

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391717** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.08.29

(22) Дата подачи заявки
2021.12.09

(51) Int. Cl. **A61K 35/17** (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

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

(31) **63/123,333**

(32) **2020.12.09**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2021/000852**

(87) **WO 2022/123307 2022.06.16**

(71) Заявитель:

**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP);
КРЕШЕНДО БАЙОЛОДЖИКС ЛТД
(GB)**

(72) Изобретатель:

**Шапиро Гэри, Хэ Синъюэ, Ын Мэй
Роза (US), Томпсон Лоррейн, Де Хуан
Франко Елена, Ванс Стивен (GB)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Описаны антигенсвязывающие агенты (например, однодоменные антитела), которые связывают гуанилатциклазу С (GCC). Также описаны нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, клетки-хозяева, антигенсвязывающие фрагменты и фармацевтические композиции, содержащие эти антигенсвязывающие агенты и их фрагменты. Данное изобретение также обеспечивает терапевтические способы применения антител и антигенсвязывающих молекул, представленных в данном документе.



**202391717
A1**

**202391717
A1**

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. № 63/123333, поданной 9 декабря 2020 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Данная заявка содержит перечень последовательностей, поданный в электронном виде в формате ASCII и включенный в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Указанный текстовый файл ASCII, полностью включенный в данный документ посредством ссылки, созданный 18 ноября 2021 г., называется «MIL-011WO_SL» и имеет размер 33391 байт.

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, среди прочего, новые антигенсвязывающие молекулы к GCC (например, однодоменные антитела (sdAb)).

[0005] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), содержащий переменную 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).

[0006] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), состоящий из вариабельной области 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).

[0007] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), содержащий 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).

[0008] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), состоящий из вариабельной области 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).

[0009] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), содержащий 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).

[0010] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), состоящий из вариабельной области 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).

[0011] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), содержащий 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).

[0012] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), состоящий из вариабельной области тяжелой цепи (V_H) с последовательностями определяющих комплементарность областей (CDR) RYWMT

(HCDR1) (SEQ ID NO: 10), KIRHDGGGEKYYPSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 14) и DYNKDL (HCDR3) (SEQ ID NO: 19).

[0013] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H) с последовательностями определяющими комплементарность областей (CDR) RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10), KIRHDGGGEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 15) и DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18).

[0014] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), состоящий из переменной области тяжелой цепи (V_H) с последовательностями определяющими комплементарность областей (CDR) RYWMT (HCDR1) (SEQ ID NO: 10), KIRHDGGGEKYYADSVKG (HCDR2) (SEQ ID NO: 15) и DYNKDY (HCDR3) (SEQ ID NO: 18).

[0015] В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент содержит переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 20.

[0016] В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент состоит из переменной области тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающей аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 20.

[0017] В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент содержит переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 21.

[0018] В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент состоит из переменной области тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающей аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности SEQ ID NO: 21.

[0019] В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент содержит переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 26.

[0020] В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент состоит из переменной области тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающей

аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности SEQ ID NO: 26.

[0021] В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент содержит переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 27.

[0022] В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент состоит из переменной области тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающей аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности SEQ ID NO: 27.

[0023] В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент содержит переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 28.

[0024] В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент состоит из переменной области тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающей аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности SEQ ID NO: 28.

[0025] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 20.

[0026] В некоторых вариантах осуществления предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), состоящий из переменной области тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающей аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 20.

[0027] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 21.

[0028] В некоторых вариантах осуществления предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), состоящий из переменной области тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающей аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 21.

[0029] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 26.

[0030] В некоторых вариантах осуществления предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), состоящий из переменной области тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающей аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 26.

[0031] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 27.

[0032] В некоторых вариантах осуществления предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), состоящий из переменной области тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающей аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 27.

[0033] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), содержащий переменную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 28.

[0034] В некоторых вариантах осуществления предложен агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC), содержащий или состоящий из переменной области тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, включающей аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 28.

[0035] В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент содержит область V_H , включающую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1, 20, 21, 26, 27 или 28.

[0036] В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент состоит из области V_H , включающей аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1, 20, 21, 26, 27, или 28.

[0037] В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент содержит область V_H , включающую аминокислотную последовательность, которая идентична любой из SEQ ID NO: 1, 20, 21, 26, 27, или 28.

[0038] В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент состоит из области V_H , включающей аминокислотную последовательность, которая идентична любой из SEQ ID NO: 1, 20, 21, 26, 27, или 28.

[0039] 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')₂, фрагмента Fd', фрагмента Fd, выделенных CDR или их наборов; одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), слитой молекулы полипептид-Fc, однодоменного антитела (sdAb), 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.

[0040] В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент представляет собой однодоменное антитело (sdAb). В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент представляет собой однодоменное антитело V_H .

[0041] В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент представляет собой антитело, состоящее только из тяжелых цепей.

[0042] В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент связывает GCC с KD от около 0,3 наномоль/л (нМ) до около 10 нМ.

[0043] В некоторых вариантах осуществления связывающий GCC агент связывает GCC на клетках-мишенях с EC₅₀ от около 0,5 нМ до около 8 нМ.

[0044] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ лечения рака, включающий введение связывающего GCC агента, описанного в данном документе, субъекту, нуждающемуся в лечении.

[0045] 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.

[0046] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

[0047] В некоторых вариантах осуществления рак желудочно-кишечного тракта представляет собой рак толстой кишки, колоректальный рак, рак желудка или рак пищевода.

[0048] В одном аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая связывающий GCC агент и фармацевтически приемлемый носитель, причем связывающий GCC агент содержит: переменную 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); переменную 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); переменную 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); переменную 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 переменную 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).

[0049] 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 (V_H) 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 (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); переменную 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); переменную 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).

[0050] В одном аспекте в настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотную последовательность V_H , которая идентична любой из SEQ ID NO: 1, 20, 21, 26, 27 или 28.

[0051] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность V_H , которая идентична любой из SEQ ID NO: 1, 20, 21, 26, 27, или 28.

[0052] В одном аспекте в настоящем изобретении предложена выделенная клетка, содержащая вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность V_H , которая идентична любой из SEQ ID NO: 1, 20, 21, 26, 27, или 28.

[0053] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен химерный антигенный рецептор (CAR) к гуанилатциклазе C (GCC), где CAR к GCC содержит связывающий агент к GCC по любому из пп. 1-10.

[0054] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ индукции иммунного ответа, включающий приведение клеток в контакт с химерным антигенным рецептором (CAR) к гуанилатциклазе C (GCC), где CAR к GCC содержит связывающий агент к GCC по любому из пп. 1-10.

[0055] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ индукции цитотоксичности, включающий приведение клеток в контакт с химерным антигенным рецептором (CAR) к гуанилатциклазе C (GCC), где CAR к GCC содержит связывающий агент к GCC по любому из пп. 1-10.

[0056] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ обнаружения злокачественного новообразования у млекопитающего, включающий: (a) приведение в контакт образца, содержащего одну или более клеток млекопитающего, со связывающим агентом к GCC по любому из пп. 1-10, тем самым образуя комплекс, и (b) обнаружение комплекса, при этом обнаружение комплекса свидетельствует о наличии злокачественного новообразования у млекопитающего.

[0057] В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт осуществляют *in vitro* или *in vivo* в отношении млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт осуществляют *in vitro*.

[0058] 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

[0059] Чертежи, включенные в данный документ, которые состоят из следующих фигур, предназначены исключительно для иллюстрации, а не для ограничения.

[0060] На *Фиг. 1А и 1В* показаны иллюстративные конструкции химерного антигенного рецептора (CAR).

[0061] На *Фиг. 2А-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. 2А); HT29-VEC (GCC-отрицательной линии клеток с векторным контролем) (Фиг. 2В); и две линии опухолевых клеток, эндогенно экспрессирующие GCC: GSU (Фиг. 2С) 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).

[0062] На *Фиг. 3А-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. 3А); HT29-VEC (GCC-отрицательной линии клеток с векторным контролем) (Фиг. 3В); и две линии опухолевых клеток, эндогенно экспрессирующие GCC: GSU (Фиг. 3С) 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. Цитотоксичность CAR-Т определяли в присутствии укороченного EGFR (tEGFR).

[0063] На *Фиг. 4А-4D* показана иллюстративная секреция цитокинов IFN-гамма Т-клетками с CAR к GCC, совместно культивируемыми с клетками, экспрессирующими GCC, (HT29-GCC) (Фиг. 4А), GSU (фиг. 4С), LS1034 (Фиг. 4D), и GCC-отрицательными (HT29-VEC, Фиг. 4В) 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).

[0064] 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).

[0065] 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).

[0066] 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 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 присутствии укороченного EGFR (tEGFR).

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0067] Для того, чтобы настоящее изобретение было более понятным, сначала представлены определения некоторых терминов. Дополнительные определения для следующих терминов и других терминов изложены в описании.

[0068] 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.

[0069] *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.

[0070] *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, GСС), 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).

[0071] *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.

[0072] *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.

[0073] *Аллогенный:* «аллогенный» относится к материалу, полученному от одного индивида и введенному другому индивиду или индивидам.

[0074] *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')₂ и Fv; триатела; тетраатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител; однодоменные антитела; 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 (κ и λ), несколько классов тяжелых цепей (например, μ , γ , α , ϵ , δ) и определенные подклассы тяжелых цепей (α_1 , α_2 , γ_1 , γ_2 , γ_3 и γ_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.

[0075] 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.]).

[0076] *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).

[0077] *Определяющая комплементарность область (CDR):* «CDR» переменного домена представляют собой аминокислотные остатки в пределах переменной 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 гиперпеременные 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: 1156-1166, 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.

[0078] Если не указано иное, используемые в данном документе определения CDR соответствуют CDR по Kabat.

[0079] *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, «мутация, 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)).

[0080] *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 Fc γ RIII, тогда как моноциты экспрессируют Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Экспрессия Fc 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 мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и природные клетки-киллеры (NK). 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).

