



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.12.04

(22) Дата подачи заявки  
2022.02.15

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61P 35/04* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*C07K 14/725* (2006.01)  
*C07K 14/495* (2006.01)  
*C07K 14/71* (2006.01)  
*C07K 16/22* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ КЛЕТочНОЙ ТЕРАПИИ И СПОСОБЫ МОДУЛИРОВАНИЯ СИГНАЛИНГА TGF-β

(31) 63/149,628; 63/306,836

(32) 2021.02.15; 2022.02.04

(33) US

(86) PCT/IB2022/000063

(87) WO 2022/172085 2022.08.18

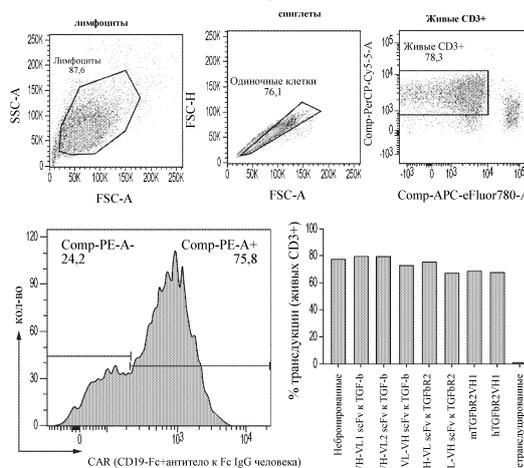
(88) 2022.10.13

(71) Заявитель:  
ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ  
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)

(72) Изобретатель:  
Кун Шантал, Шапиро Гэри (US)

(74) Представитель:  
Нилова М.И. (RU)

(57) Предложены способы применения полипептидов для модулирования сигналинга трансформирующего фактора роста-β (TGFβ) (например, рецепторов TGFβ, антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые специфически связываются с TGFβ или рецептором TGFβ). Предложены композиции, содержащие антитела или их фрагменты, и способы их применения для лечения заболеваний, связанных с активностью TGFβ. Также описаны нуклеиновые кислоты, рекомбинантные векторы экспрессии, клетки-хозяева, антигенсвязывающие фрагменты и фармацевтические композиции, содержащие эти антигенсвязывающие агенты и их фрагменты. В изобретении также предложены терапевтические способы применения модуляторов сигналинга TGFβ, представленных в данном документе.



## **КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ И СПОСОБЫ МОДУЛИРОВАНИЯ СИГНАЛИНГА TGF- $\beta$**

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

**[0001]** Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 63/149628, поданной 15 февраля 2021 г., и предварительной заявке США № 63/306836, поданной 04 февраля 2022 г., описание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

**[0002]** Иммунотерапия с использованием сконструированных клеток, которые нацелены на специфические для злокачественного новообразования антигены, показала эффективность при лечении некоторых злокачественных новообразований. Однако злокачественные клетки способны создавать иммуносупрессивное микроокружение, чтобы защитить себя от иммунного распознавания и уничтожения. Высокие уровни TGF $\beta$  в опухолевом микроокружении могут способствовать сохранению и прогрессированию некоторых типов раковых клеток. Опухолевое микроокружение создает значительные трудности для применения способов лечения, включающих стимуляцию иммунного ответа, например, в случае таргетной клеточной терапии. Соответственно, желательны новые терапевтические стратегии для лечения злокачественного новообразования.

### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0003]** В настоящем изобретении предложена, среди прочего, новая система для модулирования сигналинга TGF $\beta$  для применения в лечении злокачественных новообразований (например, солидных опухолей). Настоящее изобретение частично основано на открытии того факта, что модулирование сигналинга трансформирующего фактора роста-бета (TGF- $\beta$ ) может улучшить способы адоптивной клеточной терапии, такие как терапия с использованием нацеленных сконструированных химерных антигенных рецепторов (CAR). Модулирование сигналинга TGF- $\beta$ , например, посредством воздействия системой антител (например, анти-TGF $\beta$  или анти-TGF $\beta$ R), антигенсвязывающих фрагментов или рекомбинантного внеклеточного домена TGF- $\beta$ R2, описанных в данном документе, уменьшает иммуносупрессивное микроокружение в опухолях и повышает эффективность иммунотерапии.

**[0004]** Иммунотерапия на основе Т-клеток стала новым рубежом в синтетической биологии; предполагается, что многочисленные промоторы и генные продукты направляют эти высокоэффективные клетки в микроокружение опухоли, причем Т-клетки могут как

уклоняться от негативных регуляторных сигналов, так и опосредовать эффективное уничтожение опухоли. Уничтожение нежелательных Т-клеток посредством индуцированной лекарственным средством димеризации индуцибельных конструкций каспазы 9 с AP1903 демонстрирует один из способов фармакологического иницирования мощного переключателя, способного контролировать популяции Т-клеток (Di Stasi A et al. N Engl J Med. 2011; 365(18):1673-83). Таким образом, хотя кажется, что CAR могут иницировать активацию Т-клеток аналогично эндогенному рецептору Т-клеток, основным препятствием для клинического применения этой технологии на сегодняшний день является ограниченная экспансия CAR+ Т-клеток *in vivo*, быстрое исчезновение клеток после инфузии и неутешительная клиническая активность. Соответственно, в данной области техники существует острая потребность в открытии новых композиций и способов лечения злокачественного новообразования с использованием подхода, который может проявлять специфический и эффективный противоопухолевый эффект без нежелательных эффектов (например, высокой токсичности, недостаточной эффективности).

**[0005]** Настоящее изобретение удовлетворяет эти потребности, предлагая иммуномодулирующую систему, включающую CAR и модулятор сигнального пути TGF $\beta$ , экспрессируемые в иммунной клетке (например, Т-клетке). Композиции и терапевтические способы, включающие иммуномодулирующую систему, можно использовать для лечения злокачественного новообразования и других заболеваний и/или патологических состояний. В частности, в настоящем изобретении предложены сконструированные иммунные клетки, экспрессирующие «бронированные» CAR, которые можно использовать для лечения заболеваний, нарушений или патологических состояний, связанных с дисрегулированной экспрессией TGF $\beta$  (например, злокачественные новообразования, солидные опухоли). «Бронированные» CAR-Т-клетки, которые коэкспрессируют модулятор TGF $\beta$ , демонстрируют высокую поверхностную экспрессию CAR на трансдуцированных Т-клетках и усиленный цитолиз раковых клеток. Таким образом, в настоящем изобретении предложены способы и композиции для усиления иммунного ответа на злокачественные новообразования и патогены с использованием иммуномодулирующей системы (например, сконструированных CAR-Т-клеток), содержащей полипептид, который модулирует сигналинг TGF-b.

**[0006]** В настоящем изобретении предложены, в частности, улучшенные полипептиды CAR, содержащие модулятор сигнального пути TGF $\beta$ , молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие такие полипептиды, клетки (например, Т-клетки), генетически модифицированные для экспрессии улучшенных CAR, и способы применения модифицированных клеток в адоптивной клеточной терапии для лечения злокачественного

новообразования (например, злокачественных новообразований в виде солидных опухолей).

**[0007]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к CAR-T-клеткам, которые были модифицированы для экспрессии модулятора сигнального пути TGF $\beta$  (также называемого в данном документе «TGF $\beta$ -«бронированными» CAR-T-клетками»), так что клетки при введении субъекту в необходимости в этом, способны вызывать иммунный ответ у субъекта, который, по сравнению с CAR-T-клеткой, которая не экспрессирует модулятор сигнального пути TGF $\beta$  (также называемая в данном документе «небронированной CAR-T-клеткой»).

**[0008]** В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к иммунореактивным клеткам (например, T-клеткам), несущим антигенные рецепторы, которые могут представлять собой химерные антигенные рецепторы (CAR), которые включают полипептиды, модулирующие сигналинг TGF-b. Эти сконструированные иммунореактивные клетки (например, CAR-T-клетки) являются направленными на антиген и устойчивыми к иммуносупрессии и/или обладают усиленными иммуноактивирующими свойствами.

**[0009]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена популяция генетически сконструированных T-клеток, содержащих химерный антигенный рецептор (CAR), который распознает ассоциированный со злокачественным новообразованием антиген и модулятор сигнального пути TGF $\beta$ .

**[0010]** В некоторых вариантах осуществления популяция клеток содержит CAR, который распознает антиген, выбранный из группы, состоящей из ADGRE2, CLEC12, CAIX, CEA, CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, антигена клетки, инфицированной цитомегаловирусом (CMV), CEACAM 5, клаудина 18.2, EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2,3,4, FBP, фетального ацетилхолинового рецептора, фолатного рецептора альфа, GCC (также известного как GUCY2C), GD2, GD3, HER-2, hTERT, IL-13R-a2, х-легкой цепи, KDR, LeY, молекулы клеточной адгезии LI, MAGE-AI, MUC1, MUC13, мезотелина, лиганда NKG2D, NY-ES0-1, онкофетального антигена (h5T4), PSCA, PSMA, PTK7, ROR1, TAG-72, TROP2, VEGF-R2, и WT-1.

**[0011]** В некоторых вариантах осуществления популяция клеток содержит CAR к CD19 или CAR к GCC.

**[0012]** В некоторых вариантах осуществления популяция клеток содержит модулятор сигнального пути TGF $\beta$ , который связывает TGF $\beta$  или рецептор TGF $\beta$ .

