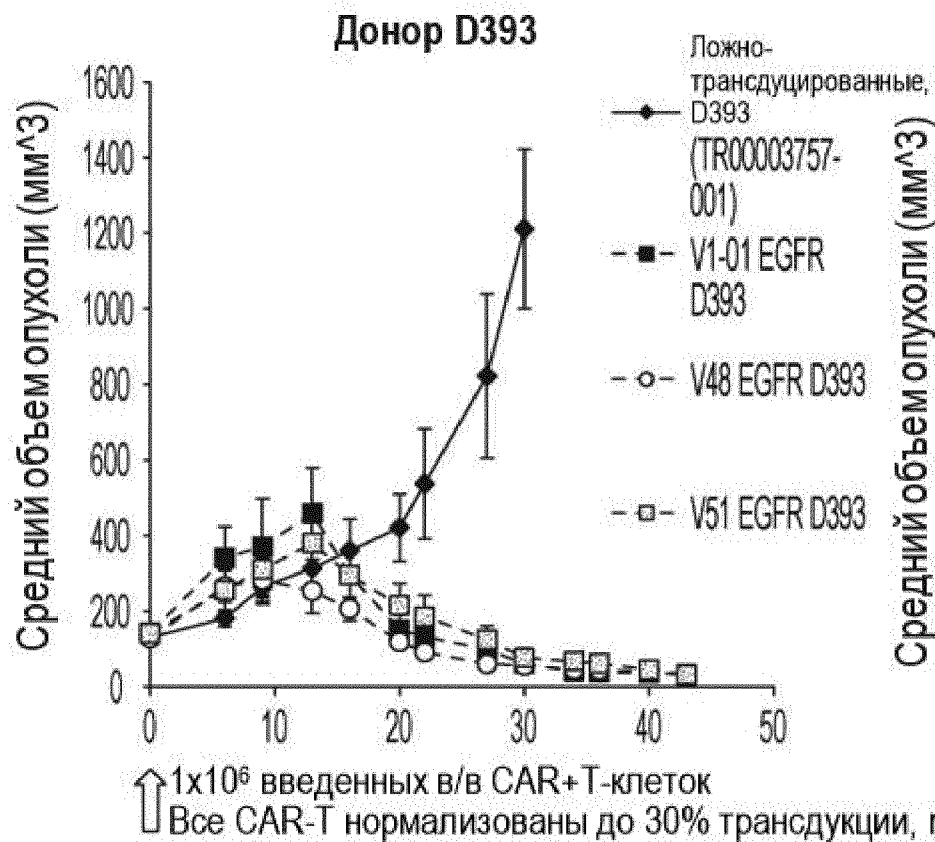
Фиг. 9А



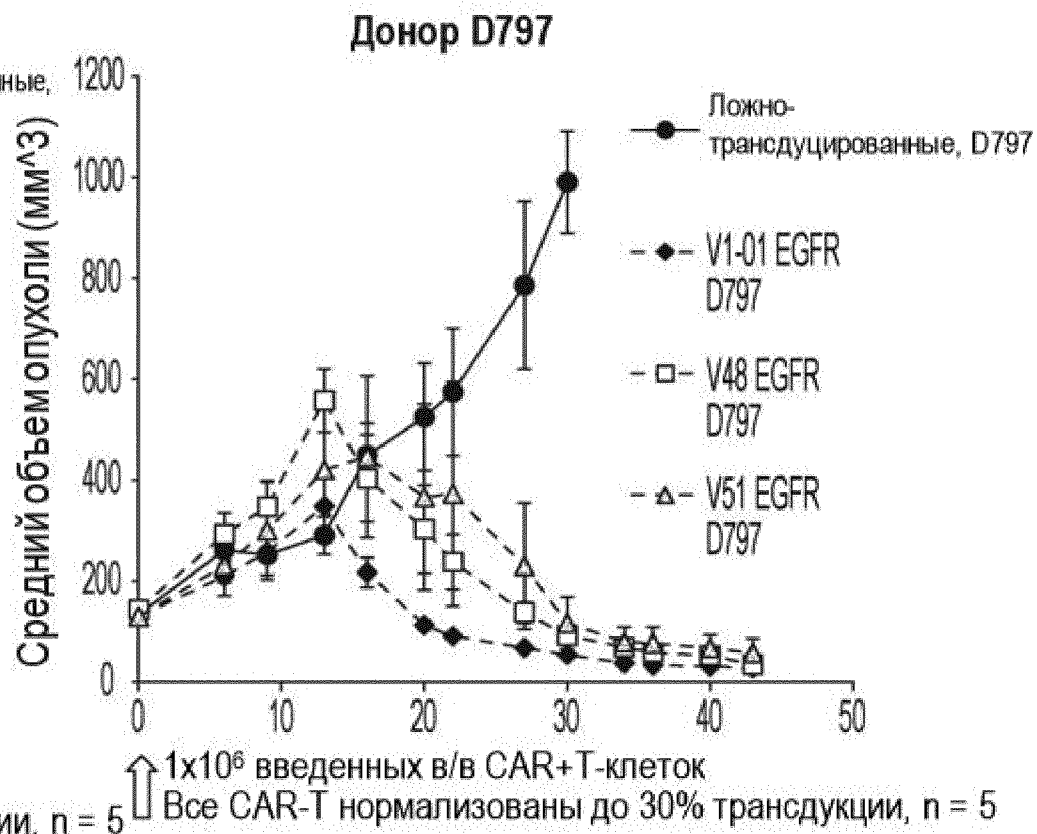
Фиг. 9В



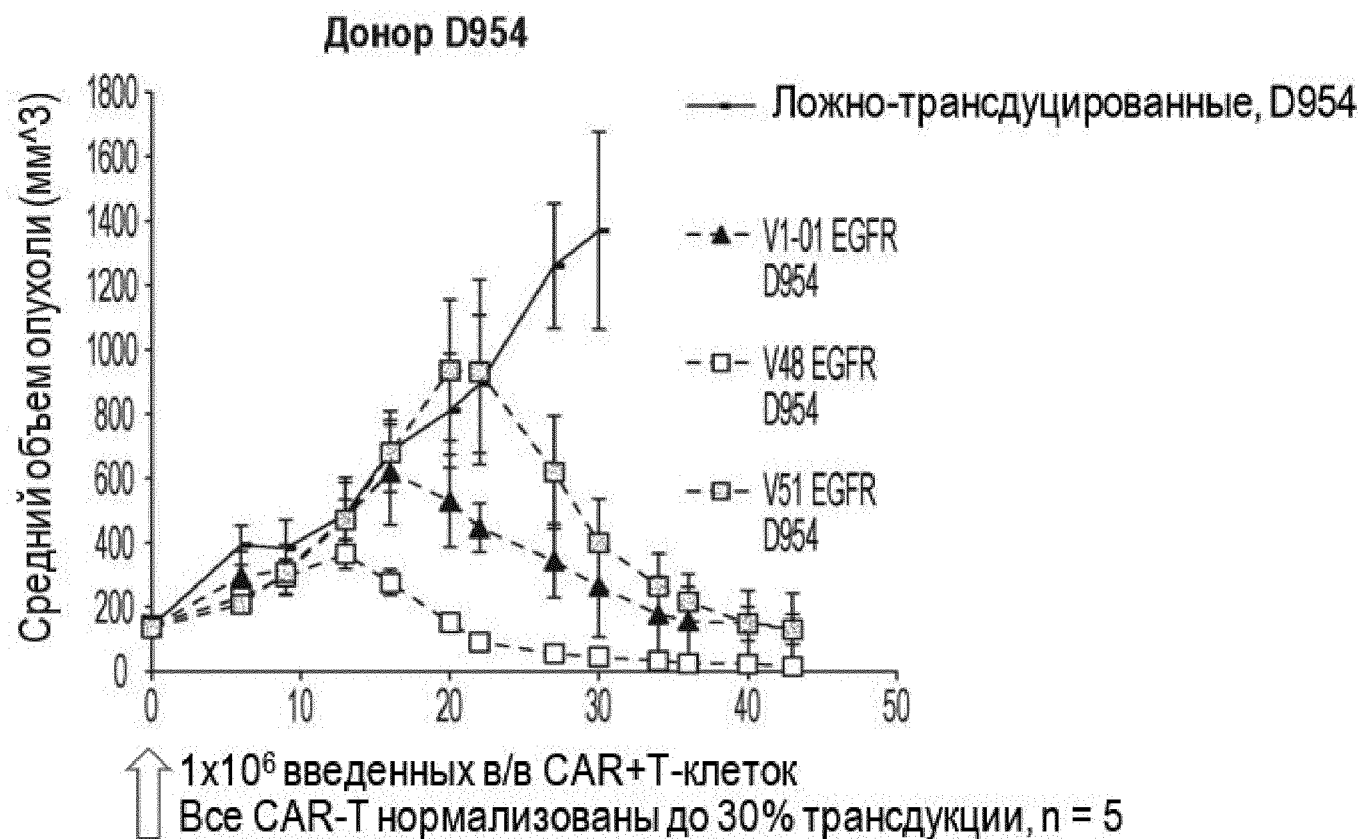