[0081] *Антиген*: в контексте данного документа термин «антиген» относится к агенту, вызывающему иммунный ответ; и/или агенту, который связывается с T-клеточным рецептором (например, при презентации молекулой MHC) или с антителом (например, продуцируемым B-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 T-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.

[0082] *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.

[0083] *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®.

[0084] *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.

[0085] *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.

[0086] *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.

[0087] *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.

[0088] *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.

[0089] *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.

[0090] *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.

[0091] *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.

[0092] *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, линейризуется; например, нелинейный эпитоп).

[0093] *Экципиент:* в контексте данного документа термин «экципиент» относится к нетерапевтическому агенту, который может быть включен в фармацевтическую композицию, например, для обеспечения или достижения необходимой консистенции или стабилизирующего эффекта. Подходящие фармацевтические экципиенты 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.

[0094] *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.

[0095] *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.

[0096] *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.

[0097] *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: 5. 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.

[0098] *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.

[0099] *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™).

[0100] *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.

[0001] *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.

[0002] *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*).

[0101] *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.*

[0102] *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.

[0103] *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, 15th 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 рН и тому подобное, например, ацетат натрия или монолаурат сорбитана.

[0104] *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.

[0105] 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).

[0106] *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.

[0107] *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.

[0108] *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).

[0109] *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.

[0110] *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 и сохраняет специфичность связывания с антигеном в отсутствие легкой цепи или других фрагментов антитела. Эти термины используются в данном документе взаимозаменяемо. sdAb представляет собой один антигенсвязывающий полипептид, имеющий три определяющие комплементарности 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 переменного домена тяжелой цепи человека. В некоторых случаях однодоменные антитела конструируют из HCAb верблюдовых, а их переменные домены тяжелой цепи HCAb верблюдовых 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 VH или однодоменное антитело 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 антитело на основе одиночного переменного домена/одиночный переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, которые связывают антиген GCC в отсутствие легкой цепи.

[0111] *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.

[0112] *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.

[0113] *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 GCSF. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой клетку (например, популяцию клеток), экспрессирующую CAR к GCSF, описанную в данном документе.

[0114] *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 плаزمиды, либо как

часть хромосомы-хозяина. В некоторых вариантах осуществления трансформированная клетка транзистно экспрессирует введенную нуклеиновую кислоту в течение ограниченных периодов времени.

[0115] *Лечить или лечение:* в контексте данного документа термин «лечить» или «лечение» определяется как введение антигенсвязывающего агента к GСС (например, антитела к GСС или его фрагмента, 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).

[0116] *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.

[0117] *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 эпизомные 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

[0118] 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).

[0119] 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

[0120] 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: 29), который представляет собой пептид, продуцируемый *E. coli*, а также другими инфекционными организмами (Rao, M. C. *Ciba Found. Symp.* 112:74-93 (1985); Knoор 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):

MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSNCHNGSYEISVLMMGNSAFAEPLKNLEDAV
NEGLEIVRGR LQNAGLNVTVNATFMYS DGLIHNSGDCRSSTCEGLDLLRKISNAQRMGC
VLIGPSC TYSTFQMYLDTELSYPMISAGSFGLSCDYKETLTRLMS PARKLMYFLVNFWK
TNDLPFKTYSWSTSYVYKNGTETEDCFWYLNAL EASVSYFSHELGFKV VLRQDKEFQDI

LMDHNRKSNVIIMCGGPEFLYKLGDRVAEDIVIILVDFLNDQYFEDNVTAPDYMKNV
LVLTLSPGNSLLNSSFSRNLSPTRDFALAYLNGILLFGHMLKIFLENGENITTPKFAHAF
RNLTfEGYDGPVTLDDWGDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVLLTYDTHVNKTYPVDMSP
FTWKN SKLPNDITGRGPQILMIAVFTLTGAVVLLLLVALLMLRKYRKDYELRQKKWSHI
PPENIFPLETNETNHVSLKIDDDKRRDTIQRLRQCKYDKKRVILKDLKHNDGNFTEKQKI
ELNKLQIDYYNLTkFYGTVKLDTMIFGVIEYCERGSREVLNDTISYPDGTFMDWEFKI
SVLYDIAKGMSYLHSSKTEVHGRLKSTNCVVDSRMVVKITDFGCNSILPPKKDLWTAPE
HLRQANISQKGDVYSYGIIAQEIIIRKETFYTLSCRDRNEKIFRVENSNGMKPFRPDLFLE
TAEKELEVYLLVKNCWEEDPEKRPDFKKIETTLAKIFGLFHDQKNESYMDTLIRRLQLY
SRNLEHLVEERTQLYKAERDRADRLNFMLLPRLVVKSLKEKGFVEPELYEEVTIYFSDIV
GFTTICKYSTPMEVVDMLNDIYKSFHDHVDHHDVYK VETIGDAYMVASGLPKRNGNRH
AIDIAKMALEILSFMGTFELEHLPGLPIWIRIGVHSGPCAAGVVGIKMPRYCLFGDTVNTA
SRMESTGLPLRIHVSGSTIAILKRTECQFLYEVRGETYKGRGNETTYWLTGMKDQKFN
LPTPPTVENQQRLQAEFSDMIANSLQKRQAAGIRSQKPRRVASYKKGTTLEYLQLNTTDDK
ESTYF (SEQ ID NO: 5)

[0121] 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)).

[0122] В качестве белка клеточной поверхности GCC 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)).

[0123] 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.

[0124] 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).

[0125] 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

[0126] 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.

[0127] 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 переменную 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 эpsilon, а изотип антитела определить как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. В легкой и тяжелой цепях переменная 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)). Переменные области каждой пары легкая/тяжелая цепь образуют связывающий сайт антитела. Предпочтительными изотипами для молекул антител к GCC 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 GCC имеет изотип IgG1.

[0128] Переменные 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.

[0129] Все цепи имеют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гиперпеременными 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 C-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.

[0130] 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.

[0131] Таким образом, в одном варианте осуществления молекула антитела включает одно или оба из:

(a) 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

(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.

[0132] 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 АЗКЦ 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.

[0133] 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.

[0134] 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 Asn (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).

[0135] 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)).

[0136] 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).)

[0137] 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 вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи экспрессируются с получением гуманизированного Fv или гуманизированного антитела, которое связывается с GCC. Предпочтительно антитело с трансплантированным CDR (например, гуманизированное) связывает белок GCC с аффинностью, сходной, по существу такой же или лучшей, чем у донорного антитела. Как правило, гуманизированные вариабельные последовательности тяжелой и легкой цепи экспрессируют в виде слитого белка с последовательностями константного домена человека, так что получают интактное антитело, которое связывается с GCC. Однако можно получить гуманизированное антитело Fv, не содержащее константных последовательностей.

[0138] Также в объем изобретения входят антитела или их фрагменты, как описано в данном документе, например, гуманизированные антитела, в которых определенные аминокислоты заменены, удалены или добавлены в CDR или каркасные области. В частности, гуманизированные антитела могут иметь аминокислотные замены в каркасной области, например, для улучшения связывания с антигеном. Например, выбранное небольшое количество акцепторных каркасных остатков гуманизированной 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)).

[0139] 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.

[0140] В некоторых аспектах часть структуры CAR по настоящему изобретению, которая содержит фрагмент антитела, является гуманизированной или оптимизированной 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.

[0141] 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.

[0142] Гуманизированное или оптимизированное 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.

[0143] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GCC содержит одну или более последовательностей CDR в соответствии с таблицей 1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GCC содержит переменную область тяжелой цепи с CDR 1, представленную 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 антигенсвязывающее средство к GCC содержит переменную область тяжелой цепи с CDR 3, которая указана в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GCC содержит переменную область тяжелой цепи с CDR1, CDR2 и CDR3, которые указаны в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GCC состоит из переменной области 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 в соответствии с Kabat

	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3
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)

[0144] Антитела к GCC, которые не являются интактными антителами, также применимы в данном изобретении. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GCC представляет собой однодоменное антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи с CDR1, CDR2 и CDR3, которые указаны в таблице 1. Такие антитела могут быть получены из любого из 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')₂, 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')₂ и Fab, могут быть получены путем расщепления интактного белка, например, путем протеазного или химического расщепления.

Однодоменные антитела

[0145] Однодоменные антитела (sdAb) отличаются от обычных 4-цепочечных антител наличием одиночного переменного 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 переменный 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 переменного 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.

[0146] 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. Примеры sdAb к GCC перечислены в таблицах 2 и 3. В некоторых вариантах осуществления sdAb к GCC содержит переменный домен тяжелой цепи, указанный в таблице 2 или таблице 3. В некоторых вариантах осуществления sdAb к GCC состоит из переменного домена тяжелой цепи, указанного в таблице 2 или таблице 3.

[0147] В некоторых вариантах осуществления некоторые или все последовательности CDR домена VH или 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.

[0148] 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.

[0149] 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 переменной области тяжелой цепи (VH)

Описание	Аминокислотная последовательность VH
V1	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWI GRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCAR DRSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1)

V1-01	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIG RIYPSGSTSYPNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARD RSTGWSEWNSDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 20)
V5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEW VAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCATDYTRDVWGQGTAVTVSS (SEQ ID NO: 21)
V36	EVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEW VAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMDSLRAEDTAVY YCTRDYDKDYWGQGTAVTVSS (SEQ ID NO: 26)
V48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEW VAKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNANKNSLYLQMDNLRAEDTAMY YCTRDYDKDLWGQGTAVTVSS (SEQ ID NO: 27)
V51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEW VAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCTRDYDKDYWGQGTAVTVSS (SEQ ID NO: 28)

[0150] 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 2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие агенты против GCC по настоящему изобретению содержат аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, как показано в таблице 2, где указанная последовательность содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен. В одном варианте осуществления замены находятся за пределами областей CDR. 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 MKHLWFFLLLVAAPRWVLS (SEQ ID NO: 6), MELGLSWVFLVAILEGVQC (SEQ ID NO: 7) или MEFGLSWVFLVAIIKGVQC (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к GCC на основе VH содержит лидерную последовательность, включающую MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 4)

[0151] 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, как показано в таблице 3, где указанная последовательность содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен. В одном варианте осуществления замены находятся за пределами областей CDR. 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.