**[0013]** В некоторых вариантах осуществления популяция клеток содержит модулятор сигнального пути TGF $\beta$ , включающий аминокислотную последовательность, выбранную из таблицы 1.

**[0014]** В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является аутологичной.

**[0015]** В некоторых вариантах осуществления популяция клеток является аллогенной.

**[0016]** В некоторых вариантах осуществления популяция клеток представляет собой первичные клетки. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток получают из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC).

**[0017]** В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток генетически модифицируют с использованием вектора, содержащего первую нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид CAR, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую модулятор сигнального пути TGF $\beta$ .

**[0018]** В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток генетически модифицируют с использованием двух векторов, при этом первый вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид CAR, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую модулятор сигнального пути TGF $\beta$ .

**[0019]** В некоторых вариантах осуществления популяция клеток генетически модифицирована с использованием CRISPR. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток генетически модифицируют с использованием ретровирусной трансдукции (включая гамма-ретровирусную), лентивирусной трансдукции, транспозонов и транспозаз (системы Sleeping Beauty и PiggyBac), опосредованной переносом матричной РНК экспрессии генов, системы редактирования генов (инсерция генов или делеция/нарушение генов), CRISPR-Cas9, ZFN (нуклеаза с цинковыми пальцами) или TALEN (нуклеаза на основе эффектора, подобного активатору транскрипции).

**[0020]** В некоторых вариантах осуществления популяция клеток содержит CAR, содержащий внутриклеточный сигнальный домен, выбранный из группы, состоящей из сигнального домена CD3 $\zeta$ -цепи, CD97, 2B4, GDI 1a-CD18, CD2, ICOS, CD27, CD154, CDS, OX40, 4-1BB, DAP10, DAP12, CD28, или их комбинаций и вариантов.

**[0021]** В некоторых вариантах осуществления популяция клеток содержит CAR, содержащий трансмембранный домен, полученный из трансмембранного домена, выбранного из группы, состоящей из CD3, CD8, CD28, OX40, CD27, 4-1BB, DAP10, DAP12 или их комбинаций.

**[0022]** В одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему первую нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид CAR, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую модулятор сигнального пути TGF $\beta$ .

**[0023]** В некоторых вариантах осуществления вектор, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид CAR, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую модулятор сигнального пути TGF $\beta$ , содержит сайт внутренней посадки рибосомы.

**[0024]** В некоторых вариантах осуществления вектор дополнительно содержит рибосомную последовательность 2A.

**[0025]** В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает иммунную клетку, модифицированную вектором, содержащим первую нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид CAR, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую модулятор сигнального пути TGF $\beta$ .

**[0026]** В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммунная клетка представляет собой Т-клетку.

**[0027]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ модулирования иммунного ответа у хозяина, включающий введение хозяину популяции генетически сконструированных Т-клеток, содержащих химерный антигенный рецептор (CAR), который распознает ассоциированный со злокачественным новообразованием антиген, и модулятор сигнального пути TGF $\beta$ , при этом модуляция иммунного ответа иммунными клетками-хозяевами включает одно или более из следующего: увеличение продукции IFN $\gamma$ ; увеличение продукции IL-2; увеличение презентации антигена; и увеличение пролиферации.

**[0028]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая популяцию генетически сконструированных Т-клеток, содержащую химерный антигенный рецептор (CAR), который распознает ассоциированный со злокачественным новообразованием антиген, и модулятор сигнального пути TGF $\beta$ .

**[0029]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ лечения или предупреждения злокачественного новообразования у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества популяции генетически сконструированных Т-клеток, содержащих химерный антигенный рецептор (CAR), который распознает ассоциированный со злокачественным новообразованием антиген, и модулятор сигнального пути TGF $\beta$ .

**[0030]** В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из лейкоза, острого лейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза, острого миелоцитарного лейкоза, острого миелобластного лейкоза, острого промиелоцитарного лейкоза, острого миеломоноцитарного лейкоза, острого моноцитарного лейкоза, острого эритролейкоза, хронического лейкоза, хронического миелоцитарного лейкоза, множественной миеломы, хронического лимфолейкоза, истинной полицитемии, лимфомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема, болезни тяжелых цепей, солидных опухолей, саркомы, карциномы, фибросаркомы, миксосаркомы, липосаркомы, хондросаркомы, остеогенной саркомы, хордомы, ангиосаркомы, эндотелиосаркомы, лимфангиосаркомы, лимфангиоэндотелиосаркомы, синовиомы, мезотелиомы, опухоли Юинга, лейомиосаркомы, рабдомиосаркомы, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака яичников, рака предстательной железы, плоскоклеточного рака, базально-клеточной карциномы, аденокарциномы, карциномы потовых желез, карциномы сальных желез, папиллярной карциномы, папиллярной аденокарциномы, цистаденокарциномы, медуллярной карциномы, бронхогенного рака, почечно-клеточного рака, гепатомы, гепатоцеллюлярной карциномы, карциномы желчного протока, хориокарциномы, семиномы, эмбриональной карциномы, опухоли Вильмса, рака шейки матки, рака матки, рака яичка, карциномы легкого, мелкоклеточного карциномы легкого, карциномы мочевого пузыря, колоректального рака, эпителиального рака, глиомы, астроцитомы, медуллобластомы, краниофарингиомы, эпендимомы, пинеаломы, гемангиобластомы, акустической невромы, олигодендроглиомы, шванномы, менингиомы, меланомы, нейробластомы, ретинобластомы и их метастаз.

**[0031]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена иммуномодулирующая система, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR); и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$  (например, модулятор сигналинг TGF $\beta$ ).

**[0032]** В некоторых вариантах осуществления полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , содержит вариабельную область тяжелой цепи (vH).

**[0033]** В некоторых вариантах осуществления полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , содержит вариабельную область тяжелой цепи (vH) и вариабельную область легкой цепи (vL).

**[0034]** В некоторых вариантах осуществления полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , содержит антигенсвязывающую молекулу, выбранную из группы,

состоящей из антитела IgA, антитела IgG, антитела IgE, антитела IgM, би- или полиспецифического антитела, фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента F(ab')<sub>2</sub>, фрагмента Fd', фрагмента Fd, выделенных CDR или их наборов; одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), слитой молекулы полипептид-Fc, однодоменного антитела (sdAb), верблужьего антитела; маскированного антитела, малых модульных иммунофармацевтических препаратов («SMIPTM»), одноцепочечного, tandemного антитела, 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, или их фрагментов.

**[0035]** В некоторых вариантах осуществления полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , содержит одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , содержит однодоменное антитело (sdAb). В некоторых вариантах осуществления полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , содержит антитело, состоящее только из тяжелых цепей.

**[0036]** В некоторых вариантах осуществления полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , содержит аминокислотную последовательность, выбранную из таблицы 1.

**[0037]** В некоторых вариантах осуществления полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , содержит димерный антигенсвязывающий агент.

**[0038]** В некоторых вариантах осуществления полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , связывается с TGF- $\beta$ .

**[0039]** В некоторых вариантах осуществления полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , связывается с рецептором TGF- $\beta$ .

**[0040]** В некоторых вариантах осуществления полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , связывается с рецептором 2 TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ R2).

**[0041]** В некоторых вариантах осуществления полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , содержит рецептор 2 TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ R2) или его фрагмент.

**[0042]** В некоторых вариантах осуществления полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , содержит внеклеточный домен TGF- $\beta$ R2 (TGF- $\beta$ R2).

**[0043]** В некоторых вариантах осуществления CAR связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из ADGRE2, CLEC12, CAIX, CEA, CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, антигена клетки, инфицированной цитомегаловирусом (CMV), CEACAM 5,

клаудина 18.2, EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2,3,4, FBP, фетального ацетилхолинового рецептора, фолатного рецептора альфа, GCC (также известного как GUCY2C), GD2, GD3, HER-2, hTERT, IL-13R-a2, х-легкой цепи, KDR, LeY, молекулы клеточной адгезии LI, MAGE-AI, MUC1, MUC13, мезотелина, лиганда NKG2D, NY-ES0-1, онкофетального антигена (h5T4), PSCA, PSMA, PTK7 ROR1, TAG-72, TROP2, VEGF-R2, и WT-1.

**[0044]** В некоторых вариантах осуществления CAR связывается с CD19 или GCC.

**[0045]** В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, выбранный из группы, состоящей из сигнального домена CD3 $\zeta$ -цепи, CD97, 2B4, GDI 1a-CD18, CD2, ICOS, CD27, CD154, CDS, OX40, 4-1BB, DAP10, DAP12, CD28, или их комбинаций и вариантов.

**[0046]** Иммуномодулирующая система по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что CAR содержит трансмембранный домен, полученный из трансмембранного домена, выбранного из группы, состоящей из CD3, CD8, CD28, OX40, CD27, 4-1BB, DAP10, DAP12 или их комбинаций.

**[0047]** В некоторых вариантах осуществления в модифицированном полипептиде CD3z отсутствуют все или часть иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов (ITAM), где ITAM представляют собой ITAM1, ITAM2 и ITAM3. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид CD3z дополнительно лишен всех или части областей богатых основаниями участков (BRS), где области BRS представляют собой BRS1, BRS2 и BRS3.