Фиг.9С



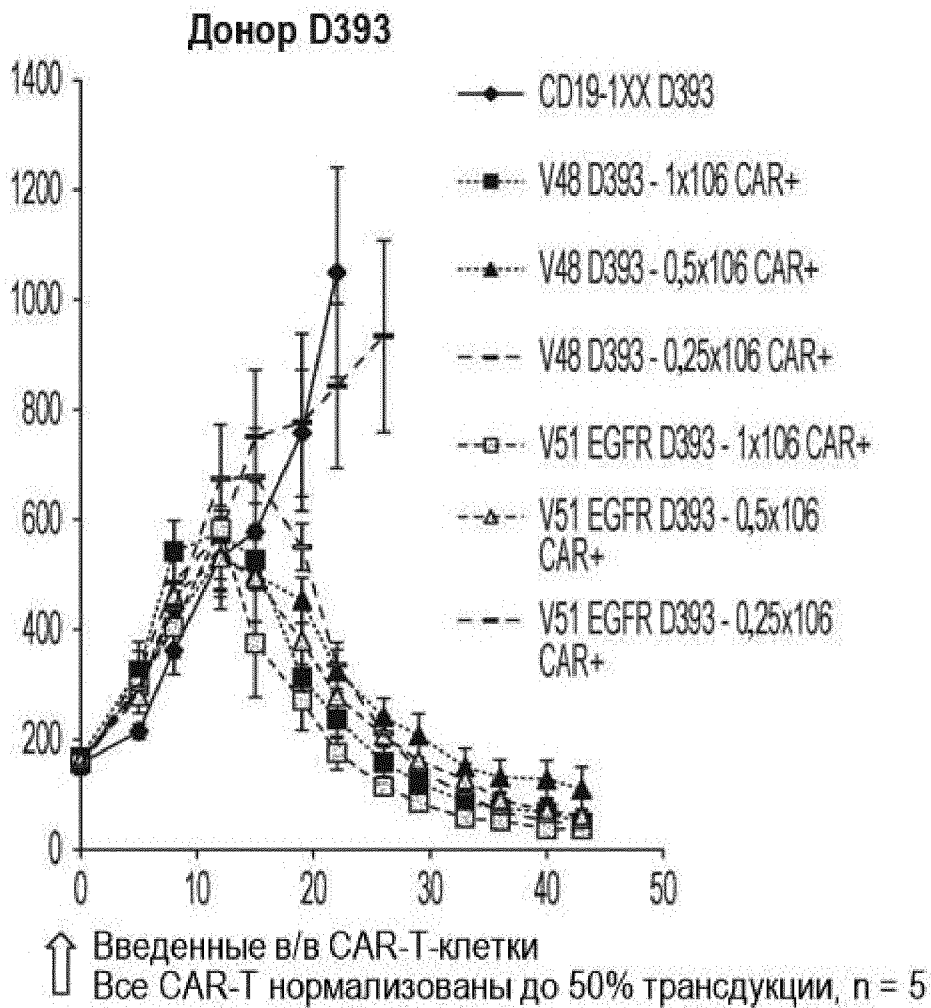
Фиг. 10А



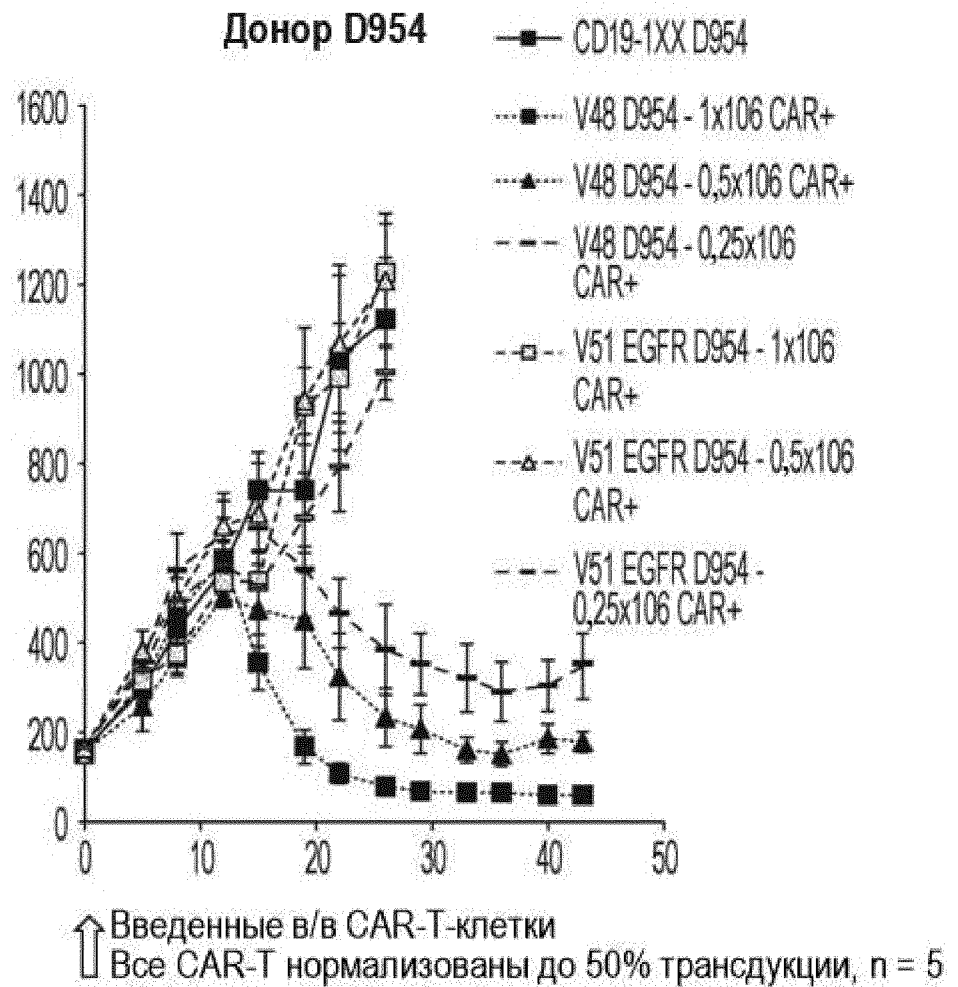
Фиг. 10В



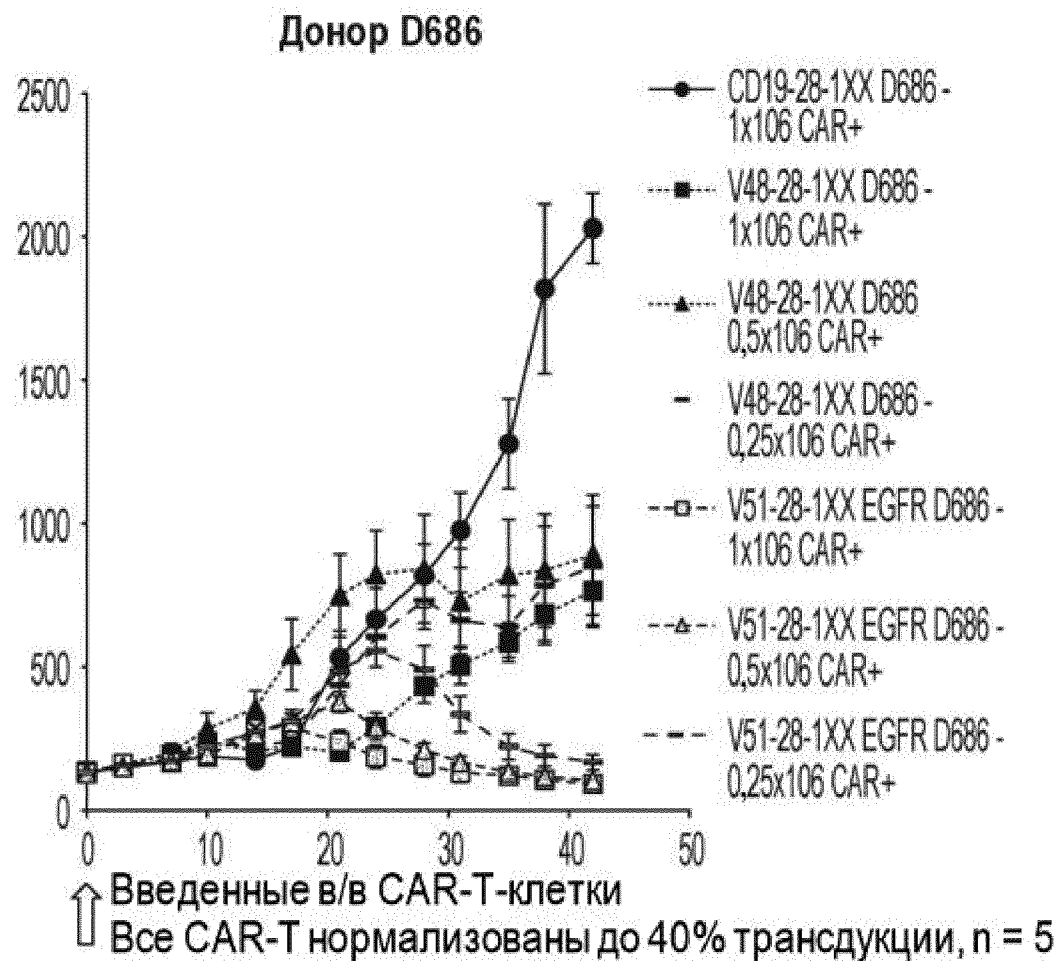