[0152] 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	MKHLWFFLLVA APRWVLS (SEQ ID NO: 6)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFR QPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKS RVAMSV DTPKN QFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWG RGTLVTVSS (SEQ ID NO: 1)
V1-01	MKHLWFFLLVA APRWVLS (SEQ ID NO: 6)	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFR QPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKS RVAMSV DTPKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWG RGTLVTVSS (SEQ ID NO: 20)
V5	MELGLSWVFLVAI LEGVQC (SEQ ID NO: 7)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMSWV RQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGT AVTVSS (SEQ ID NO: 21)

V8	MELGLSWVFLVAI LEGVQC (SEQ ID NO: 7)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSW VRQAPGKGLEWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISR NAKNSVYLQMNSLRAEDTGYYCATDFTRDVWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO: 22)
V9	MELGLSWVFLVAI LEGVQC (SEQ ID NO: 7)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWV RQAPGRGLEWVAKIRYDGGEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVWGQGT VTVSS (SEQ ID NO: 23)
V30	MELGLSWVFLVAI LEGVQC (SEQ ID NO: 7)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFGRYWMSW VRQAPGKGREWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO: 24)
V31	MEFGLSWVFLVAI IKGVQC (SEQ ID NO: 2)	QVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSW VRQAPGKGREWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRADDTAVYYCATDFTRDVWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO: 25)
V36	MELGLSWVFLVAI LEGVQC (SEQ ID NO: 7)	EVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWV RQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTRDYNDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 26)
V48	MELGLSWVFLVAI LEGVQC (SEQ ID NO: 7)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWMTW VRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTVSR DNAKNSLYLQMDNLRAEDTAMYYCTRDYNDYLDWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 27)
V51	MELGLSWVFLVAI LEGVQC (SEQ ID NO: 7)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWV RQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDYNDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 28)

[0153] 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, полиаспартат 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

[0154] 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. *Oncoimmunology*. 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.

[0155] Настоящее изобретение относится к CAR (например, полипептиду CAR), который содержит связывающий домен к GCS (например, домен, связывающий GCS, как описано в данном документе), трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, и где указанный связывающий домен к GCS 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 GCS, 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.

[0156] Антигенсвязывающий домен может представлять собой любой белок, который связывается с антигеном, включая, помимо прочего, моноклональное антитело, поликлональное антитело, рекомбинантное антитело, человеческое антитело, гуманизованное 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) наноклетки 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

[0157] 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).

[0158] 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 8) присоединен к трансмембранному домену через линкер, например, линкер, описанный в данном документе. В некоторых вариантах осуществления CAR к GCC включает линкер (Gly4-Ser)_n, где n равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6 (SEQ ID NO: 36).

[0159] 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- ζ , 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 (Hase 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- ζ (Lee D W et al. American Society of Hematology Annual Meeting. New Orleans, La.; Dec. 7-10, 2013) и CD137/CD3- ζ 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.

Трансмембранный домен

[0160] 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).

[0161] 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.

[0162] 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.

[0163] 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.

[0164] 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.

Внутриклеточный домен

[0165] 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.

[0166] Примеры внутриклеточных сигнальных доменов для применения в CAR включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR) и корецепторов, которые действуют вместе, инициируя 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).

[0167] 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 активизирующие 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.

[0168] 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 Т-клеточного рецептора, а костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность корецептора или костимулирующей молекулы.

[0169] 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.

Замены и варианты

[0170] 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 или фрагмента антитела, т.е. sdAb. 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

[0171] 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.

[0172] Аминокислоты можно поделить на группы в соответствии с общими свойствами боковых цепей:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

[0173] Неконсервативные замены приводят к замене члена одного из этих классов на члена другого класса.

[0174] 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).

[0175] 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» варибельного 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.

[0176] Один тип заменяемого варианта включает замену одного или более остатков гиперварибельной 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).

[0177] 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 вариабельные 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.

[0178] 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.

[0179] 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.

[0180] 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.

b) Варианты гликозилирования

[0181] 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.

[0182] 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» биантеннальной олигосахаридной структуры. В некоторых вариантах осуществления модификации олигосахаридов в антителе по настоящей заявке могут быть выполнены для создания вариантов антител с некоторыми улучшенными свойствами.

[0183] 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 ± 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).

[0184] 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.).

[0185] 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

[0186] Антигенсвязывающие фрагменты антитела, специфичные к одному или более антигенам, описанным в данном документе, также могут экспрессироваться (например, коэкспрессироваться) с белком-меткой. В некоторых вариантах осуществления сайт распознавания фурином и расположенная ниже последовательность саморасщепляющегося пептида 2А предназначены для одновременной бицистронной экспрессии последовательности метки и последовательности антитела. В некоторых вариантах

осуществления последовательность 2A включает последовательность нуклеиновой кислоты GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления фуриновая последовательность и последовательность P2A включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления метка P2A включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или последовательность, которая на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентична ей.

[0187] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, специфичные в отношении одного или более антигенов, описанных в данном документе, также могут экспрессироваться с EGFR. В некоторых вариантах осуществления антитело или его 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: 35.

tEGFR:

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCT SISGDLHILPV
AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIRGR TKQHGG
FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN
SCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECI
QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADA
GHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFM (SEQ
ID NO: 35)

[0188] Антитело или его 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).

[0189] Антитело или его антигенсвязывающую часть, также могут быть конъюгированы с ферментами, пригодными для обнаружения, такими как пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза, глюкозооксидаза и т.п. Когда 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. Антитело или его антигенсвязывающая 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.

[0190] 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).

[0191] Антитело или его антигенсвязывающая 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 нейробластомы. Примеры меток для полипептидов включают, помимо прочего, следующие радиоизотопы или радионуклеотиды: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I .

[0192] 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

[0193] Кроме того, вариантом осуществления изобретения является нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающую часть, описанную в данном документе (включая ее 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. В одном аспекте настоящее изобретение охватывает конструкцию рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или его фрагмент, где молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую связывающий домен к GCC. В одном аспекте в настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотную последовательность VH в соответствии с SEQ ID NO: 1, 20, 21, 26, 27 или 28, или последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 90% или 95% идентичности с последовательностью с SEQ ID NO: 1, 20, 21, 26, 27 или 28. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 30-34.

[0194] 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.

[0195] В одном аспекте изобретение относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в данном документе, например, молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые описаны в данном документе. В одном варианте осуществления вектор выбран из группы, состоящей из ДНК, РНК, плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора или ретровирусного вектора.

[0196] 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.

[0197] Векторы экспрессии включают плазмиды, ретровирусы, космиды, YAC, эписомы, происходящие от EBV, и т.п. Удобным является вектор, который кодирует функционально полную последовательность CH или CL 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 C-области человека, а также в областях сплайсинга, которые встречаются в экзонах CH 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.

[0198] 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.

[0199] Таким образом, изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, человеческое, гуманизованное, химерное антитело или антигенсвязывающий фрагмент любого из вышеперечисленных), цепь антитела (например, тяжелую цепь, легкую цепь) или антигенсвязывающую часть цепи антитела, связывающего белок GCS.

[0200] 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.

[0201] 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.

[0202] 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.

[0203] 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).

[0204] Также можно использовать бактериофаговые векторы, такие как λ , λ ZapII (Stratagene), EMBL4 и λ 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.

[0205] 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).

[0206] Методы трансфекции включают соосаждение фосфатом кальция (см., например, Graham et al., выше), прямую микроинъекцию в культивируемые клетки (см., например, Capocchi, *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)).

[0207] 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 μ , λ , SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота и т.п.

[0208] 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.

[0209] 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.

[0210] Рекомбинантный вектор экспрессии может содержать нативный или ненативный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или с нуклеотидной последовательностью, которая комплементарна или гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, кодирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. 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.

[0211] 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.

[0212] 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.

[0213] 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 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента 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.

[0214] В одном аспекте настоящей заявки предложена сконструированная иммунная эффекторная клетка, содержащая любое из антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, или любую из выделенных нуклеиновых кислот, описанных выше, или любой из векторов, описанных выше

[0215] 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-хозяин, 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.

[0216] 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.

[0217] 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 мышинового лейкоза, в том, что они могут трансдуцировать непролиферирующие клетки, такие как гепатоциты. Они также обладают дополнительным преимуществом низкой иммуногенности.

[0218] Экспрессия природных или синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих связывающий агент к GCC, описанный в данном документе, может быть достигнута путем функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид связывающего агента к GCC или его 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.

[0219] 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.

[0220] 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.

[0221] 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).

[0222] 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.

[0223] 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.

[0224] 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.

[0225] Другим примером подходящего промотора является фактор роста элонгации-1а (EF-1а). 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.

[0226] Для того чтобы оценить экспрессию полипептида связывающего агента к ГСС (например, однодоменного антитела), или его частей, вектор экспрессии для введения в клетку может также содержать либо селективируемый маркерный ген, либо репортерный ген, либо оба гена для облегчения идентификации и отбора экспрессирующих клеток из популяции клеток, подлежащих трансфекции или инфицированию с помощью вирусных векторов. В других аспектах селективный маркер может переноситься отдельным участком ДНК и использоваться в процедуре совместной трансфекции.

[0227] 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 нео 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.

[0228] 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.

[0229] 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.

[0230] 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 бислоистой 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.

[0231] 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 °C. 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 бислоистой 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).

[0232] 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-блоттинги) или путем анализов, описываемых в данном документе, для идентификации веществ, входящих в объем настоящего изобретения.

[0233] Настоящее изобретение дополнительно относится к вектору, содержащему связывающий агент к GСС (например, однодоменное антитело), кодирующий молекулу нуклеиновой кислоты. В одном аспекте вектор связывающего агента к GСС (например, однодоменное антитело) 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 связывающего агента к GСС в Т-клетках млекопитающих. В одном аспекте Т-клетка млекопитающего является Т-клеткой человека.