**[0048]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, содержащая иммуномодулирующую систему, описанную в данном документе, где последовательность кодирует химерный антигенный рецептор (CAR); и последовательность, кодирующая полипептид, который модулирует сигналинг TGF-b, присутствуют в одной конструкции.

**[0049]** В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая химерный антигенный рецептор (CAR); и последовательность, кодирующая полипептид, который модулирует сигнальный путь TGF-b, присутствуют в различных конструкциях.

**[0050]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую описанную в данном документе иммуномодулирующую систему.

**[0051]** В некоторых вариантах осуществления вектор содержит сайт внутренней посадки рибосомы (IRES).

**[0052]** В некоторых вариантах осуществления вектор содержит рибосомную последовательность 2А. В некоторых вариантах осуществления рибосомная последовательность 2А представляет собой Р2А или Т2А.

**[0053]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена иммунореактивная клетка, содержащая описанную в данном документе иммуномодулирующую систему.

**[0054]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена иммунореактивная клетка, содержащая нацеливающий агент со специфичностью к опухолеассоциированному антигену или стрессовому лиганду и нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ .

**[0055]** В некоторых вариантах осуществления нацеливающий агент специфически связывается со стрессовым лигандом, выбранным из группы, состоящей из М1С-А, М1С-В, ULBP1-6;

**[0056]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена иммунореактивная клетка, содержащая: химерный антигенный рецептор (CAR); и нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ .

**[0057]** В некоторых вариантах осуществления CAR и нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , представлены в одном и том же полинуклеотиде.

**[0058]** В некоторых вариантах осуществления CAR и нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , представлены в отдельных полинуклеотидах.

**[0059]** В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , секретируется из клетки.

**[0060]** В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , содержит переменную область тяжелой цепи (vH).

**[0061]** В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , содержит переменную область тяжелой цепи (vH) и переменную область легкой цепи (vL).

**[0062]** В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , содержит одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

**[0063]** В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , содержит димерный антигенсвязывающий агент.

**[0064]** В некоторых вариантах осуществления полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ , связывается с TGF- $\beta$ .

**[0065]** В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный полипептид, который модулирует сигналинг TGF-b, содержит рецептор 2 TGF-b (TGF-bR2) или его фрагмент.

**[0066]** В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный полипептид, который модулирует сигналинг TGF-b, содержит внеклеточный домен TGF-bR2.

**[0067]** В некоторых вариантах осуществления полипептид, который модулирует сигналинг TGF-b, связывается с рецептором TGF-b.

**[0068]** В некоторых вариантах осуществления полипептид, который модулирует сигналинг TGF-b, связывается с рецептором 2 TGF-b (TGF-bR2).

**[0069]** В некоторых вариантах осуществления иммунореактивная клетка содержит CAR, экспрессированной из вектора, сконструированной мРНК или интегрированной в хромосому клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая CAR, интегрируется в хромосому клетки-хозяина с помощью эндонуклеазы. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая CAR, интегрирована в хромосому клетки-хозяина с использованием Crispr/Cas9, Cas12a или Cas13.

**[0070]** В некоторых вариантах осуществления иммунореактивная клетка содержит рекомбинантный полипептид, который модулирует сигналинг TGF-b, экспрессируется из вектора, сконструированной мРНК или интегрирован в хромосому клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая полипептид, который модулирует сигналинг TGF-b, интегрируется в хромосому клетки-хозяина с использованием Crispr/Cas9, Cas12a или Cas13.

**[0071]** В некоторых вариантах осуществления иммунореактивная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), естественной Т-клетки-киллера (NK), гамма-дельта-Т-клетки, цитотоксического Т-лимфоцита (CTL), регуляторной Т-клетки, эмбриональной стволовой клетки человека, В-клетки, макрофага и плюрипотентной стволовой клетки, из которых могут быть дифференцированы лимфоидные клетки (например, NK или Т-клетка, полученная из iPSC).

**[0072]** В некоторых вариантах осуществления иммунореактивная клетка представляет собой сконструированную аутологичную клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунореактивная клетка представляет собой сконструированную аллогенную клетку.

**[0073]** В некоторых вариантах осуществления иммунореактивная клетка содержит CAR, который связывается с опухолевым антигеном, выбранным из группы, состоящей из ADGRE2, CLEC12, CAIX, CEA, CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34,

CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, антигена клетки, инфицированной цитомегаловирусом (CMV), CEACAM 5, клаудина 18.2, EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2,3,4, FBP, фетального ацетилхолинового рецептора, фолатного рецептора альфа, GCC (также известного как GUCY2C), GD2, GD3, HER-2, hTERT, IL-13R-a2, х-легкой цепи, KDR, LeY, молекулы клеточной адгезии LI, MAGE-AI, MUC1, MUC13, мезотелина, лиганда NKG2D, NY-ES0-1, онкофетального антигена (h5T4), PSCA, PSMA, PTK7, ROR1, TAG-72, TROP2, VEGF-R2, и WT-1.

**[0074]** В некоторых вариантах осуществления CAR связывается с CD19 или GCC. В некоторых вариантах осуществления CAR связывается с GCC.

**[0075]** В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, полученный из сигнального домена CD3 $\zeta$ , CD97, 2B4, GDI 1a-CD18, CD2, ICOS, CD27, CD154, CDS, OX40, 4-1BB, DAP10, DAP12, CD28, или их комбинаций и вариантов.

**[0076]** В некоторых вариантах осуществления CAR содержит трансмембранный домен, полученный из трансмембранного домена, выбранного из группы, состоящей из CD3, CD8, CD28, OX40, CD27, 4-1BB, DAP10, DAP12 или их комбинаций.

**[0077]** В некоторых вариантах осуществления в модифицированном полипептиде CD3z отсутствуют все или часть иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов (ITAM), где ITAM представляют собой ITAM1, ITAM2 и ITAM3. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид CD3z дополнительно лишен всех или части областей богатых основаниями участков (BRS), где области BRS представляют собой BRS1, BRS2 и BRS3.

**[0078]** В некоторых вариантах осуществления иммунореактивная клетка содержит химерный костимулирующий рецептор (CCR). В некоторых вариантах осуществления CAR содержит костимулирующий домен. В некоторых вариантах осуществления CAR не содержит внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления CAR не содержит домен CD3z.

**[0079]** В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный полипептид, который модулирует сигналинг TGF-b, усиливает иммунный ответ иммунореактивной клетки.

**[0080]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество описанной в данной документе иммуномодулирующей системы.

**[0081]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей описанную в данном документе иммуномодулирующую систему.

**[0082]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество вектора, кодирующего описанную в данном документе иммуномодулирующую систему.

**[0083]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество описанной в данной документе иммунореактивной клетки.

**[0084]** В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

**[0085]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен набор для лечения злокачественного новообразования, включающий иммунореактивную клетку, содержащую химерный антигенный рецептор (CAR); и нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ .

**[0086]** В некоторых вариантах осуществления набор содержит нуклеиновую кислоту или вектор, кодирующий иммуномодулирующую систему, описанную в данном документе.

**[0087]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ лечения или предупреждения злокачественного новообразования или его метастазирования у субъекта, включающий введение эффективного количества иммунореактивной клетки, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR); и нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ .

**[0088]** В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, можно использовать для лечения гемобластоза. В других вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, можно использовать для лечения солидной опухоли.

**[0089]** В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из лейкоза, острого лейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза, острого миелоцитарного лейкоза, острого миелобластного лейкоза, острого промиелоцитарного лейкоза, острого миеломоноцитарного лейкоза, острого моноцитарного лейкоза, острого эритролейкоза, хронического лейкоза, хронического миелоцитарного лейкоза, множественной миеломы, хронического лимфолейкоза, истинной полицитемии, лимфомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема, болезни тяжелых цепей, солидных опухолей, саркомы,

карциномы, фибросаркомы, миксосаркомы, липосаркомы, хондросаркомы, остеогенной саркомы, хордомы, ангиосаркомы, эндотелиосаркомы, лимфангиосаркомы, лимфангиоэндотелиосаркомы, синовиомы, мезотелиомы, опухоли Юинга, лейомиосаркомы, рабдомиосаркомы, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака яичников, рака предстательной железы, плоскоклеточного рака, базально-клеточной карциномы, аденокарциномы, карциномы потовых желез, карциномы сальных желез, папиллярной карциномы, папиллярной аденокарциномы, цистаденокарциномы, медуллярной карциномы, бронхогенного рака, почечно-клеточного рака, гепатомы, гепатоцеллюлярной карциномы, карциномы желчного протока, хориокарциномы, семиномы, эмбриональной карциномы, опухоли Вильмса, рака шейки матки, рака матки, рака яичка, карциномы легкого, мелкоклеточного карциномы легкого, карциномы мочевого пузыря, колоректального рака, эпителиального рака, глиомы, астроцитомы, медуллобластомы, краниофарингиомы, эпендимомы, пинеаломы, гемангиобластомы, акустической невромы, олигодендроглиомы, шванномы, менингиомы, меланомы, нейробластомы, и ретинобластомы.

**[0090]** В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту второго терапевтического агента.

**[0091]** В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент вводят субъекту системно.

**[0092]** В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент вводят отдельно от CAR и нуклеиновой кислоты, кодирующей рекомбинантный полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ .

**[0093]** В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент нацелен на PD1/PD-L1, CXCR2 и/или IL-15.

**[0094]** В некоторых вариантах осуществления второй терапевтический агент представляет собой ингибитор PD1/PD-L1.

**[0095]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ модулирования активности иммунной клетки, включающий введение нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR); и нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ .

**[0096]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ модулирования активности химерного антигенного рецептора (CAR), включающий введение нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR); и нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ .

**[0097]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ уменьшения опухолевой массы у субъекта, включающий введение эффективного количества иммуномодулирующей системы, содержащей нуклеиновую кислоту, вектор или иммунореактивную клетку, описанные в данном документе.

**[0098]** В некоторых вариантах осуществления способ уменьшает количество опухолевых клеток. В некоторых вариантах осуществления способ уменьшает размер опухоли. В некоторых вариантах осуществления способ уничтожает опухоль у субъекта.

**[0099]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ увеличения продукции иммуноактивирующих цитокинов в ответ на раковую клетку у субъекта, включающий введение субъекту иммуномодулирующей системы, содержащей нуклеиновую кислоту, вектор или иммунореактивную клетку, описанные в данном документе.

**[0100]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ получения антигенспецифической иммунореактивной клетки, включающий введение в иммунореактивную клетку последовательности нуклеиновой кислоты, которая кодирует химерный антигенный рецептор (CAR); и нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантный полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ .

**[0101]** 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**

**[0102]** Чертежи, включенные в данный документ, которые состоят из следующих фигур, предназначены исключительно для иллюстрации, а не для ограничения.

**[0103]** На Фиг. 1A-1E показана иллюстративная экспрессия CAR и модуляторов сигналинга TGF- $\beta$  в иммунореактивных клетках (например, трансдуцированных Т-клетках). На Фиг. 1A показана популяция лимфоцитов, на Фиг. 1B показаны синглеты, на Фиг. 1C показаны популяции живых CD3<sup>+</sup> клеток, а на Фиг. 1D показаны иллюстративные результаты проточной цитометрии, оценивающие экспрессию CAR в «бронированных» Т-клетках с человеческими CAR, экспрессирующих TGF- $\beta$ . На Фиг. 1E представлена гистограмма, демонстрирующая эффективность трансдукции в виде % живых клеток, положительных в отношении окрашивания CAR, с использованием «небронированных» клеток, трансдуцированных только CAR к CD19, и Т-клеток с CAR к CD19, «бронированных» VH-VL1 scFv к TGF $\beta$  (SEQ ID NO: 1), VH-VL2 scFv к TGF $\beta$  (SEQ ID NO: 2), VL-VH

scFv к TGFb (SEQ ID NO: 3), VH-VL scFv к TGFbR2 (SEQ ID NO: 4), VL-VH scFv к TGFbR2 (SEQ ID NO: 5), VH1 к mTGFbR2 (SEQ ID NO: 6) и VH1 к hTGFbR2 (SEQ ID NO: 8), или нетрансдуцированных клеток.

[0104] На Фиг. 2А-2В представлены графики, демонстрирующие иллюстративные результаты анализа уничтожения *in vitro* для иммунореактивных клеток, совместно экспрессирующих CAR к CD19 и модулятор сигналинга TGF-β, против клеток CD19+ Raji (Фиг. 2А) и клеток CD19ko Raji (Фиг. 2В) с использованием эффекторных клеток по отношению к мишеням для «небронированных» клеток, трансдуцированных только CAR к CD19, и Т-клеток с CAR к CD19, «бронированных» VH-VL1 scFv к TGFb (SEQ ID NO: 1), VH-VL2 scFv к TGFb (SEQ ID NO: 2), VL-VH scFv к TGFb (SEQ ID NO: 3), VH-VL scFv к TGFbR2 (SEQ ID NO: 4), VL-VH scFv к TGFbR2 (SEQ ID NO: 5), VH1 к mTGFbR2 (SEQ ID NO: 6) и VH1 к hTGFbR2 (SEQ ID NO: 8), или нетрансдуцированных клеток.

[0105] На Фиг. 3А представлена гистограмма, иллюстрирующая иллюстративные результаты ELISA, демонстрирующие секрецию связывающих TGF-β веществ, а на Фиг. 3В представлена гистограмма, иллюстрирующая иллюстративные результаты ELISA, демонстрирующие секрецию связывающих TGFβR2 веществ человеческими CAR-Т-клетками и их способность связываться с родственным им антигеном.

[0106] На Фиг. 4 представлена гистограмма, на которой изображены иллюстративные результаты люциферазного анализа, оценивающего ингибирование сигналинга TGF-β супернатантом CAR-Т-клеток, секретирующих конструкции: VH-VL1 scFv к TGFb (SEQ ID NO: 1), VH-VL2 scFv к TGFb (SEQ ID NO: 2), VL-VH scFv к TGFb (SEQ ID NO: 3), VH-VL scFv к TGFbR2 (SEQ ID NO: 4), VL-VH scFv к TGFbR2 (SEQ ID NO: 5), VH1 к mTGFbR2 (SEQ ID NO: 6) и VH1 к hTGFbR2 (SEQ ID NO: 8).

[0107] На Фиг. 5А показана гистограмма, на которой изображены иллюстративные результаты люциферазного анализа, оценивающего ингибирование сигналинга TGF-β супернатантом клеток CAR-Т, секретирующих димер VH-VL1 scFv к TGFb с G4S (SEQ ID NO: 17), димер VH-VL1 scFv к TGFb с 2xG4S (SEQ ID NO: 18), миниантитело VH-VL1 scFv к TGFb (SEQ ID NO: 21), миниантитело VH-VL1 scFv к TGFb + шарнир (SEQ ID NO: 19). На Фиг. 5В представлена схема иллюстративных модуляторов TGF-β, сконструированных и подвергнутых скринингу на секрецию мультимерных связывающих веществ к TGF-β с использованием репортерного люциферазного анализа. На Фиг. 5С показана схема иллюстративных модуляторов TGF-β, содержащих связывающие домены VHH.

**[0108]** На Фиг. 6А показана гистограмма, на которой изображены иллюстративные результаты люциферазного анализа, оценивающего относительную блокирующую активность «бронированных» CAR-T-клеток, коэкспрессирующих связывающие вещества, мономерный VH-VL1 scFv к TGFb (SEQ ID NO: 1) и димерный VH-VL1 scFv к TGFb с G4S (SEQ ID NO: 17), по сравнению с «небронированными» клетками, экспрессирующими только CAR. На Фиг. 6В показана гистограмма, на которой изображены иллюстративные результаты люциферазного анализа, использованного для оценки относительной блокирующей активности мономерных и димерных конструкций VHH и scFv к TGFβR2. «Небронированные» CAR-T-клетки, мономер VH2 к mTGFbR2, димер VH2 к mTGFbR2 с G4S, тример VH2 к mTGFbR2 с G4S, мономер VH2 к hTGFbR2, димер VH2 к hTGFbR2 с G4S, мономер VH3 к hTGFbR2, димер VH3 к hTGFbR2 с G4S, мономер VH-VL scFv к hTGFbR2, димер VH-VL scFv к hTGFbR2 с G4S.

**[0109]** На Фиг. 7А и Фиг. 7В представлены гистограммы, изображающие иллюстративные результаты ELISA, демонстрирующие, что иллюстративные модуляторы TGFb связываются с TGFbR2 человека (Фиг. 7А), но не с TGFbR2 мыши (Фиг. 7В). «Небронированные» CAR-T-клетки, мономер VH2 к mTGFbR2, димер VH2 к mTGFbR2 с G4S, тример VH2 к mTGFbR2 с G4S, мономер VH2 к hTGFbR2, димер VH2 к hTGFbR2 с G4S, мономер VH3 к hTGFbR2, димер VH3 к hTGFbR2 с G4S, мономер VH-VL scFv к hTGFbR2, димер VH-VL scFv к hTGFbR2 с G4S

**[0110]** На Фиг. 8А показан пример графика инъекций для оценки опухолевого роста опухолевых клеток EMT6-hCD19-Fluc, как описано в Примере 6. На Фиг. 8В показан примерный объем опухоли в зависимости от времени у мышей, которым вводили CAR-T-клетки, секретирующие связывающее TGF-β вещество по сравнению с «небронированными» CAR-T или нетрансдуцированными CAR-T-клетками. На Фиг. 8С показаны типичные метастазы в печени у мышей, получавших лечение CAR-T-клетками, которые секретируют связывающие TGF-β вещества по сравнению с «небронированными» или нетрансдуцированными CAR-T-клетками. На Фиг. 8D показаны типичные метастазы в легких у мышей, получавших лечение CAR-T-клетками, которые секретируют связывающие TGF-β вещества по сравнению с «небронированными» или нетрансдуцированными CAR-T-клетками. На Фиг. 8Е показаны иллюстративные результаты визуализации экспрессирующих люциферазу опухолевых клеток в тканях печени и легких.

**[0111]** На Фиг. 9А и Фиг. 9В представлены гистограммы, на которых показаны иллюстративные результаты репортерного анализа SBE-Luc TGF-b, сравнивающего супернатант из «бронированных» мышинных CAR-T-клеток, секретирующих различные

лиганды-ловушки TGF-b (от VH-VL1 scFv к TGF-b до мономеров, гомодимеров (Фиг. 9А) и гетеродимеров ВКД TGFbR2 (Фиг. 9В)) с супернатантом «небронированных» CAR-T-клеток.