Фиг. 10С



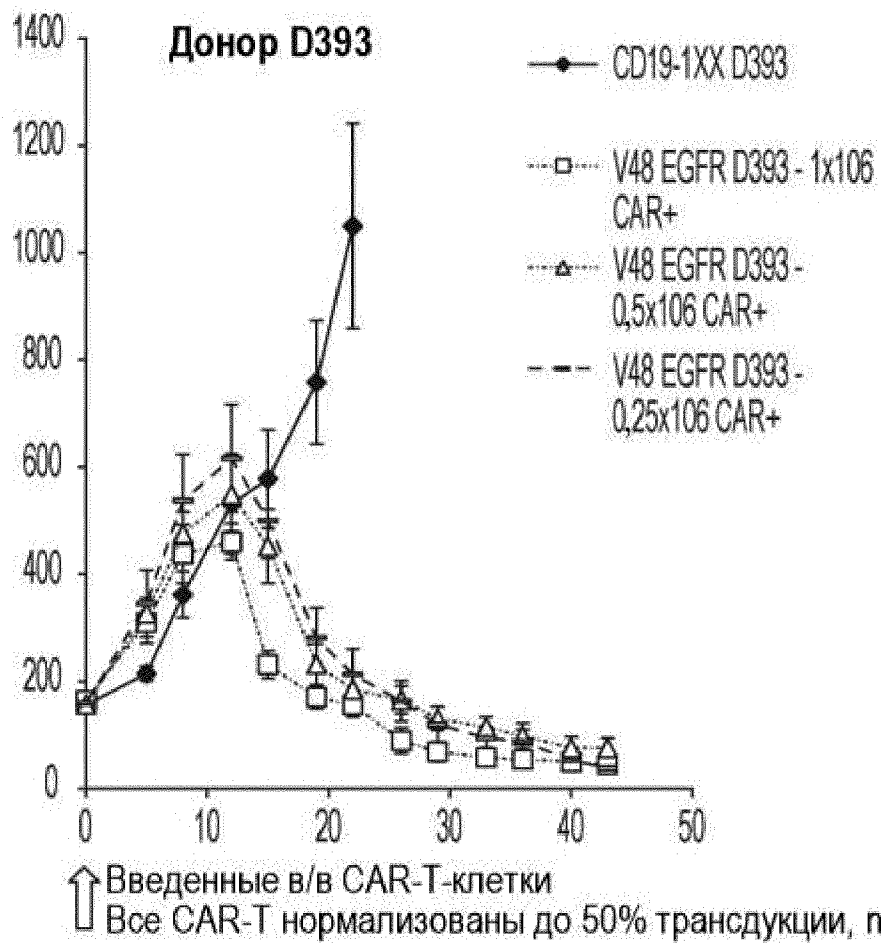
Фиг. 11А



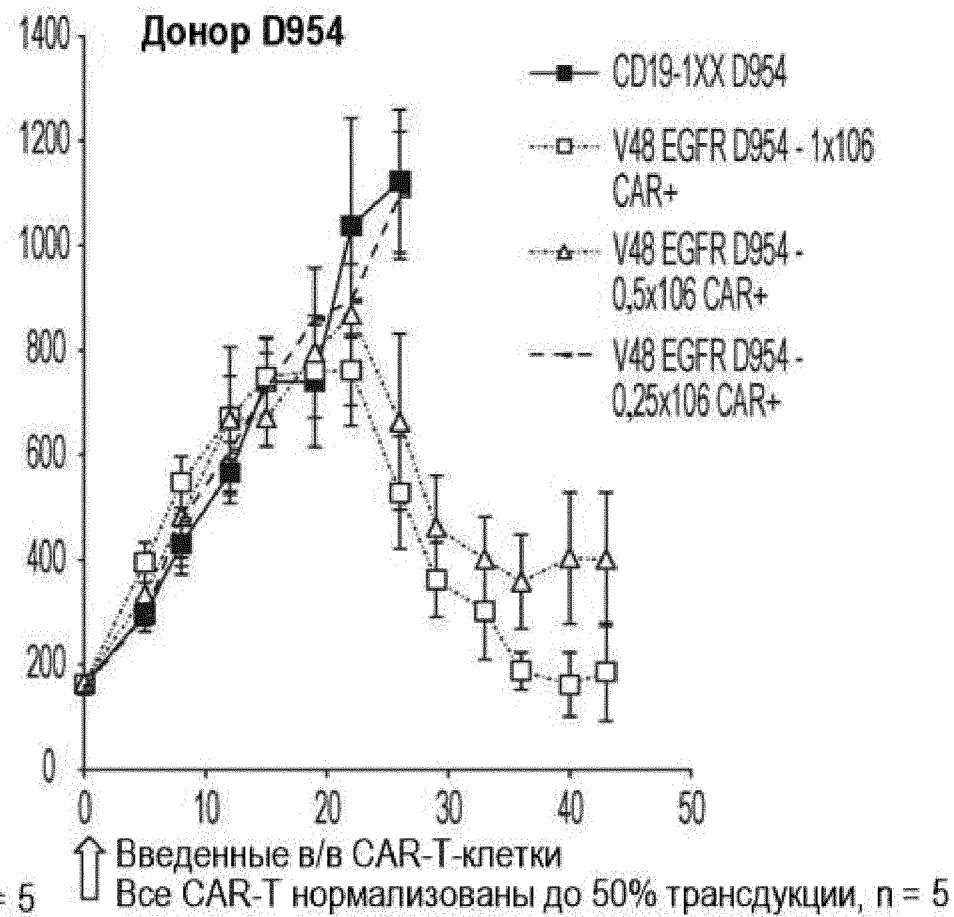
Фиг. 11В



Фиг. 11С