[0234] В некоторых аспектах невирусные способы могут быть использованы для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей связывающий агент к GСС, 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.

[0235] 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.

Способы лечения

[0236] Настоящее изобретение относится к способам лечения, включающим введение субъекту антигенсвязывающей молекулы к GCS, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие молекулы к GCS (например, однодоменное антитело), описанные в данном документе, можно использовать в способах лечения или предупреждения заболевания у млекопитающего. В этом отношении вариант осуществления обеспечивает способ лечения или предупреждения злокачественного новообразования у млекопитающего, включающий введение млекопитающему антигенсвязывающих молекул (например, однодоменного антитела), нуклеиновых кислот, рекомбинантных векторов экспрессии, клеток-хозяев, популяции клеток, антител и/или их антигенсвязывающих частей и/или фармацевтических композиций в количестве, эффективном для лечения или предупреждения злокачественного новообразования у млекопитающего. Изобретение также относится к антигенсвязывающей молекуле к GCS, как описано в данном документе (например, sdAb), для применения в лечении заболевания. Данное изобретение также относится к антигенсвязывающей молекуле к GCS, как описано в данном документе (например, sdAb), для применения в лечении злокачественного новообразования. Данное изобретение также относится к антигенсвязывающей молекуле к GCS, как описано в данном документе (например, sdAb), для применения в производстве лекарственного препарата для лечения злокачественного новообразования.

[0237] 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, внутримышечно, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной (в/в) инъекции или внутривенно. В одном варианте осуществления композиции, описанные в данном документе, например, содержащие клетки, экспрессирующие антигенсвязывающие молекулы (например, однодоменное антитело), вводят пациенту посредством внутривенной или подкожной инъекции. В одном варианте осуществления

композиции, описанные в данном документе, например, содержащие клетки, экспрессирующие антигенсвязывающие молекулы (например, однодоменное антитело), вводят путем в/в инъекции. Композиции, описанные в данном документе, например, содержащие клетки, экспрессирующие антигенсвязывающие молекулы (например, однодоменное антитело), можно вводить непосредственно в опухоль, лимфатический узел или очаг инфекции.

[0238]

[0239] 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.

[0240] 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.

[0241] Что касается способов, рак может представлять собой любое рак, включая любой 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 внутрпеченочных 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 аденокарциному 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.

[0242] 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.

[0243] 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.

[0244] 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.

[0245] В еще одном варианте осуществления предложен способ обнаружения злокачественного новообразования у млекопитающего, включающий: (а) приведение в контакт образца, содержащего одну или более клеток млекопитающего, с антигенсвязывающими молекулами (например, однодоменное антитело) и их антигенсвязывающими частями, или фармацевтические композиции, тем самым образуя

комплекс, (b) и обнаруживая комплекс, при этом обнаружение комплекса свидетельствует о наличии злокачественного новообразования у млекопитающего. В некоторых вариантах приведение в контакт можно осуществлять *in vitro* или *in vivo* в отношении млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт осуществляют *in vitro*.

[0246] 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.

[0247] 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.

[0248] Кроме того, обнаружение комплекса может происходить любым количеством способов, известных в данной области техники. Например, 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.

[0249] Способы тестирования антигенсвязывающих молекул (например, однодоменного антитела) 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- γ , гранулоцитарного/моноцитарного колониестимулирующего фактора (GM-CSF), фактор некроза опухоли A (TNF- α) или интерлейкина 2 (IL-2)).

[0250] В еще одном варианте осуществления предложено применение антигенсвязывающих молекул (например, однодоменного антитела или его антигенсвязывающих частей) и/или фармацевтических композиций по изобретению для лечения или предупреждения пролиферативного нарушения, например, злокачественного новообразования, у млекопитающего. Злокачественное новообразование может быть любым из описанных в данном документе злокачественных новообразований.

[0251] 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 инъекцию, для которой антитела, антигенсвязывающие фрагменты или композиции содержатся 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 роговуцу или интравитреально в глаз.

[0252] 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.

[0253] 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.

[0254] 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.

[0255] В частности, композиции будут либо состоять 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.

[0256] 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.

[0257] Соединение по настоящему изобретению, в частности, может быть использовано в качестве радиосенсибилизатора, особенно для лечения опухолей, которые демонстрируют слабую чувствительность к лучевой терапии.

[0258] В еще одном аспекте в изобретении предложен набор, например, для лечения или предупреждения заболевания или иммунного ответа и/или для обнаружения GСС для диагностики, прогнозирования или мониторинга заболевания, включающего антитело, например, однодоменное антитело, как описано в данном документе. Такой набор может содержать другие компоненты, упаковку, инструкции или материалы, которые помогают в обнаружении белка GСС. Набор может включать меченое однодоменное антитело или связывающий агент, как описано в данном документе, и одно или более соединений для обнаружения метки.

[0259] 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.

[0260] 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.

[0261] 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

[0262] 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 к GCC на основе V_H

[0263] Были созданы однодоменные антитела, содержащие только тяжелые цепи, (V_H), которые специфически нацелены на GCC человека (например, связывающие вещества к GCC, указанные в таблицах 1-3). Как показано в таблице 5, рекомбинантные однодоменные конструкции к GCC на основе V_H 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 V_H 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 4.

[0264] Связывание однодоменных антител с клетками СТ26 измеряли с помощью проточной цитометрии. Клетки СТ26 инкубировали с серийно разведенной V_H и измеряли флуоресценцию с помощью проточной цитометрии. Было подтверждено, что антитела к GCC на основе V_H связываются с клетками СТ26 с помощью анализа доза-ответ на основе FACS с получением EC₅₀ связывания клеток (нМ), как показано в таблице 4.

Таблица 4. Аффинность связывания антител V_H к GCC

Агент, связывающий антиген GCC	K _{off} (1/с)	KD(M)	EC ₅₀ связывания клеток (M)
V1	0,00020795	3,2935E-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

[0265] Для определения стабильности конструкции V_H подвергали эксклюзионной хроматографии (ЭХ). Вкратце, очищенные V_H 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 5 ниже.

Таблица 5. 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

[0266] ИФА проводили для измерения связывания VH с человеческими легкими цепями. Значения связывания для каждого из VH (измеряемые при ОП 450 нм) были менее 0,1, что является фоновым сигналом для этого анализа.

Пример 2. Дизайн и характеристика химерных антигенных рецепторов к GCC

[0267] 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. 1A и 1B.

[0268] Нуклеиновые кислоты, кодирующие последовательности конструкции CAR, 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.

[0269] 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+ 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-Т-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.

[0270] Экспрессию CAR-Т-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*

[0271] В настоящем примере описана активность Т-клеток с CAR к GCC *in vitro*. Исследовали цитотоксичность CAR-Т-клеток 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-клетки с CAR к GCC.

[0272] Связывающие вещества V_H 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. 2А-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-T-клетки, экспрессирующие CAR к GCC в присутствии укороченного EGFR (tEGFR), также продемонстрировали *in vitro* цитотоксичность 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.

[0273] 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 γ и IL2. Т-клетки с CAR к GCC со связывающими веществами V_H к GCC совместно культивировали с экспрессирующими GCC и отрицательными по GCC линиями раковых клеток-мишеней при соотношениях Е:Т 10:1, 3:1, 1:1 и 0,3:1. Супернатант собирали через два дня совместного культивирования. Секретируемые IFN γ и IL2 в супернатанте определяли с помощью набора Intellicyt QBeads Human PlexScreen (Sartorius, 90702). Т-клетки с CAR к GCC со всеми связывающими веществами V_H секретируют IFN γ 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 V_H 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.

[0274] 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

[0275] В таблице 6 ниже приведены описания и последовательности, описанные в данном документе.

Таблица 6. Таблица последовательностей

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	V1 VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQP AGKGGLEWIGRIYPSGSTSYPNPSLKSRVAMSVDTPKNQFSL NLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVT VSS
2	лидер v31	MEFGLSWVFLVAIKGVQC
3	P2A	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
4	Лидерная последовательность	MALPVTALLLPLALLLHAARP
5	GCC AA последовательность	MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSQNCHNGSYEISVL MMGNSAFAEPLKNLEDAVNEGLEIVRGLQNAGLNVTVN ATFMYS DGLIHNSGDCRSSTCEGLDLLRKISNAQRMGCVL IGPSC TYSTFQMYLDTELSYPMISAGSFGLSCDYKETLTRL MSPARKLMYFLVNFWK TNDLPFKTYSWSTS YVYKNGTET EDCFWYLNAL EASVSYFSHELGFKVVL RQDKEFQDILMD HNRKSNVIIMCGGPEFLYKLGDR AEAEDIVIILVDFNDQ YFEDNVTAPDYMKNVLVLT LSPGN SLLNSSFSRNLSPTKR DFALAYLNGILLFGHMLKIFLENGENITPKFAHAFRNLT EGYDGPVTLDDWGDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVLLTYD THVNKTYPVDMSPFTFWKNSKLPNDITGRGPQILMIAVFT LTGAVVLLLLVALLMLRKYRKDYELRQKKW SHIPPENIFP LETNETNHVSLKIDDDKRRDTIQRLRQCKYDKKR VILKDL KHNDGNFTEKQKIELNKLQIDYYNLTKFYGTVKLDTMIF GVIEY CERGLREVLNDTISYPDGT FMDWEFKISVLYDIAK GMSYLHSSKTEVHGRLKSTNCVVDSRMVVKITDFGCNSIL PPKKDLWTAPEHLRQANISQKGDVYSYGIIAQEIILRKETF