**[0112]** На Фиг. 10А показан иллюстративный график инъекций для оценки опухолевого роста опухолевых клеток EMT6-hCD19-Fluc. На Фиг. 10В показан иллюстративный объем опухоли в зависимости от времени у мышей, которым вводили нетрансдуцированные Т-клетки или «небронированные» CAR-T-клетки (CAR-T-клетки, которые не коэкспрессируют модулятор сигналинга TGFβ). На Фиг. 10С показан иллюстративный объем опухоли в зависимости от времени у мышей, которым вводили «бронированные» CAR-T-клетки, коэкспрессирующие димер 1+2ВКД TGFbR, или «небронированные» CAR-T-клетки (CAR-T-клетки, которые не коэкспрессируют модулятор сигналинга TGFβ). На Фиг. 10D показан иллюстративный объем опухоли в зависимости от времени у мышей, которым системно вводили антитело к TGFb (1D11) или «небронированные» CAR-T-клетки (CAR-T-клетки, которые не коэкспрессируют модулятор сигналинга TGFβ).

**[0113]** На Фиг. 11 представлен график, демонстрирующий иллюстративный объем опухоли у мышей, которая развилась из клеток MC38, экспрессирующих CD19, в зависимости от времени. Мыши получали нетрансдуцированные Т-клетки, «небронированные» Т-клетки с CAR к CD19 или CAR-T-клетки, секретирующие ингибирующее связывающее вещество против TGF-b (VH-VL1 scFv к TGF-b).

**[0114]** На Фиг. 12 представлен график, демонстрирующий иллюстративный анализ методом РНК-секвенирования, демонстрирующий усиленную активацию иммунного ответа хозяина CAR-T-клетками, секретирующими связывающее вещество против TGF-b (VH-VL1 scFv к TGF-b (SEQ ID NO: 1)).

**[0115]** На Фиг. 13 показаны иллюстративные оценки биомаркеров для инфильтрирующих опухоль Т-клеток (CD3d+, CD3e+, CD3g+), CD8+ Т-клеток (CD8a+) и цитотоксических Т-клеток (GzmB+) в опухолях мышей, которым вводили CAR-T-клетки, секретирующие VH-VL1 scFv к TGF-b (SEQ ID NO: 1).

**[0116]** На Фиг. 14 показан иллюстративный анализ представленности групп генов (GSEA) для одного образца, оценки представленности демонстрируют повышенные сигнатуры Т-клеток и сигнатуры IFNγ в опухолях мышей, которым вводили CAR-T-клетки, секретирующие VH-VL1 scFv к TGF-b (SEQ ID NO: 1).

**[0117]** На Фиг. 15 показан иллюстративный анализ поверхностных маркеров, включая TCRa/b, CD8a, CD4, CD25, CD62L, CD11b, Gr1, CD11c, CD45.1 и CD45, у мышей, получавших нетрансдуцированные контрольные Т-клетки, «небронированные» Т-клетки с

CAR к CD19 или CAR-T-клетки, секретирующие мономер VH-VL1 scFv к TGF- $\beta$  (SEQ ID NO: 1).

**[0118]** На **Фиг. 16А** и **Фиг. 16В** представляют собой графики, иллюстрирующие иллюстративный анализ *in vivo* в модели ксенотрансплантата GSU, демонстрирующий улучшенную функцию Т-клеток с CAR к GCC человека, «бронированных» блокирующими антителами к TGF- $\beta$  или к TGF $\beta$ R2.

**[0119]** На **Фиг. 17А-17D** показаны концентрации модуляторов TGF $\beta$  в опухоли и/или плазме, секретируемых Т-клетками с CAR к GCC, коэкспрессирующими VH-VL1 scFv к TGF- $\beta$  и VHH к TGF $\beta$ R2, определенные с использованием анализа методом ЖХ/МС с иммунным захватом антителом к Flag.

**[0120]** На **Фиг. 18А-18С** представляют собой графики, иллюстрирующие иллюстративные результаты анализа уничтожения *in vitro* в HT29-GCC-положительных клетках с использованием «небронированных» Т-клеток с CAR к GCC, Т-клеток с CAR к GCC, «бронированных» мономером VHH к TGF $\beta$ R2, и Т-клеток с CAR к GCC, «бронированных» димером VHH к TGF $\beta$ R2, в отсутствие TGF $\beta$  (Фиг. 18А) и в присутствии TGF $\beta$  (Фиг. 18В). На Фиг. 18С показана пролиферация CAR-Т-клеток в присутствии и в отсутствие TGF $\beta$ .

**[0121]** На **Фиг. 19** представлены иллюстративные результаты проточной цитометрии, демонстрирующие экспрессию PD-1/Lag3 в клетках после повторной стимуляции антигеном.

**[0122]** На **Фиг. 20А-20С** показаны (п/к) модели ксенотрансплантатов для экспрессирующих GCC клеток GSU (Фиг. 20А), HT55 (Фиг. 20В) и MDA-MB-231-FP4 Luc (Фиг. 20С), получавшие «бронированные» и «небронированные» CAR-Т-клетки и CAR-Т-клетки, экспрессирующие доминантно-негативный TGF $\beta$ R2 (dnTGF $\beta$ R2).

**[0123]** На **Фиг. 21А-21С** показаны иллюстративные результаты модели метастазов в печени HT55, при которой проводили лечение «бронированными» Т-клетками с CAR к GCC.

**[0124]** На **Фиг. 22А** показаны CAR-Т-клетки, подсчитанные с помощью проточной цитометрии и фенотипирования на основе FACS, которые проводили в указанные моменты времени. На **Фиг. 22В** показан процент цитотоксичности для Т-клеток с CAR к Msln, коэкспрессирующих CAR к Msln вместе с модулятором TGF $\beta$  (например, TGF $\beta$ R2-VH или dnTGF $\beta$ R2) или контрольной VH к GFP (контрольной VH к Msln).

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**[0125]** Для того, чтобы настоящее изобретение было более понятным, ниже представлены определения некоторых терминов. Дополнительные определения для следующих терминов и других терминов изложены в описании.

**[0126]** 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.

**[0127]** *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.

**[0128]** *Адоптивная клеточная терапия*. Используемые взаимозаменяемо в контексте данного документа термины «адоптивная клеточная терапия», «адоптивный перенос клеток», «клеточная терапия» и «АСТ» относятся к переносу клеток, например, популяции генетически модифицированных клеток, пациенту, нуждающемуся в этом. Клетки могут быть получены и выращены от нуждающегося в них пациента (т. е. аутологичные клетки) или могут быть получены от донора, не являющегося пациентом (т. е. аллогенные клетки). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой иммунную клетку, такую как лимфоцит, модифицированную для экспрессии CAR и модулятора сигнального пути TGF $\beta$ , как описано в данном документе (например, CAR-T-клетка, «бронированная» TGF $\beta$ ). Для проведения АСТ могут быть использованы различные виды клеток, включая, без ограничений, естественные клетки-киллеры (NK-клетки), Т-клетки, CD8<sup>+</sup> клетки, CD4<sup>+</sup> клетки, гамма-дельта Т-клетки, регуляторные Т-клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), Т-клетки, полученные из iPSC, NK-клетки, полученные из iPSC, гемопоэтические стволовые клетки (HSC), мезенхимальные стволовые клетки (MSC) и моноклеарные клетки периферической крови.

**[0129]** *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, TGF $\beta$  или TGFBR), что указывает на силу связывающего взаимодействия. В некоторых вариантах

осуществления показатель аффинности выражается в виде константы диссоциации ( $K_D$ ). Аффинность связывания антигенсвязывающего белка с его мишенью может быть определена с помощью равновесных методов (например, твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или радиоиммунного анализа (RIA)), кинетики (например, анализа BIACORE™) или других методов, известных в данной области техники.

**[0130]** *Авидность*: в контексте данного документа термин «авидность» представляет собой общую силу связывания двух молекул друг с другом в нескольких сайтах, например, с учетом валентности взаимодействия.

**[0131]** *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 «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, амфибий, рыб, насекомых и/или червей. В некоторых вариантах осуществления животное может быть трансгенным животным, генно-модифицированным животным и/или клоном.

**[0132]** *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.

**[0133]** *Аллогенные*: в контексте данного документа «аллогенный» относится к любому материалу, полученному от другого животного того же вида, что и индивид, которому этот материал вводят. 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.