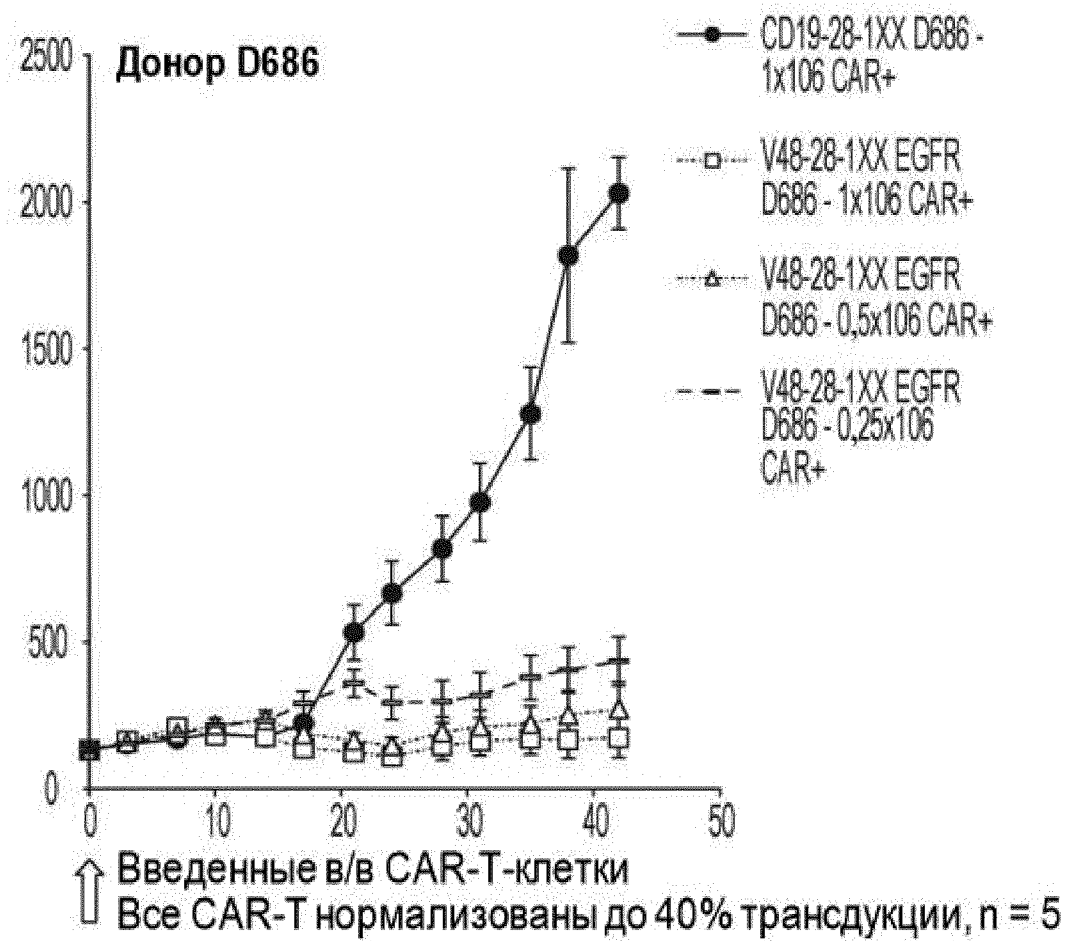


Фиг. 12А

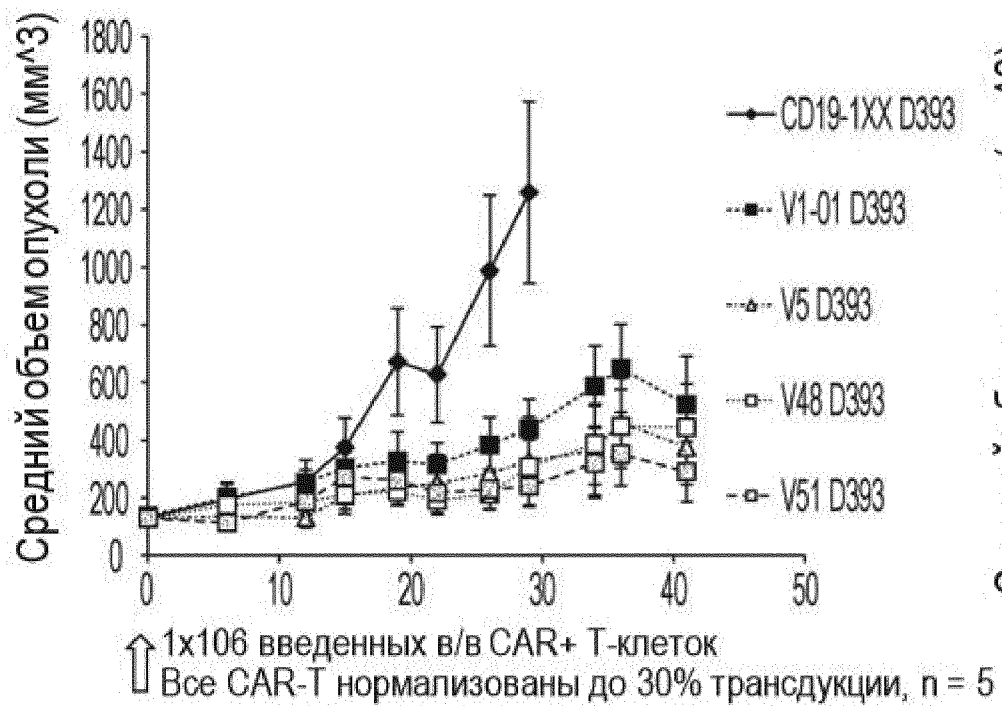


Фиг. 12В

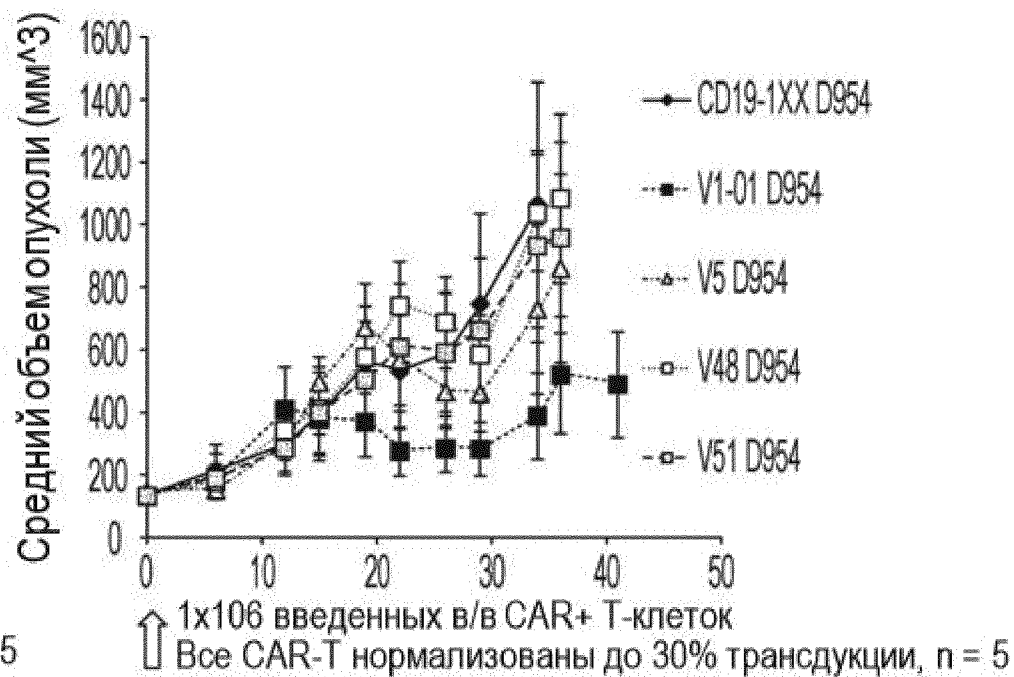