		YTLSCDRNEKIFRVENSNGMKPFRPDLFLETAEKELEV YLLVKNCWEEDPEKRPDFKKIETTLAKIFGLFHDQKNESY MDTLIRRLQLYSRNLEHLVEERTQLYKAERDRADRLNFM LLPRLVVKSLKEKGFVEPELYEEVTIYFSDIVGFTTICKYST PMEVVDMLNDIYKSFHDHVDHHDVYK VETIGDAYMVASG LPKRNGNRHAIDIAKMALEILSFMGTFELEHLPGLPIWIRIG VHSGPCAAGVVGIKMPRYCLFGDTVNTASRMESTGLPLRI HVSGSTIAILKRTECQFLYEVRGETYLYKGRGNETTYWLTG MKDQKFNLPTPPTVENQQRLQAEFSDMIANS LQKRQAAGI RSQKPRRVASYKKGTLEYLQLNTTDKESTYF
6	Лидерная последователь ность (v1)	MKHLWFFLLVAAPRWVLS
7	Лидерная последователь ность (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	RIYPSGSTSYPNPSLKS
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	V1-01	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWFRQP AGKGLEWIGRIYPSGSTSYPNPSLKS RVAMSVDTPKNQFSL

		KLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRGTLVT VSS
21	V5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSRYWMSWVRQ APGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGTAVTVSS
22	V8	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQ APGKGLEWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNS VYLQMNSLRAEDTGYYCATDFTRDVWGQGTTVTVSS
23	V9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQ APGRGLEWVAKIRYDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVWGQGTTVTVSS
24	V30	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFGRYWMSWVR QAPGKGREWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNS SLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDFTRDVWGQGTTVTVSS
25	V31	QVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVR QAPGKGREWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDNKNS SLYLQMNSLRADDTAVYYCATDFTRDVWGQGTTVTVSS
26	V36	EVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQ APGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMDSLRAEDTAVYYCTR DYNKDYWGQGT LVT VSS
27	V48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAASGFTFSRYWMTWVRQ APGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGRFTVSRDNKNS LYLQMDNLRAEDTAMYYCTR DYNKDLWGQGT LVT VSS
28	V51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQ APGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCTR DYNKDYWGQGT LVT VSS
29	heat-stable enterotoxin	NTFYCCELCCNPACAGCY
30	V1-01 Последовательность нуклеиновой кислоты	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCA GCCGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTG GATTCACCTTTAATAGTTATTGGATGAGTTGGGACCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCAACAT AAACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGGGGACTCTG TGAGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG

		AACACAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGA GGACACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAAGGAGCCACG GCGTCCGGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCA
31	V5 Последовательность нуклеиновой кислоты	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACA GCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTACAGCCTCTG GATTCACCTTTAGTCGGTATTGGATGAGCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAGAT AAGGCACGATGGAGGTGAGAAATACTATGTGGACTCTG TGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG AATTCAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGA GGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGACAGACTATAACGA GGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCAGCGGTACCGTCTCC TCA
32	V36 Последовательность нуклеиновой кислоты	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGCCCA GCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCGG GATTCACCTTTAGTCGCTATTGGATGACCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGGGGAGACTGGAGTGGGTGGCCAAGAT AAAGTACGATGGAAGTGAGAAATACTATGCGGACTCTG TGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG AACTCACTGTATCTGCAAATGGACAGCCTGAGAGCCGA GGACACGGCTGTATATTACTGTACGAGAGACTATAATA AAGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTACCGTCTCC TCA
33	V48 Последовательность нуклеиновой кислоты	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCA GCCTGGGGGGTCCCTTAGACTCACCTGTGCAGCCTCTG GATTCACCTTTTAGTAGGTATTGGATGACTTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAAAT AAGACACGATGGAGGTGAGAAATACTATCCGGACTCTG TGAAGGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGACAACGCCAAG AATTCAGTGTATCTACAAATGGACAACCTGAGAGCCGA GGACACGGCTATGTATTACTGTACGAGAGACTACAATA AGGACCTTTGGGGCCAGGGAACACTGGTACCGTCTCC TCA

34	V51 Последовательность нуклеиновой кислоты	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCA GCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTG GATTCACCTTTAGTAGGTATTGGATGACCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCAAGAT AAGACACGATGGAGGTGAGAAATATTATGCGGACTCTG TGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG AATCACTATATCTACAAATGAACAGTCTGAGAGCCGA AGACACGGCTGTGTATTATTGTACGAGAGACTACAATA AAGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCA
----	---	--

Эквиваленты

[0276] 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.

[0277] 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. Агент, связывающий гуанилатциклазу С (GCC – англ.: guanylyl cyclase C), содержащий:

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).

2. Связывающий GCC агент по п. 1, содержащий

вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 20;

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

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

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

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

3. Агент, связывающий гуанилатциклазу C (GCC), содержащий:

вариабельную область тяжелой цепи (V_H) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 20;

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

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

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

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

4. Связывающий GCC агент по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что область V_H включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с любой из SEQ ID NO:1, 20, 21, 26, 27, или 28.

5. Связывающий GCC агент по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что область V_H включает аминокислотную последовательность, которая идентична любой из SEQ ID NO: 1, 20, 21, 26, 27 или 28.

6. Связывающий GCC агент по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что 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')₂, фрагмента Fd', фрагмента Fd, выделенных CDR или их наборов; одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), слитой молекулы полипептид-Fc, однодоменного антитела (sdAb), верблюжьего антитела; маскированного антитела, малых модульных иммунофармацевтических препаратов («SMIP™»), одиночной цепи, 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.

7. Связывающий GCC агент по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что связывающий GCC агент представляет собой однодоменное антитело (sdAb).

8. Связывающий GCC агент по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что связывающий GCC агент представляет собой антитело, состоящее только из тяжелых цепей.

9. Связывающий GCC агент по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что связывающий агент связывает GCC с K_D от около 0,3 наномоль/л (нМ) до около 10 нМ.

10. Связывающий GCC агент по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что связывающий агент связывает GCC на клетках-мишенях с EC₅₀ от около 0,5 нМ до около 8 нМ.

11. Способ лечения злокачественного новообразования, включающий введение связывающего GCC агента по любому из предшествующих пунктов субъекту, нуждающемуся в лечении.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что рак выбран из рака желудка-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.

13. Способ по п. 11, отличающийся тем, что рак представляет собой рак желудка-кишечного тракта.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что рак желудочно-кишечного тракта представляет собой рак толстой кишки, колоректальный рак, рак желудка или рак пищевода.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая связывающий GCC агент и фармацевтически приемлемый носитель, причем связывающий GCC агент 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).

16. Способ лечения злокачественного новообразования, включающий введение связывающего GCC агента субъекту, нуждающемуся в лечении, причем связывающий GCC агент 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).

17. Нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотную последовательность V_H , идентичную любой из SEQ ID NO: 1, 20, 21, 26, 27 или 28.

18. Вектор, содержащий выделенную последовательность нуклеиновой кислоты по п. 17.

19. Выделенная клетка, содержащая вектор по п. 18.

20. Химерный антигенный рецептор (CAR) к гуанилатциклазе С (GCC), отличающийся тем, что CAR к GCC содержит связывающий агент к GCC по любому из пп. 1–10.

21. Способ индукции иммунного ответа, включающий приведение клеток в контакт с химерным антигенным рецептором (CAR) к гуанилатциклазе С (GCC), при этом CAR к GCC содержит связывающий агент к GCC по любому из пп. 1–10.

22. Способ индукции цитотоксичности, включающий

приведение клеток в контакт с химерным антигенным рецептором (CAR) к гуанилатциклазе С (GCC), при этом CAR к GCC содержит связывающий агент к GCC по любому из пп. 1–10.

23. Способ обнаружения злокачественного новообразования у млекопитающего, включающий:

(а) приведение в контакт образца, содержащего одну или более клеток млекопитающего, со связывающим агентом к GCC по любому из пп. 1–10, в результате чего образуется комплекс, и

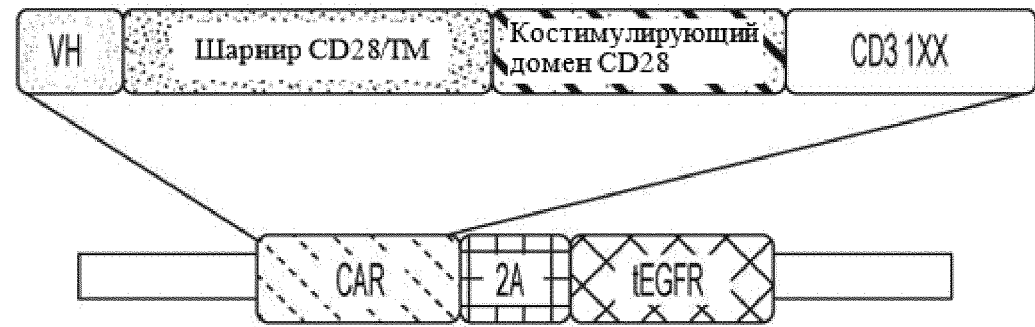
(b) обнаружение комплекса, при этом обнаружение комплекса свидетельствует о наличии злокачественного новообразования у млекопитающего.

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют *in vitro* или *in vivo* в отношении млекопитающего.

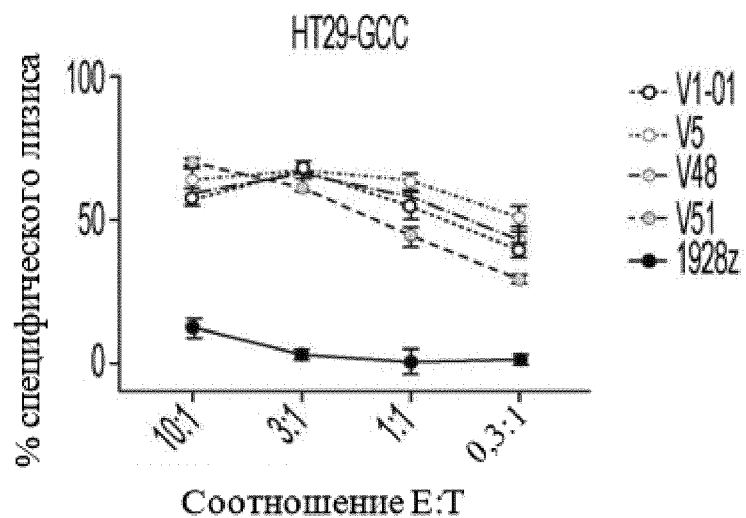
25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют *in vitro*.