**[0134]** *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», которые включают часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или вариабельная область антитела. Примеры «фрагментов антител» включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv; триатела; тетратела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител; и CDR-содержащие фрагменты, включенные в полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Специалистам в данной области техники понятно, что термин «фрагмент антитела» не подразумевает и не ограничивается каким-либо конкретным способом образования. Фрагмент антитела может быть получен с использованием любой подходящей методологии, включая, помимо прочего, расщепление интактного антитела, химический синтез, рекомбинантное производство и т. д. Как известно в данной области техники, интактные антитела, образуемые в природе, представляют собой тетрамерные агенты с молекулярной массой приблизительно 150 кДа, состоящие из двух идентичных полипептидов тяжелой цепи (около 50 кДа каждый) и двух идентичных полипептидов легкой цепи (около 25 кДа каждый), которые связываются друг с другом в то, что обычно называют «Y-образной» структурой. Каждая тяжелая цепь состоит по меньшей мере из четырех доменов (каждый длиной около 110 аминокислот) - N-концевого вариабельного (V<sub>H</sub>) домена (расположенного на концах структуры Y), за которым следуют три константных домена: C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 и C-концевой C<sub>H</sub>3 (расположенный в основании стебля Y). Короткая область, известная как «переключатель», соединяет вариабельную и константную области тяжелой цепи. «Шарнир» соединяет домены C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3 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 вариабельного (V<sub>L</sub>) домена, за которым следует C-концевой константный (C<sub>L</sub>) 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<sub>H</sub>2. 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 вариабельный домен содержит три гипервариабельные 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 гипервариабельный антигенсвязывающий сайт, расположенный на вершине Y-структуры. Сравнение аминокислотных последовательностей полипептидных цепей антител определило два класса легких цепей ( $\kappa$  и  $\lambda$ ), несколько классов тяжелых цепей (например,  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ) и определенные подклассы тяжелых цепей ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$  и  $\gamma 4$ ). Классы антител (IgA [включая IgA1, IgA2], IgD, IgE, IgG [включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4] и IgM) определяются на основе класса используемых последовательностей тяжелых цепей.

**[0135]** 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 имел бы, если бы было получен 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.]).

**[0136]** *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). Понятно, что, когда термин «около» или «приблизительно» используется для изменения заявленного эталонного значения, само указанное эталонное значение охватывается вместе со значениями, близкими к указанному эталонному значению по обе стороны от указанного эталонного значения.

**[0137]** *«Бронированные» CAR-T-клетки* В контексте данного документа термин «бронированные CAR-клетки» или «бронированные CAR-T-клетки» относится к генетически сконструированным клеткам, обладающим способностью уклоняться от опухолевой иммуносупрессии и индуцированной опухолью гипофункции CAR-T. В некоторых вариантах осуществления «бронированная» CAR-T-клетка содержит химерный антигенный рецептор (CAR), который распознает ассоциированный со злокачественным новообразованием антиген, и модулятор сигналинга TGF $\beta$ .

**[0138]** *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. В контексте данного документа CDR может относиться к CDR, определенным любым известным в данной области техники подходом, включая комбинации подходов. В способах, используемых в данном документе, могут использоваться CDR, определенные в соответствии с любым из этих подходов. Для любого данного варианта осуществления, содержащего более одной CDR, CDR могут быть определены в соответствии с любым из определений Kabat, Chothia, расширенного определения, определений AbM, Contact и/или конформационного определения.

**[0139]** *Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность* или АЗКЦ относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig, связанный с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, натуральных клетках-киллерах (NK-клетках), нейтрофилах и макрофагах), позволяет этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с несущей антиген целевой клеткой и впоследствии уничтожать целевую клетку цитотоксинами. Антитела «приводят в готовность» цитотоксические клетки и необходимы для уничтожения клетки-мишени по этому механизму. Первичные клетки, опосредующие АЗКЦ, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках приведена в таблице 3 на странице 464 в Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991). Для оценки активности АЗКЦ представляющей интерес молекулы может быть проведен анализ АЗКЦ *in vitro*, описанный в патенте США № 5500362 или 5821337. Эффекторные клетки, пригодные для такого анализа, включают 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).

**[0140]** *Антиген:* в контексте данного документа термин «антиген» относится к агенту, вызывающему иммунный ответ; и/или агенту, который связывается с Т-клеточным рецептором (например, при презентации молекулой МНС) или с антителом (например, продуцируемым В-клеткой) при воздействии или введении в организм. В некоторых вариантах осуществления антиген вызывает гуморальный ответ (например, включая продукцию антигенспецифических антител) в организме; альтернативно или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления антиген вызывает клеточный ответ (например, с участием Т-клеток, рецепторы которых специфически взаимодействуют с антигеном) в организме. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что конкретный антиген может вызывать иммунный ответ у одного или более представителей организма-мишени (например, у мышей, кроликов, приматов, людей), но не у всех представителей вида организма-мишени. В некоторых вариантах осуществления антиген вызывает иммунный ответ у по меньшей мере около 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% представителей вида организма-мишени. В некоторых вариантах осуществления антиген связывается с антителом и/или Т-клеточным рецептором и может индуцировать или не индуцировать конкретный физиологический ответ в организме. В некоторых вариантах осуществления, например, антиген может связываться с антителом и/или с Т-клеточным рецептором *in vitro* независимо от того, происходит ли такое взаимодействие *in vivo*. В некоторых вариантах антиген реагирует с продуктами специфического гуморального или клеточного иммунитета, в том числе индуцируемого гетерологичными иммуногенами.

**[0141]** *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 объекта, которые физически связаны друг с другом, ковалентно связаны друг с другом; в

некоторых вариантах осуществления два или более объекта, 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. В некоторых вариантах осуществления термин «ассоциированный с» в отношении «антигена, ассоциированного с раковой клеткой» относится к присутствию определенного антигена на поверхности раковой клетки.

**[0142]** *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®.

**[0143]** *Носитель*: В контексте данного документа термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, 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.

**[0144]** *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.

**[0145]** *Химерный антигенный рецептор*. В контексте данного документа термин «химерный антигенный рецептор» или «CAR» относится к сконструированному рецептору, который состоит из одного или более внеклеточных мишень-связывающих доменов (например, полученных из антител), трансмембранной области и одного или более внутриклеточных эффекторных доменов. CAR, как правило, вводят в иммунные клетки, такие как Т-клетки, для перенаправления специфичности в отношении желаемого антигена клеточной поверхности или комплекса МНС-пептид. Эти синтетические рецепторы, как правило, содержат мишень-связывающий домен, который связан с одним или более сигнальными доменами посредством гибкого линкера в одной слитой молекуле. Мишень-связывающий домен используется для направления иммунной клетки (например, Т-клетки) к конкретным мишеням на поверхности патологических клеток (например, раковой клетки), а сигнальные домены обеспечивают молекулярный механизм для активации и пролиферации иммунных клеток (например, Т-клеток). Гибкий линкер, который, как правило, проходит через мембрану иммунной клетки (например, Т-клетки) (т. е. образуя трансмембранный домен), обеспечивает экспонирование на клеточной мембране мишень-связывающего домена CAR. CAR успешно позволяют перенаправлять иммунные клетки (например, Т-клетки) против антигенов, экспрессируемых на поверхности опухолевых клеток различных злокачественных новообразований, включая лимфомы и солидные опухоли (Gross et al., (1989) *Transplant Proc.*, 21(1 Pt 1): 127-30; Jena et al., (2010) *Blood*, 116(7):1035-44). Внеклеточный связывающий домен CAR может состоять из одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), полученного путем слияния варибельных областей тяжелой и легкой цепей мышиного или гуманизированного моноклонального антитела. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен содержит однодоменное антитело. В качестве альтернативы можно использовать scFv, полученные из Fab, (вместо антител, например, полученных из библиотек Fab). В различных вариантах осуществления этот scFv сливают с трансмембранным доменом, а затем с внутриклеточным сигнальным доменом.

**[0146]** Разработано по меньшей мере три поколения CAR. CAR первого поколения содержали мишень-связывающие домены, присоединенные к сигнальному домену, полученному из цитоплазматической области CD3-дзета или гамма-цепей Fc-рецептора. Показано, что CAR первого поколения успешно перенаправляют Т-клетки на выбранную мишень, но не обеспечивают пролонгированной экспансии и противоопухолевой активности *in vivo*. CAR второго и третьего поколений направлены на повышение выживаемости модифицированных Т-клеток и увеличение пролиферации за счет включения костимулирующих молекул, таких как CD28, OX-40 (CD134) и 4-1BB (CD137). Варианты осуществления, описанные в данном документе, частично направлены на дальнейшее улучшение иммунотерапии, включающей CAR-T, например, путем бронирования CAR-T модулятором сигнального пути TGF $\beta$ , что делает иммунотерапию более эффективной при лечении злокачественных новообразований, особенно злокачественных новообразований в виде солидных опухолей. Предложенные в данном документе «бронированные» CAR улучшают или усиливают функцию CAR-T и выживаемость в условиях враждебного опухолевого микроокружения по сравнению с «небронированными» CAR-T клетками.

**[0147]** *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.

**[0148]** *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.

**[0149]** *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.

**[0150]** *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 антисмысловую 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.

**[0151]** *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.

**[0152]** *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.

**[0153]** *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).

**[0154]** *Эпитоп:* в контексте данного документа термин «эпитоп» включает любой фрагмент, который специфически распознается компонентом связывания иммуноглобулина (например, антитела или рецептора) полностью или частично. В некоторых вариантах осуществления эпитоп состоит из множества аминокислот в антигене. В некоторых вариантах осуществления такие аминокислотные остатки экспонируются на

поверхности, когда антиген принимает соответствующую трехмерную конформацию. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки физически находятся рядом или граничат друг с другом, когда антиген принимает такую конформацию. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере некоторые из аминокислот физически отделены друг от друга, когда антиген принимает альтернативную конформацию (например, линеаризуется; например, нелинейный эпитоп).

**[0155]** *Экципиент*: в контексте данного документа термин «эксципиент» относится к нетерапевтическому агенту, который может быть включен в фармацевтическую композицию, например, для обеспечения или достижения необходимой консистенции или стабилизирующего эффекта. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают, например, крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерин, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т. п.