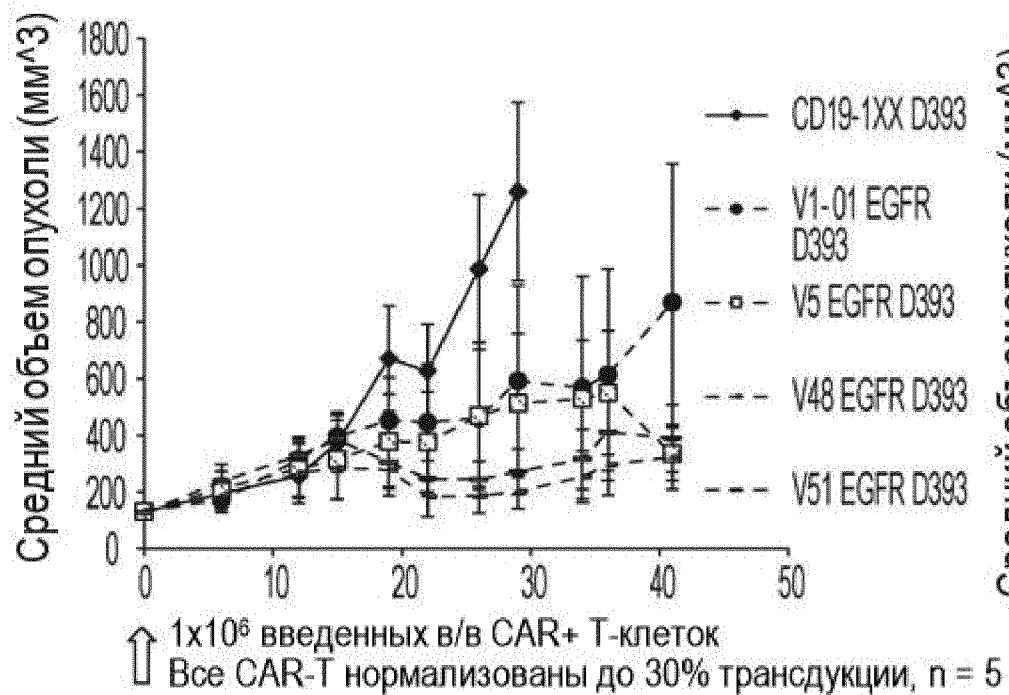
Фиг. 12С



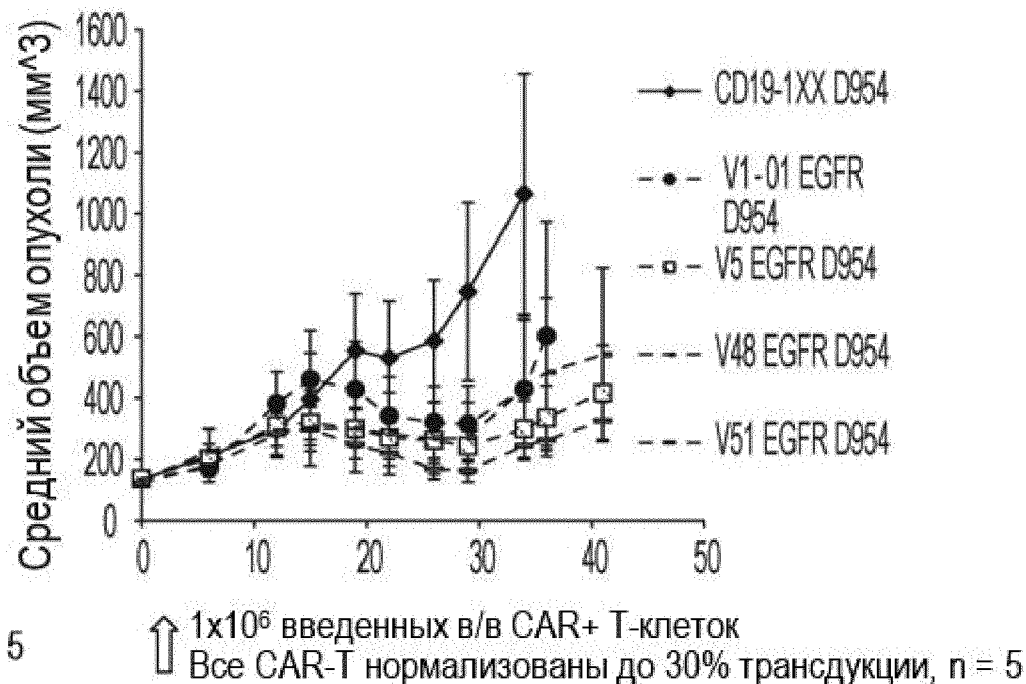
Фиг. 13А



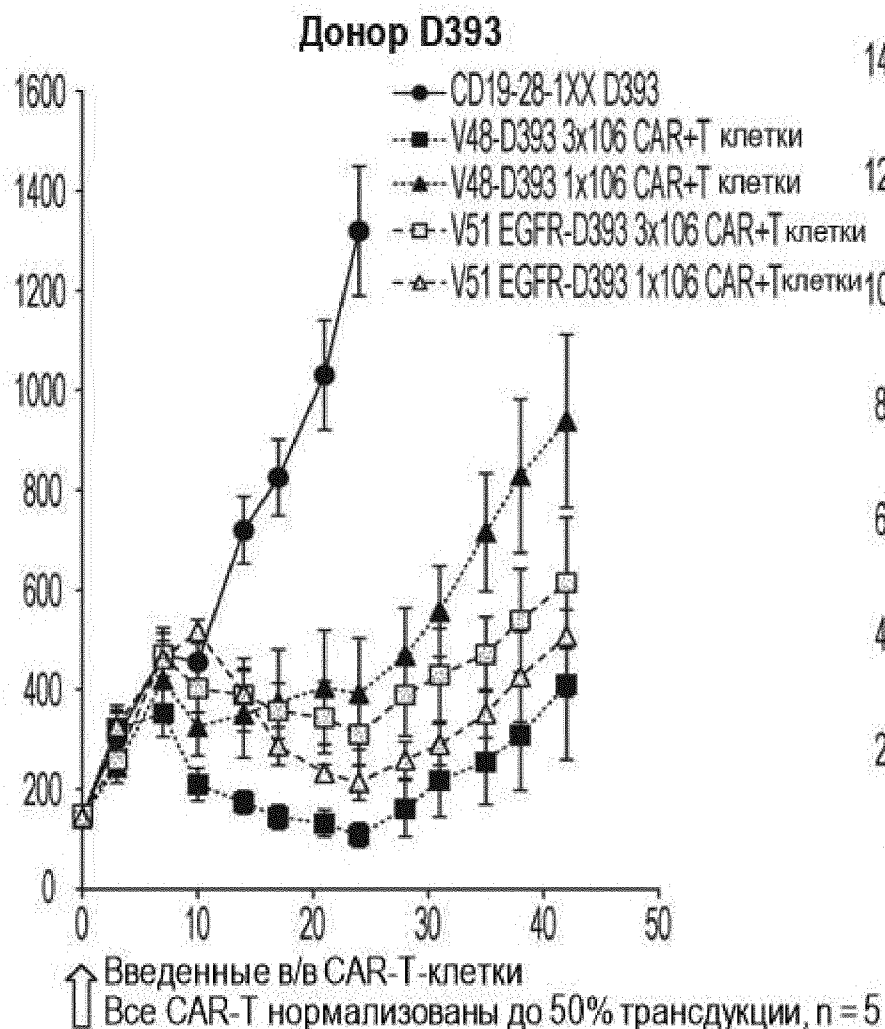
Фиг. 13В