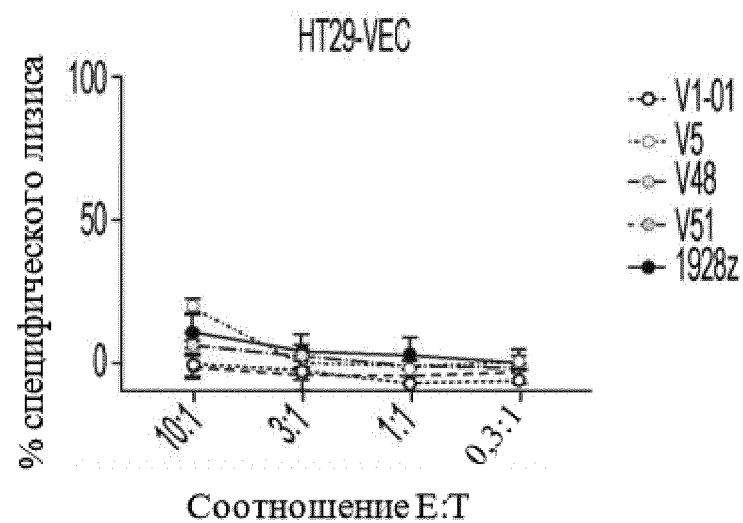
Фиг. 1А



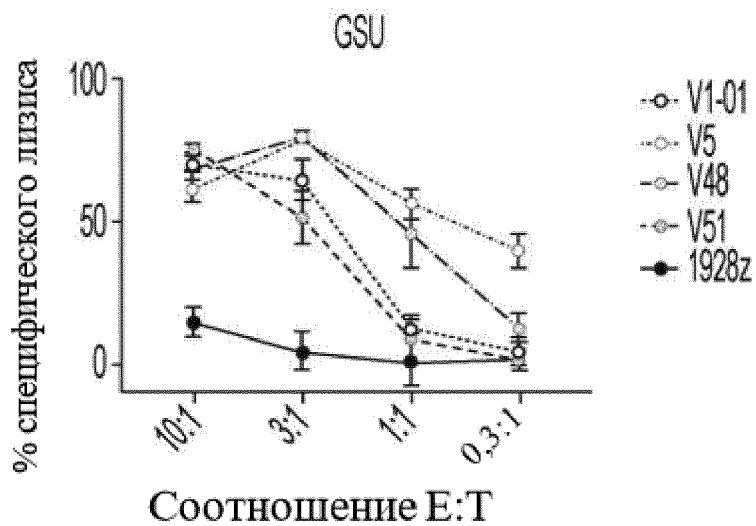
Фиг. 1В



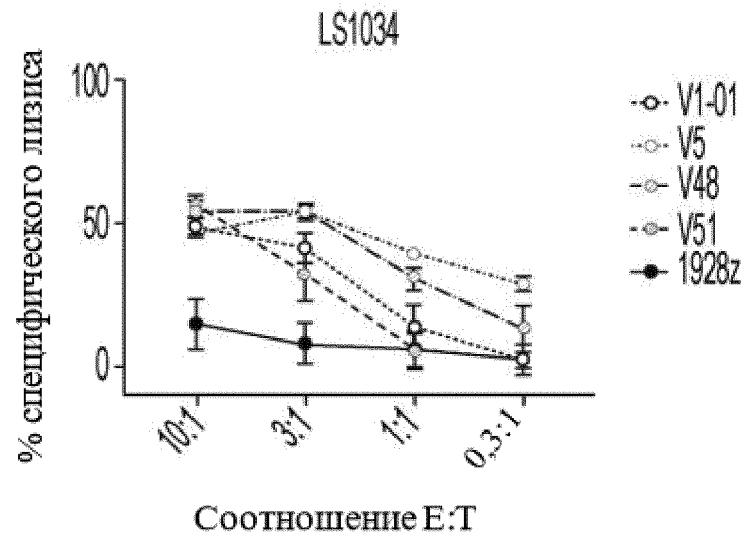
Фиг. 2А



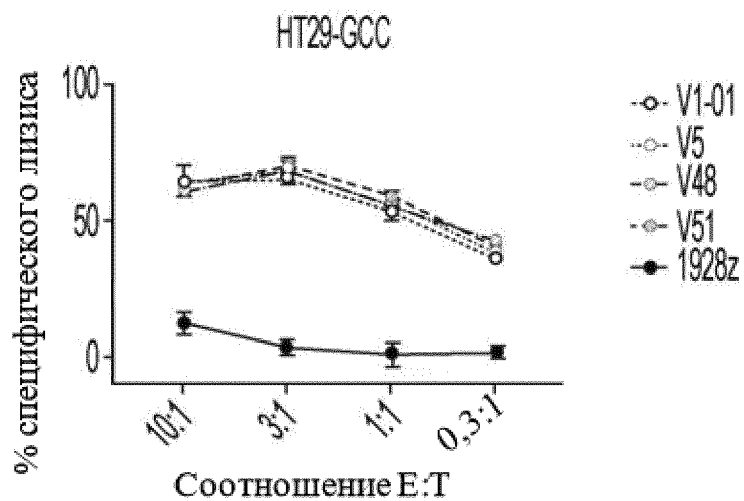
Фиг. 2В



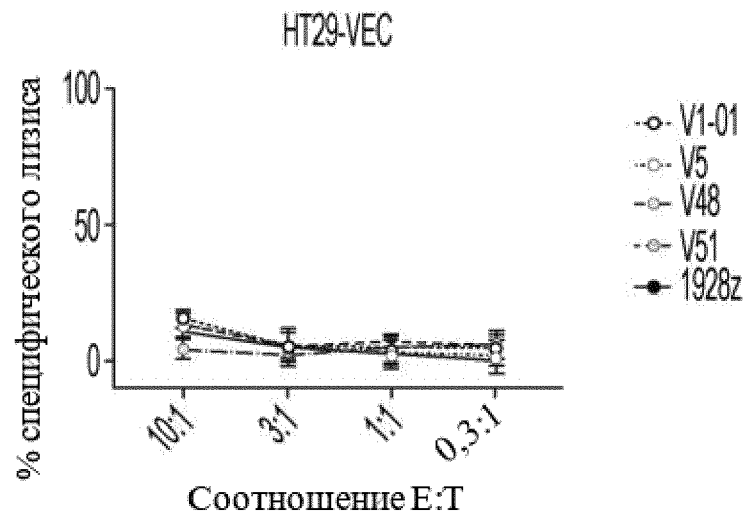
Фиг. 2С



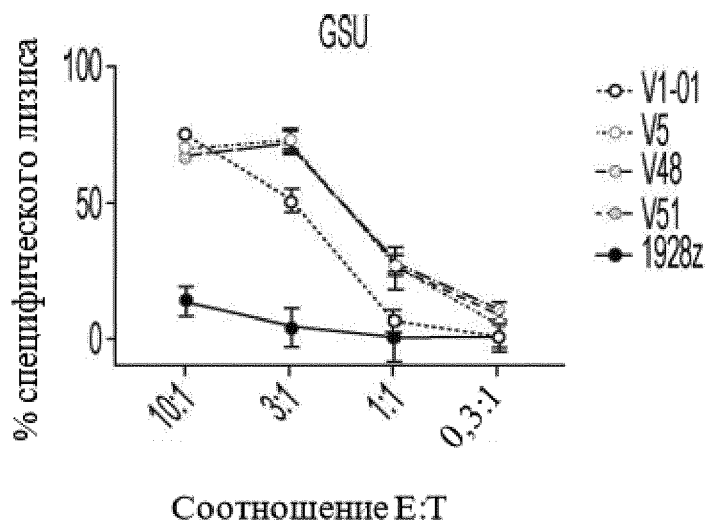
Фиг. 2D



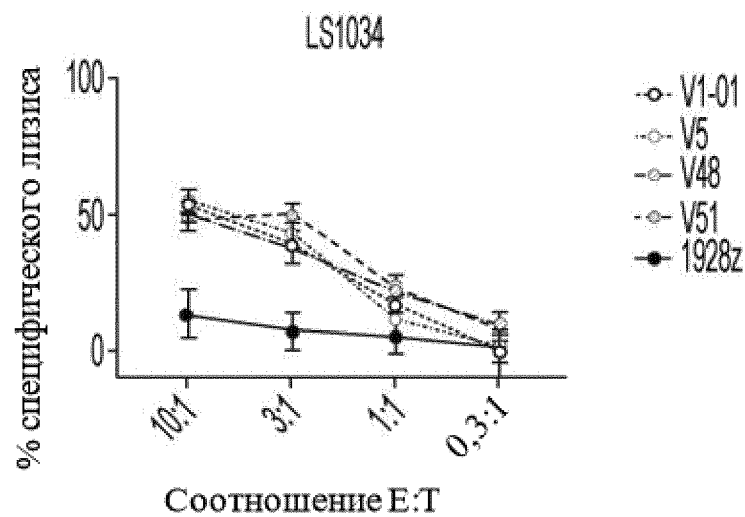
ФИГ. 3А



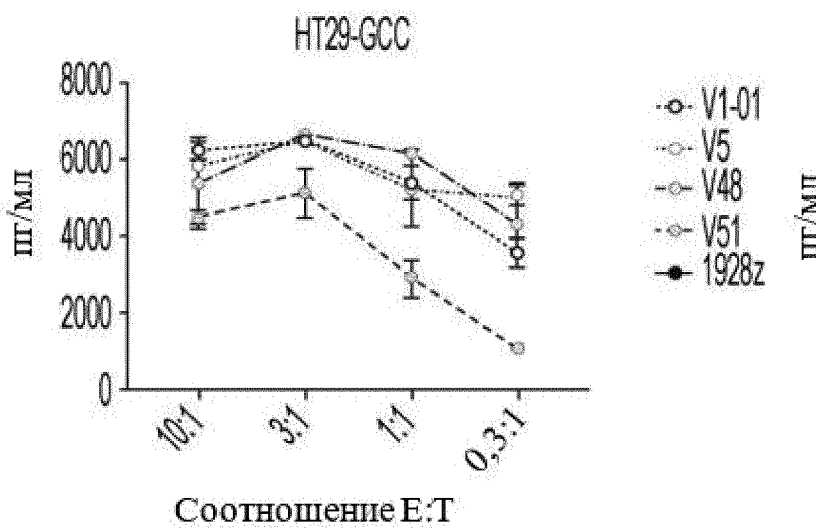
ФИГ. 3В



ФИГ. 3С

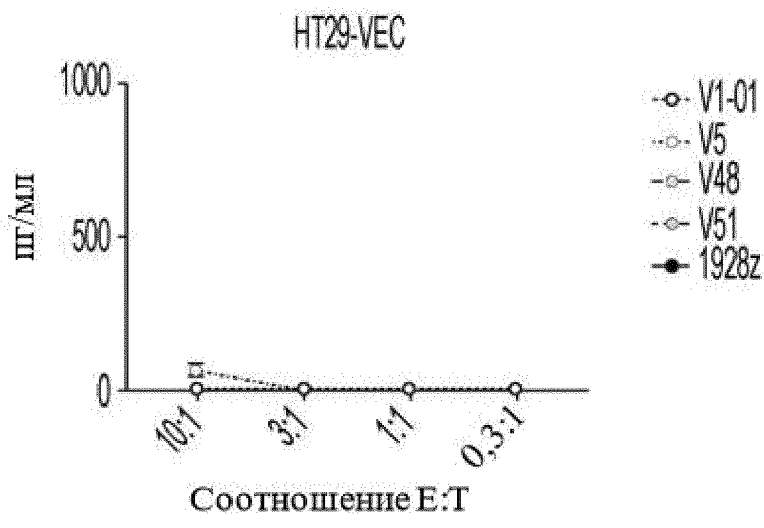


ФИГ. 3D