**[0156]** *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.

**[0157]** *Ex vivo*: В контексте настоящего документа термин «*ex vivo*» означает процесс, в котором клетки извлекают из живого организма и выращивают вне организма (например, в пробирке, в культуральном мешке, в биореакторе).

**[0158]** *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.

**[0159]** *Хозяин*. В контексте данного документа термин «хозяин» используется для обозначения человека или любого отличного от человека животного (например, мыши, крысы, кролика, собаки, кошки, крупного рогатого скота, свиньи, овцы, лошади, примата, отличного от человека) или системы (например, клетки или линии клеток). В некоторых вариантах осуществления хозяин представляет собой организм, которому вводят клетку

или популяцию клеток, экспрессирующих CAR и/или модулятор TGF $\beta$ , описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления введение популяции клеток приводит к усилению иммунного ответа у хозяина.

**[0160]** *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 модифицированной молекулы CAR, как описано в данном документе, стандартными рекомбинантными методами. 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.

**[0161]** В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева относятся к клеткам человека. 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™).

**[0162]** Имму́нный отве́т. В контексте данного документа термин «имму́нный отве́т» относится к ответу клетки иммунной системы, такой как В-клетка, Т-клетка, дендритная клетка, макрофаг или полиморфонуклеоцит, на стимул, такой как антиген или вакцина. Имму́нный отве́т может включать любую клетку организма, участвующую в защитном ответе хозяина, включая, например, эпителиальную клетку, секретирующую интерферон или цитокин. Имму́нный отве́т включает, но не ограничивается ими, врожденный и/или адаптивный имму́нный отве́т. Способы измерения имму́нных отве́тов 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. В некоторых вариантах осуществления имму́нный отве́т относится к имму́нному ответу, наблюдаемому после введения «бронированных» или «небронированных» CAR-T-клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления имму́нный отве́т после введения «бронированных» CAR-T-клеток, описанных в данном документе, измеряется одним или более из следующих факторов: увеличение пролиферации клеток, экспрессирующих CAR, увеличение продукции IFN $\gamma$  клетками, экспрессирующими CAR, увеличение продукции IL-2 клетками, экспрессирующими CAR, увеличение пролиферацию имму́нных клеток хозяина, увеличение продукции IFN $\gamma$  имму́нными клетками хозяина, увеличение продукции IL-2 имму́нными клетками хозяина, увеличение презентации антигена антигенпрезентирующими клетками, увеличение костимуляции антигенпрезентирующими клетками хозяина, увеличение активации эндотелия или увеличение хоминга к опухоли имму́нных клеток (например, NK-клеток, Т-клеток, макрофагов).

**[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*).

**[0163]** *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 соединения 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 вариантах осуществления клетка может быть «выделенной клеткой», которая отделена от молекулярных и/или клеточных компонентов, которые естественным образом сопутствуют клетке. В некоторых альтернативных или дополнительных вариантах осуществления клетка, которая была подвергнута одному или более способам очистки, может считаться «выделенной» клеткой в той степени, в которой она была отделена от других компонентов, а) с которыми она связана в природе; и/или б) с которыми она была связана при первоначальной выработке.

**[0164]** *Линкер:* в контексте данного документа термин «линкер» относится к функциональной группе (например, химической или полипептидной), которая ковалентно связывает два или более полипептидов или нуклеиновых кислот, так что они соединяются друг с другом. В контексте данного документа термин «пептидный линкер» относится к

одной или более аминокислотам, используемым для связывания двух белков вместе (например, для связывания доменов VH и VL).

**[0165]** *Модулировать или модулятор:* в контексте данного документа термин «модулировать» или «модулятор» относится к способности компонента положительно или отрицательно изменять связанную функцию. Иллюстративные модуляции включают около 1%, около 2%, около 5%, около 10%, около 25%, около 50%, около 75% или около 100%. Например, в данном документе предложены модуляторы сигналинга TGF $\beta$ , способные изменять или предотвращать сигналинг рецептора TGF $\beta$ . Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что этого можно достичь либо путем связывания цитокина (т.е. TGF $\beta$ ), который активирует сигналинг TGF $\beta$ R, либо самого рецептора (например, антитела к TGF $\beta$  или его фрагмента, антитела к TGF $\beta$ R или его фрагмента). Следовательно, этот термин охватывает как молекулы, которые связывают TGF $\beta$ , так и молекулы, которые связывают TGF $\beta$ R. В одном варианте осуществления модулятор по настоящему изобретению может нейтрализовать сигналинг TGF $\beta$  посредством TGF $\beta$ RII. Под «нейтрализацией» подразумевается, что нормальный эффект на сигналинг TGF $\beta$  блокируется, так что присутствие TGF $\beta$  оказывает нейтральный эффект на сигналинг TGF $\beta$ RII. В некоторых вариантах осуществления модуляторы TGF $\beta$  улучшают иммунный ответ у хозяина.

**[0166]** *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'-дезоксиррибозу, 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.

**[0167]** *Фармацевтически приемлемые носители.* Фармацевтически приемлемые носители (наполнители), применимые в данном описании, являются обычными. В Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15<sup>th</sup> Edition (1975) описаны композиции и составы, подходящие для фармацевтической доставки одной или более терапевтических композиций. В общем, природа носителя будет зависеть от конкретного применяемого способа введения. Например, парентеральные составы обычно содержат жидкости для инъекций, которые включают фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как вода, физиологический солевой раствор, сбалансированные растворы солей, водный раствор декстрозы, глицерин и т.п. в качестве носителя. Для твердых композиций (например, в форме порошка, пилюль, таблеток или капсул) обычные нетоксичные твердые носители могут включать, например, маннит фармацевтической степени чистоты, лактозу, крахмал, или стеарат магния. В дополнение к биологически нейтральным носителям, фармацевтические композиции, подлежащие введению, могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты, буферные агенты pH и тому подобное, например, ацетат натрия или монолаурат сорбитана.

**[0168]** *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.

**[0169]** 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).

**[0170]** *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, злокачественного новообразования). 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.

**[0171]** *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.

**[0172]** *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.

**[0173]**        *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 Ю представляющих интерес.

**[0174]**        *Однодоменное антитело*: в контексте данного документа термины «однодоменное антитело (sdAb)», «вариабельный одиночный домен» или «иммуноглобулиновый одиночный вариабельный домен (ISV)», «антитело на основе одного вариабельного домена тяжелой цепи (VH)» относятся к одиночному вариабельному фрагменту антитела, который связывается с антигеном-мишенью. Эти термины используются в данном документе взаимозаменяемо. sdAb представляет собой один антигенсвязывающий полипептид, имеющий три определяющие комплементарность области (CDR). Одно sdAb способно связываться с антигеном без образования пар с соответствующим CDR-содержащим полипептидом. В некоторых случаях однодоменные антитела конструируют из HCAb верблюдовых, а их вариабельные домены тяжелой цепи обозначают как «VHH». Некоторые VHH также могут быть известны как наноантитела. sdAb верблюдовых представляет собой один из самых маленьких известных антигенсвязывающих фрагментов антител (см., например, Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-8 (1993); Greenberg et al., Nature 374: 168-73 (1995); Hassanzadeh-Ghassabeh et al., Nanomedicine (Lond), 8:1013-26 (2013)). Базовая VHH имеет следующую структуру от N-конца к C-концу: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, где FR1-FR4 относятся к каркасным областям 1-4, соответственно, и в которых CDR1-CDR3 относятся к определяющим комплементарность областям 1-3. Домены VHH верблюдовых могут быть гуманизированы в соответствии со стандартными методами, доступными в данной области техники, и такие домены считаются «доменными антителами». В контексте данного

документа термин «VN» включает домены VHN верблюдовых, и термин VHN может использоваться для обозначения доменных антител человеческого или верблюдового происхождения, содержащего только тяжелую цепь. Как объяснено ниже, некоторые варианты осуществления различных аспектов изобретения относятся к связывающему агенту, содержащему один переменный домен тяжелой цепи антитела/один переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, которые связывают антиген TGFβ в отсутствие легкой цепи.

**[0175]** *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 злокачественное новообразование (например, желудочно-кишечного происхождения), симптом злокачественного новообразования, при котором по меньшей мере некоторые клетки экспрессируют TGFβ, или имеющим предрасположенность к злокачественному новообразованию, при котором по меньшей мере некоторые из клеток экспрессируют TGFβ. 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. т.д. если не указано иное.

**[0176]** *По существу:* в контексте данного документа термин «по существу» относится к качественному состоянию, демонстрирующему общую или почти полную степень или степень представляющей интерес характеристики или свойства. Средний специалист в области биологических наук поймет, что биологические и химические явления редко, если вообще когда-либо, доходят до завершения и/или переходят к завершению, достигают или исключают абсолютный результат. Таким образом, термин «по существу» используется в данном документе для обозначения потенциального недостатка полноты, присущей многим биологическим и химическим явлениям.

**[0177]** *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.

**[0178]** *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, 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 транзитивно экспрессирует введенную нуклеиновую кислоту в течение ограниченных периодов времени.