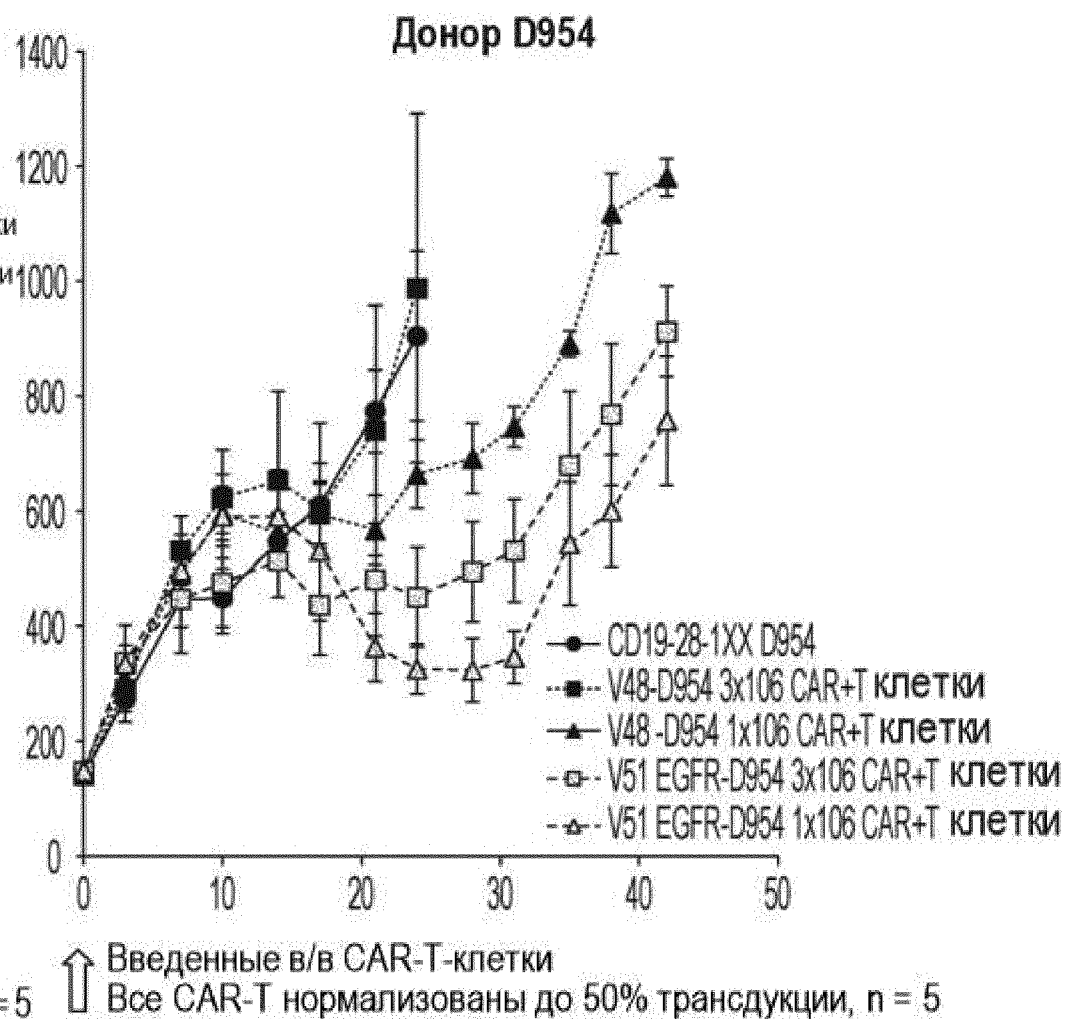
Фиг. 14А



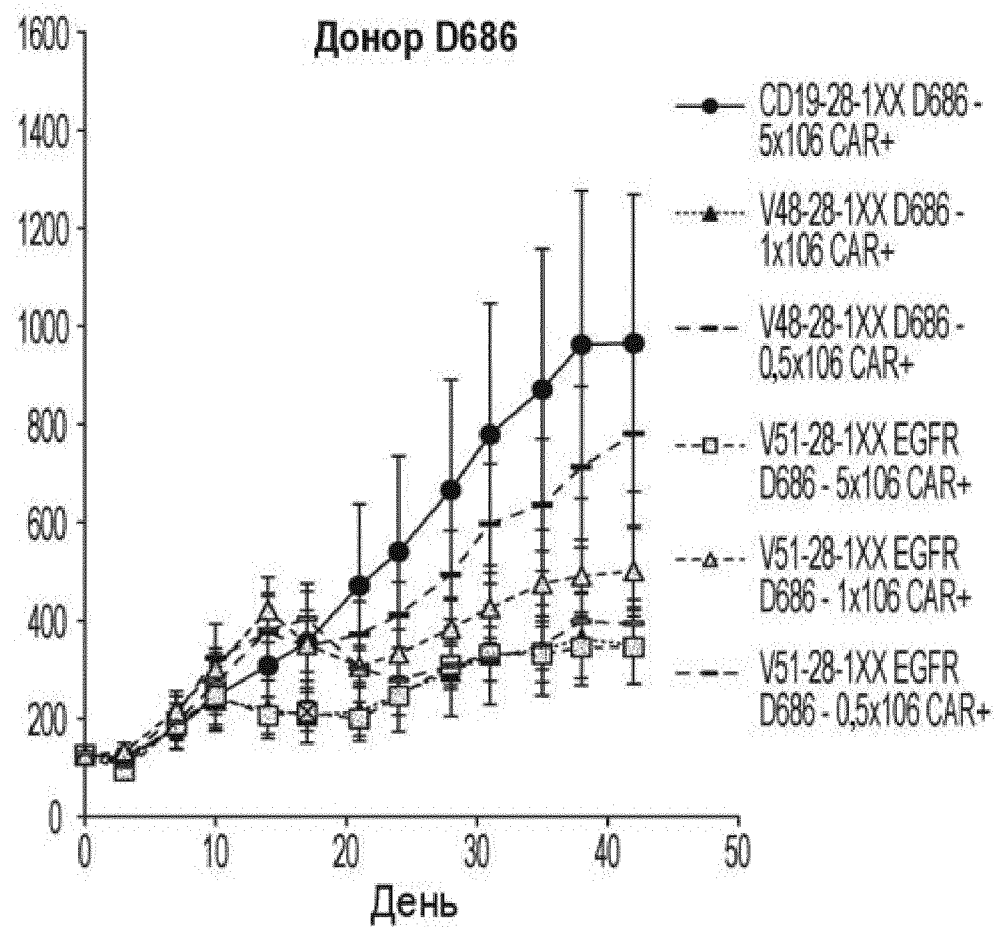
Фиг. 14В



Фиг. 15А

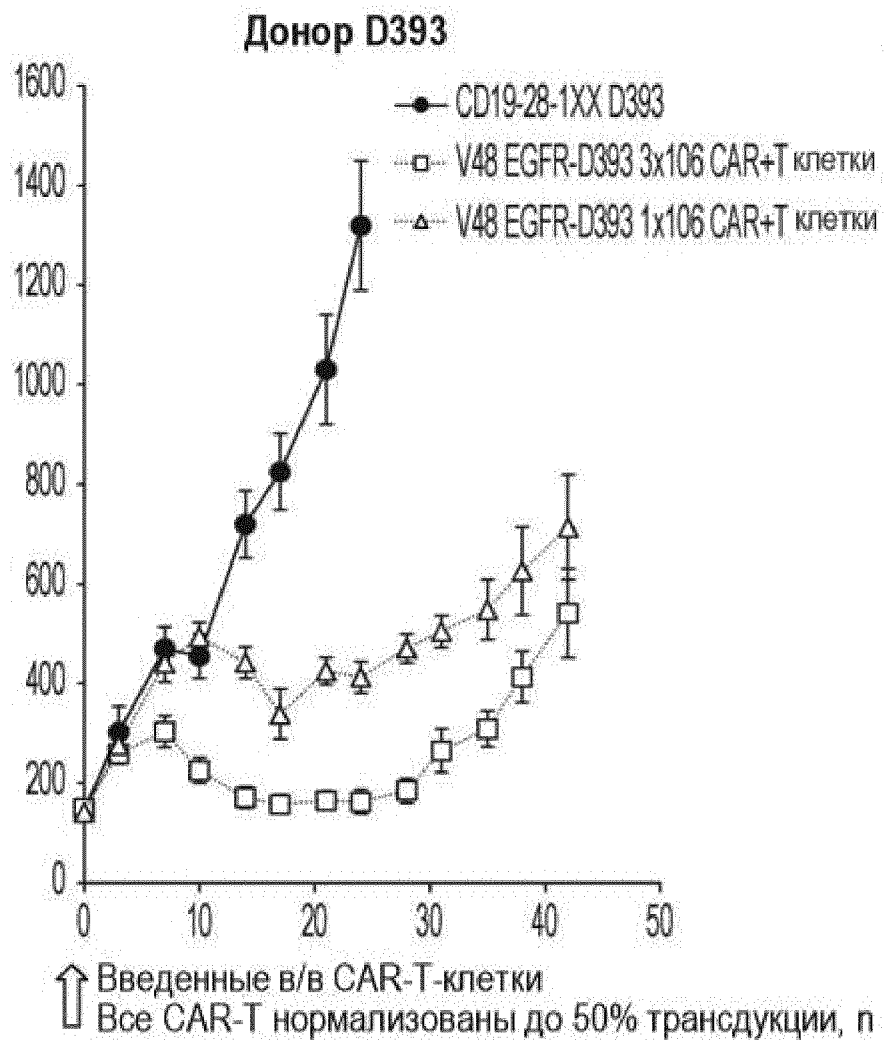