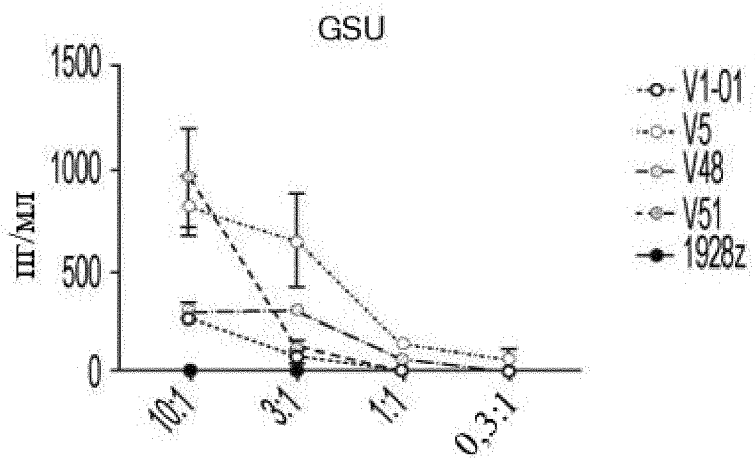
Соотношение E:T

ФИГ. 4А



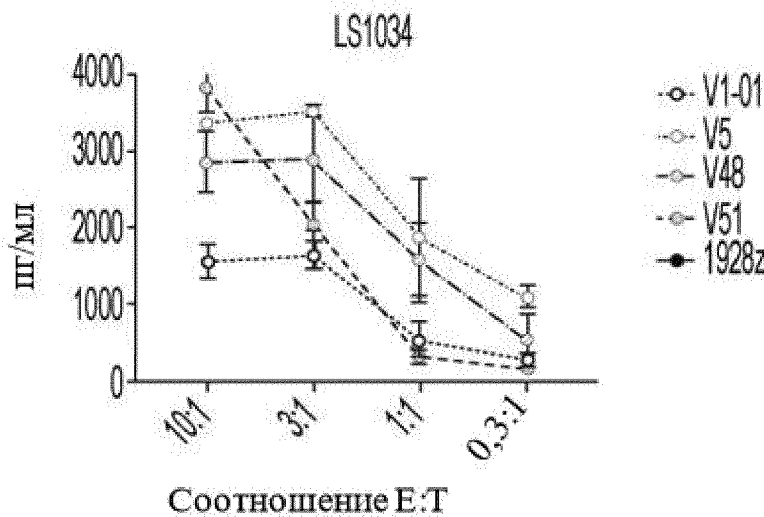
Соотношение E:T

ФИГ. 4В



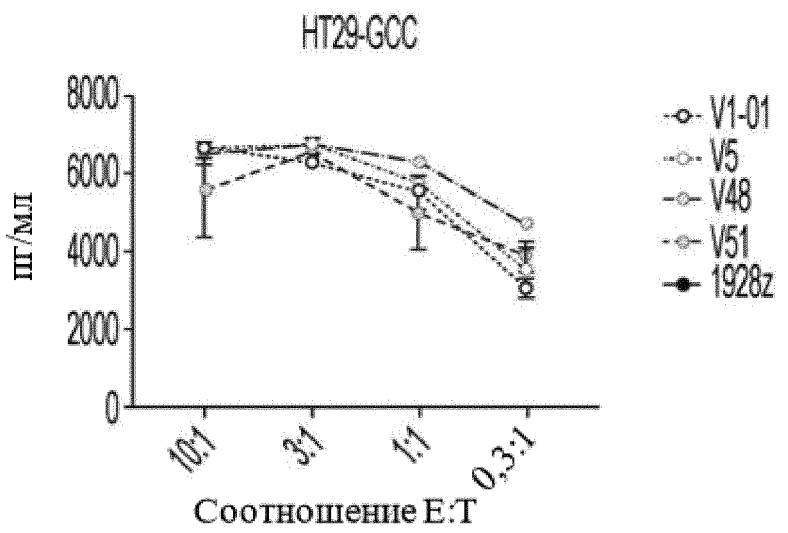
Соотношение E:T

ФИГ. 4С

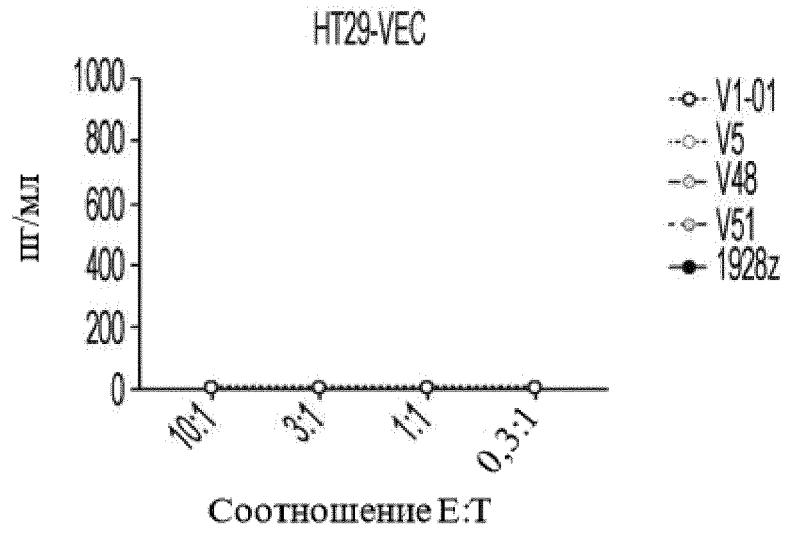


Соотношение E:T

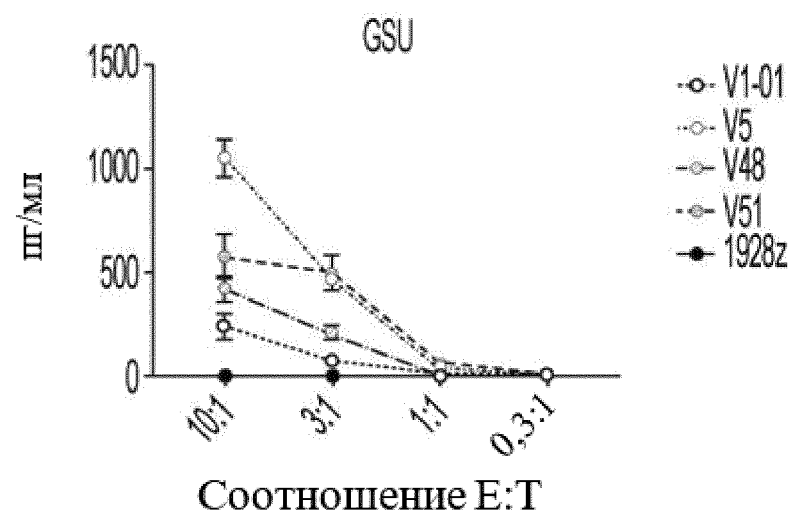
ФИГ. 4D



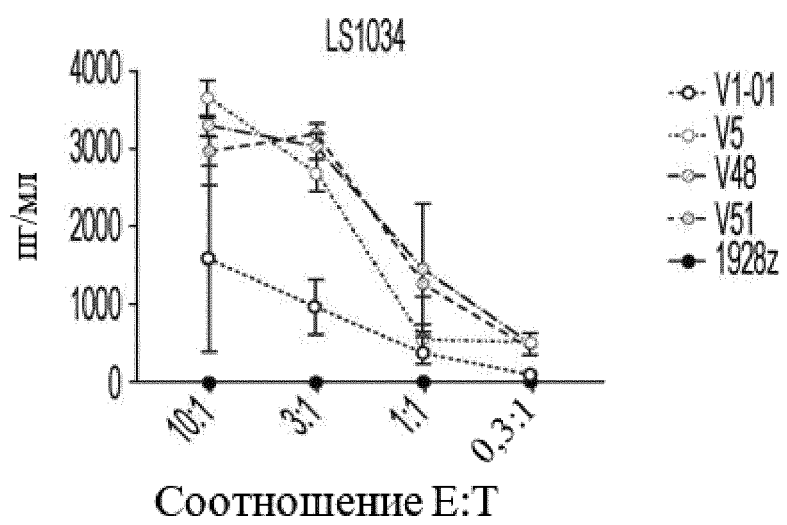
Фиг. 5А



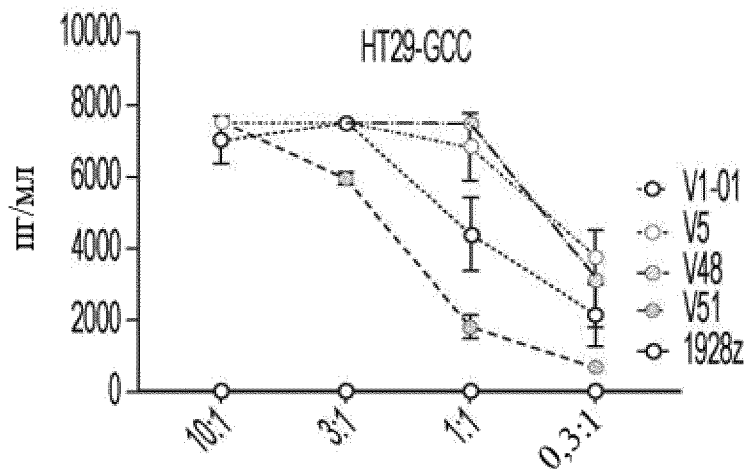
Фиг. 5В



Фиг. 5С

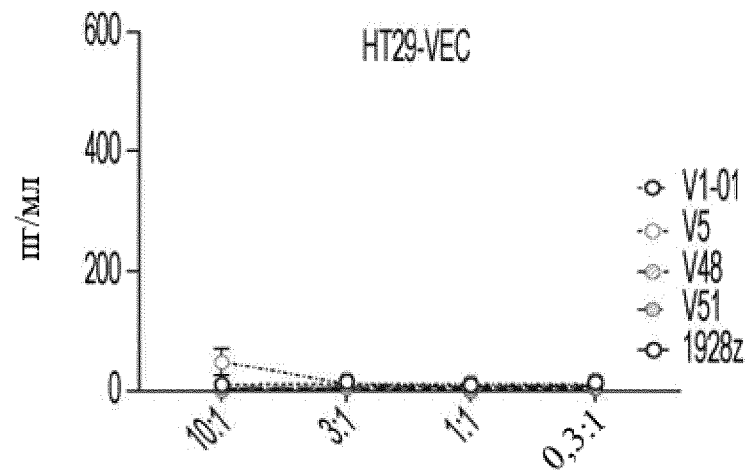