Фиг. 15В

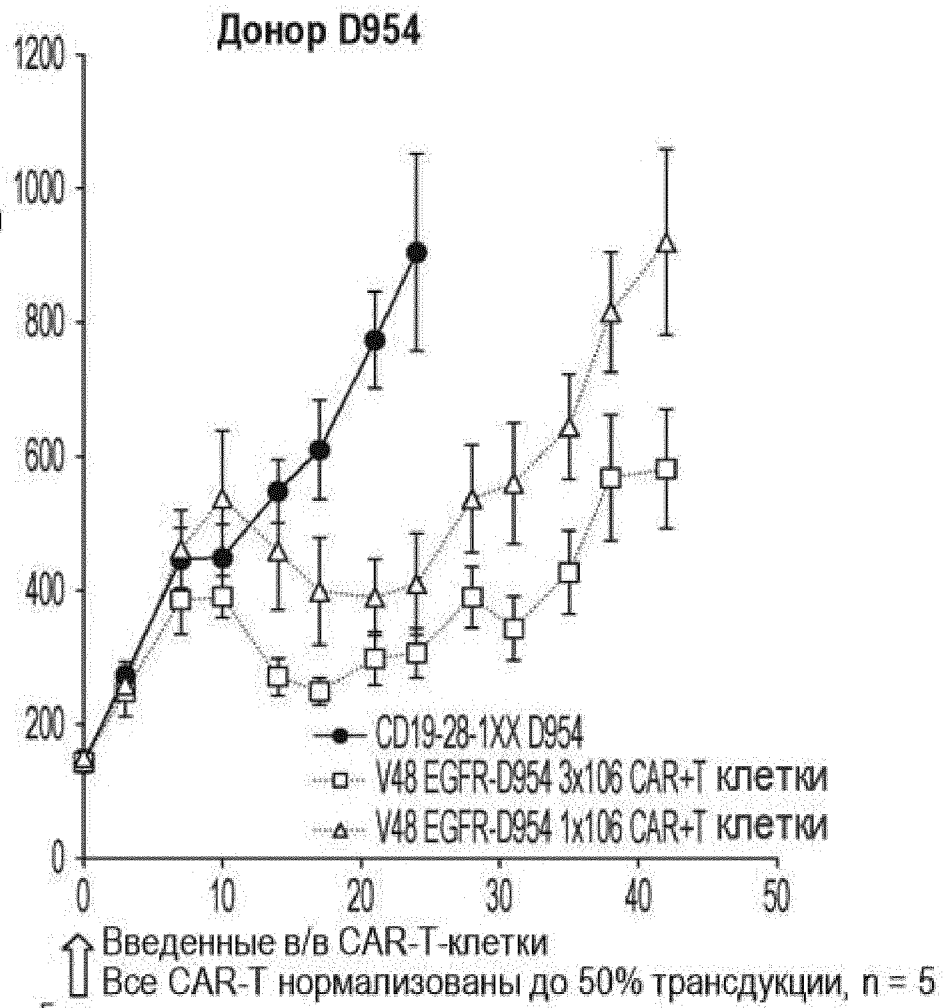


↑ Введенные в/в CAR-T-клетки  
 ↑ Все CAR-T нормализованы до 40% трансдукции, n = 5

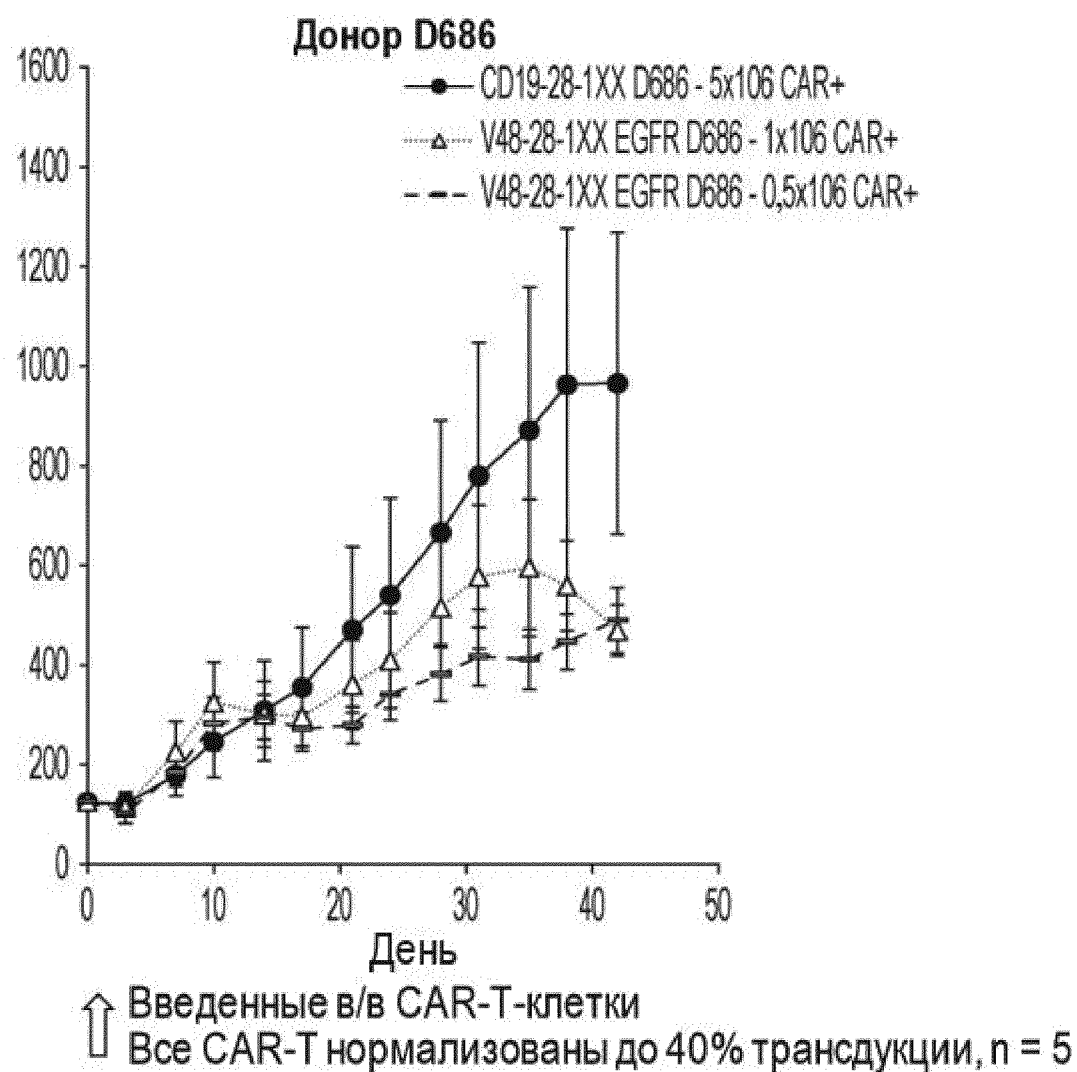
Фиг. 15C



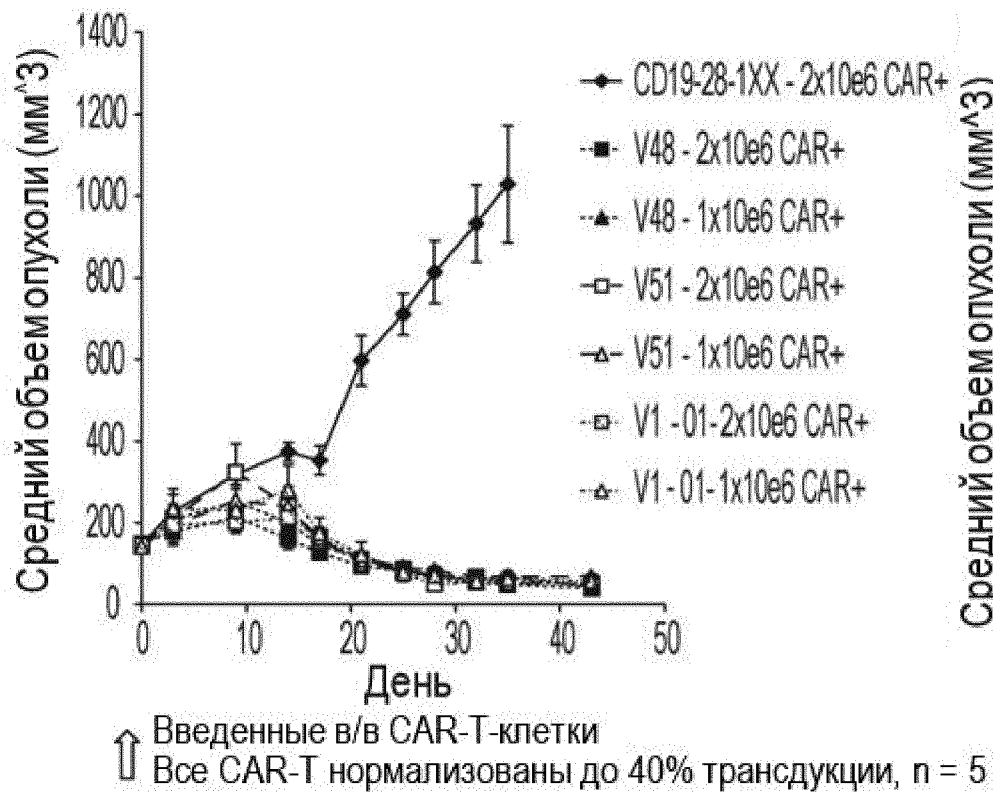
Фиг. 16А



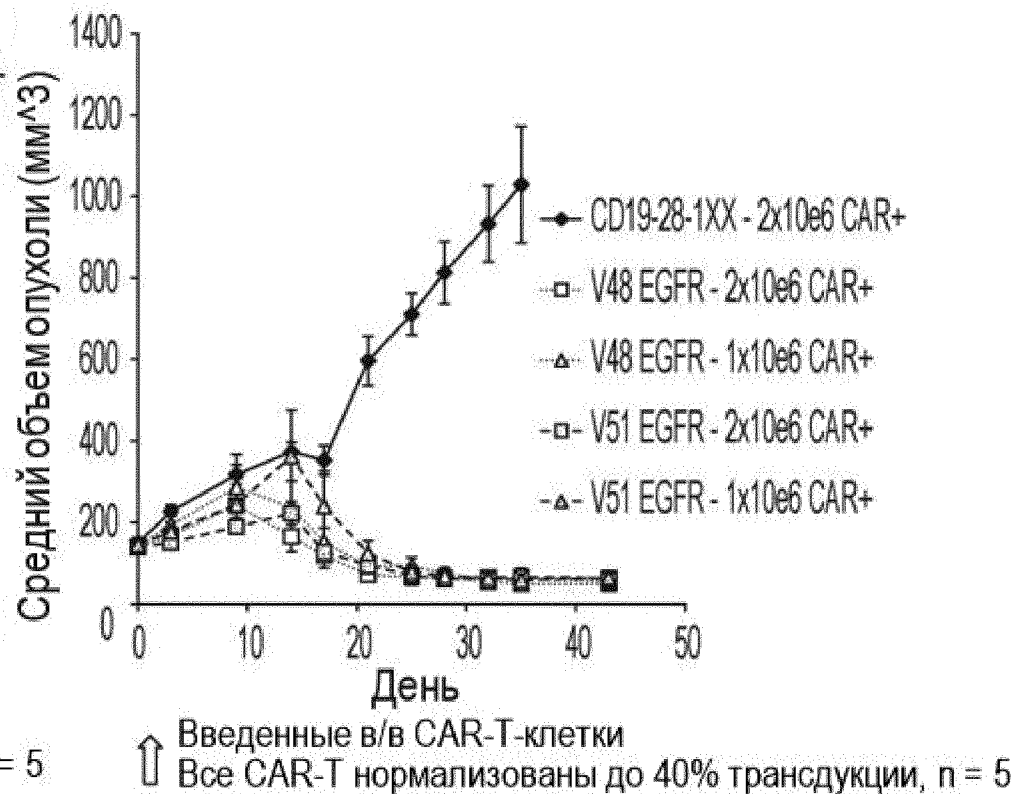
Фиг. 16В



Фиг. 16С



Фиг. 17



Фиг. 18