Фиг. 5D



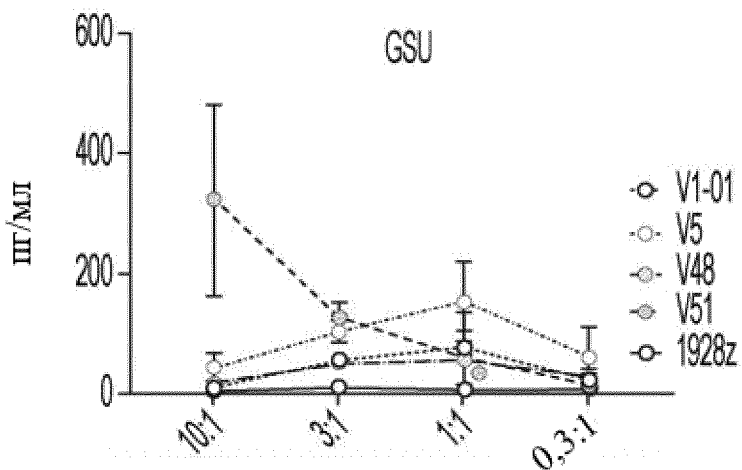
Соотношение Е:Т

Фиг. 6А



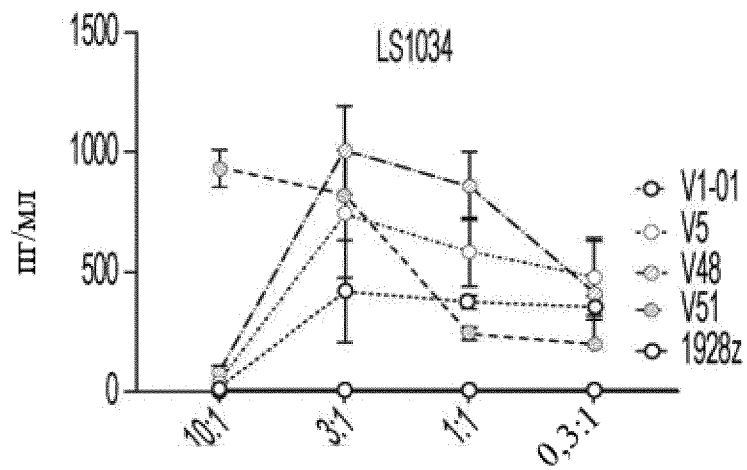
Соотношение Е:Т

Фиг. 6В



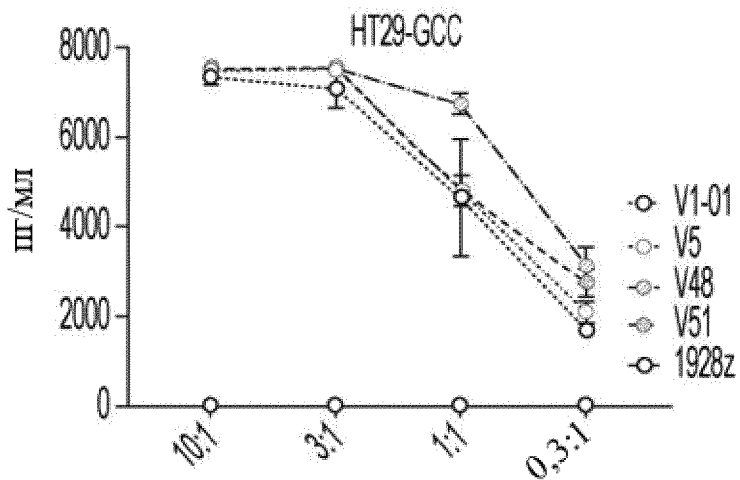
Соотношение Е:Т

Фиг. 6С



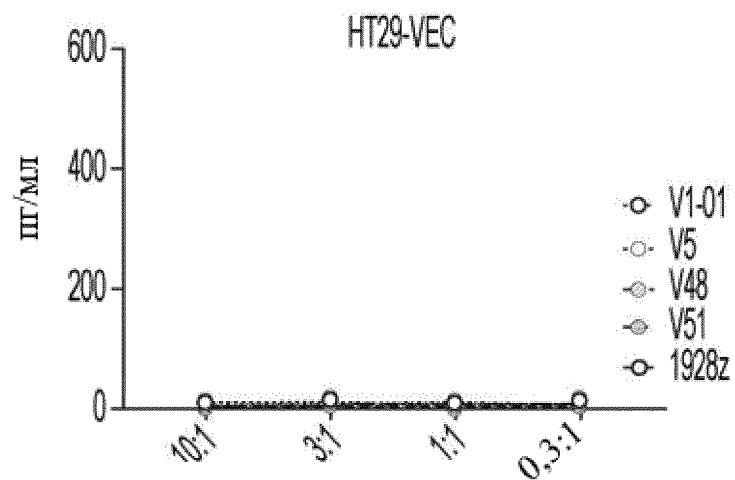
Соотношение Е:Т

Фиг. 6Д



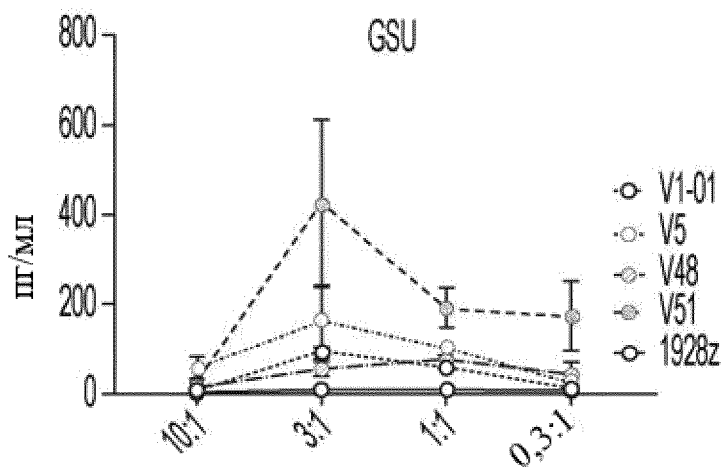
Соотношение E:T

ФИГ. 7А



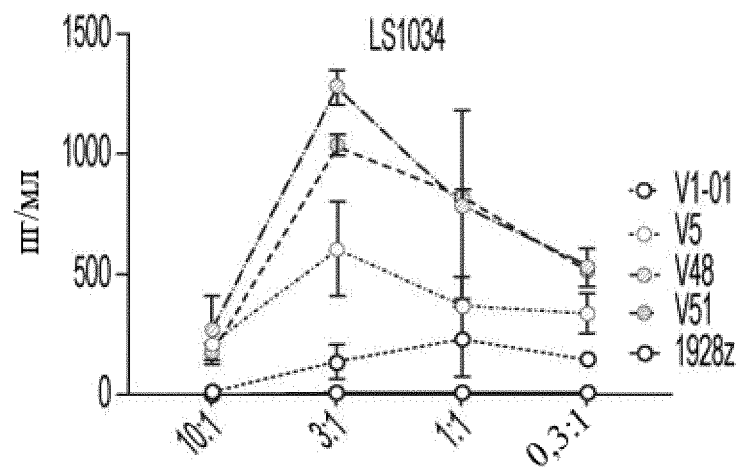
Соотношение E:T

ФИГ. 7В



Соотношение E:T

ФИГ. 7С



Соотношение E:T

ФИГ. 7D