**[0179]** *Трансформирующий фактор роста- $\beta$  (TGF $\beta$ ).* В контексте данного документа термины «TGF-бета», «TGF $\beta$ », «TGF $\beta$ » и «трансформирующий фактор роста-бета» используются взаимозаменяемо и относятся к семейству молекул, которые имеют либо полноразмерную нативную аминокислотную последовательность любого из TGF-бета человека, включая латентные формы и ассоциированный или неассоциированный комплекс предшественника и зрелого TGF-бета («латентного TGF-бета»). Ссылка на такой TGF-бета в данном документе будет пониматься как ссылка на любую из идентифицированных в настоящее время форм, включая TGF-бета1, TGF-бета2, TGF-бета3, TGF-бета4 и TGF-бета5

и их латентные версии, а также к молекулам TGF-бета человека, идентифицированным в будущем, включая полипептиды, полученные из последовательности любого известного TGF-бета, и имеющие по меньшей мере около 75%, предпочтительно по меньшей мере около 80%, более предпочтительно по меньшей мере около 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере около 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере около 95% гомологии с последовательностью. Конкретные термины «TGF-бета1», «TGF-бета2» и «TGF-бета3», а также «TGF-бета4» и «TGF-бета5» относятся к TGF-бета, определенным в литературе, например, Derynck et al., Nature, см. выше, Seyedin et al., J. Biol. Chem., 262, см. выше, и deMartin et al., см. выше. Термин «TGF-бета» относится к гену, кодирующему TGF-бета человека. Предпочтительный TGF-бета представляет собой TGF-бета человека с нативной последовательностью.

**[0180]** Члены семейства TGF-бета определяются как те, которые имеют девять остатков цистеина в зрелой части молекулы, имеют по меньшей мере 65% гомологии с другими известными последовательностями TGF-бета в зрелой области и могут конкурировать за один и тот же рецептор. Кроме того, все они, по-видимому, кодируются как более крупный предшественник, который имеет общую область с высокой гомологией вблизи N-конца и демонстрирует сохранение трех остатков цистеина в той части предшественника, которая впоследствии будет удалена при процессинге. Более того, TGF-бета, по-видимому, имеет сайт процессинга с четырьмя или пятью аминокислотами.

**[0181]** *Рецептор трансформирующего фактора роста-β (TGFβR)*. В контексте данного документа термин «TGF-bR» или «рецептор TGF-b» или «рецептор TGF-бета» или «TGFβR» используется для охвата всех трех подтипов семейства TGFβR (т. е. TGFβR1, TGFβR2, TGFβR3). Рецепторы TGFβ характеризуются серин/треонинкиназной активностью и существуют в нескольких различных изоформах, которые могут быть гомо- или гетеродимерными.

**[0182]** *Модулятор сигнального пути TGFβ или модулятор TGFβ*: в контексте данного документа термин «модулятор сигнального пути TGFβ» или «модулятор TGFβ» относится к молекуле (например, антителу или его фрагменту), которая способна модулировать сигнальный путь TGFβ (например, которая обладает ингибирующим, блокирующим или нейтрализующим действием), которая может либо связывать сам TGFβ, либо она может связывать рецептор TGFβ на клетках. В любом случае модулятор ингибирует сигнальный путь TGFβ (например, либо путем связывания самого цитокина (т. е. TGFβ)), либо путем связывания рецептора TGFβ. Следовательно, этот термин охватывает оба типа модуляторов, которые связывают TGFβ, и те, которые связывают рецептор TGFβ. В различных вариантах осуществления, описанных в данном документе, модулятор

сигнального пути TGFβ экспрессируется вместе с химерным антигенным рецептором в модифицированной иммунной клетке (например, CAR-T-клетке). CAR-T-клетки, экспрессирующие такой модулятор сигнального пути TGFβ, называются в данном документе «бронированными» TGFβ CAR-T-клетками.

**[0183]** *Лечить или лечение:* в контексте данного документа термин «лечить» или «лечение» определяется как введение терапевтического агента субъекту, например, пациенту, или введение, например, путем нанесения на выделенную ткань или клетку из организма субъекта, которые возвращаются в организм субъекта. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой «бронированную» CAR-T-клетку (например, сконструированную CAR-T-клетку, коэкспрессирующую модулятор TGFβ). 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 злокачественному новообразованию. 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, злокачественное новообразование).

**[0184]** Описанное в данном документе изобретение используется в «эффективном количестве» для терапевтического, профилактического или превентивного лечения. Терапевтически эффективное количество «бронированных» CAR-T-клеток (например, сконструированных клеток, которые коэкспрессируют CAR и модулятор сигналинга TGFβ), которые описаны в данном документе, представляет собой количество, эффективное для облегчения или уменьшения одного или более симптомов, или для предотвращения или лечения, заболевание (например, злокачественное новообразование).

**[0185]** *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.

**[0186]** *Вектор:* в контексте данного документа термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая

относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, причем дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к независимой репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную природу репликации и эписомные векторы млекопитающего). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина после внесения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе «векторами экспрессии».

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НЕКОТОРЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

**[0187]** Настоящее изобретение относится к способам и композициям для усиления иммунного ответа на злокачественные новообразование и патогены с использованием модифицированной иммунной клетки (например, CAR-T-клетки), «бронированной» полипептидом, который модулирует сигналинг TGF $\beta$ . 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.

### **Сигналинг TGF-B/SMAD**

**[0188]** Трансформирующий фактор роста-бета (TGF- $\beta$ ) представляет собой многофункциональный цитокин, первоначально названный так за его способность трансформировать нормальные фибробласты в клетки, способные к независимому от прикрепления росту. Сигналинг TGF- $\beta$  контролирует многие ключевые клеточные функции, включая пролиферацию, дифференцировку, выживание, миграцию и эпителиально-мезенхимальный переход. Он регулирует различные биологические процессы, такие как формирование внеклеточного матрикса, заживление ран, эмбриональное развитие, развитие костей, гемопоэз, иммунные и воспалительные реакции и злокачественную трансформацию. Нарушение регуляции TGF- $\beta$  приводит к

патологическим состояниям, например, врожденным дефектам, злокачественным новообразованиям, хроническому воспалению, аутоиммунным и фиброзным заболеваниям.

**[0189]** TGF- $\beta$ , продуцируемый в основном гемопоэтическими и опухолевыми клетками, может регулировать, т. е. стимулировать или ингибировать, рост и дифференцировку клеток из различных нормальных и неопластических тканей (Sporn et al., Science, 233: 532 (1986)) и стимулируют образование и выработку различных стромальных элементов. TGF- $\beta$  участвует во многих пролиферативных и непролиферативных клеточных процессах, таких как пролиферация и дифференцировка клеток, эмбриональное развитие, формирование внеклеточного матрикса, развитие костей, заживление ран, кроветворение, а также иммунные и воспалительные реакции.

**[0190]** TGF- $\beta$  также обладает иммуносупрессивной активностью, которая включает ингибирование лимфокин-активируемых киллеров (LAK) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), подавление В-лимфопоэза и экспрессии легкой каппа-цепи, негативную регуляцию гемопоэза, снижение экспрессии HLA-DR на опухолевых клетках и ингибирование пролиферации активированных антигеном В-лимфоцитов в ответ на фактор роста В-клеток. Многие опухоли человека и многие линии опухолевых клеток продуцируют TGF- $\beta$ , что указывает на возможный механизм уклонения этих опухолей от нормального иммунологического надзора. Эта негативная иммуномодуляция в сочетании с данными о том, что некоторые трансформированные линии клеток утратили способность отвечать на TGF- $\beta$  аутокринным образом и что TGF- $\beta$  стимулирует формирование стромы и ослабляет иммунный надзор за опухолью, предполагает привлекательные модели дерегуляции и пролиферации новообразований.

**[0191]** Поскольку сигналинг TGF- $\beta$  важен как для здоровых клеток, так и для регуляции ракового процесса, системное нацеливание на TGF- $\beta$  может вызывать нежелательные побочные эффекты. Что касается конкретно злокачественного новообразования, известно, что члены семейства TGF- $\beta$  обладают рядом биологических активностей, связанных с онкогенезом (включая ангиогенез) и метастазированием. TGF- $\beta$  ингибирует пролиферацию многих типов клеток, включая капиллярные эндотелиальные клетки и гладкомышечные клетки. TGF- $\beta$  снижает экспрессию интегрина (альфа1-бета1, альфа2-бета1 и альфа-v-бета3, участвующих в миграции эндотелиальных клеток). Интегрины участвуют в миграции всех клеток, в том числе метастатических. TGF- $\beta$  снижает экспрессию матриксной металлопротеиназы, необходимой как для ангиогенеза, так и для метастазирования. TGF- $\beta$  индуцирует ингибитор активатора плазминогена, который ингибирует каскад протеиназ, необходимый для ангиогенеза и метастазирования. TGF- $\beta$  индуцирует нормальные клетки ингибировать трансформированные клетки. См.,

например, Yingling et al., Nature Reviews, 3 (12): 1011-1022 (2004), в которой раскрывается, что дерегуляция TGF- $\beta$  вовлечена в патогенез различных заболеваний, включая злокачественное новообразование и фиброз, и представляет обоснование оценки ингибиторов сигналинга TGF- $\beta$  в качестве противораковых средств, биомаркеров/диагностических средств, структуры низкомолекулярных ингибиторов, которые находятся в разработке, и модель поиска новых лекарственных средств направленного действия, которая применяется для их разработки.

**[0192]** В контексте данного документа термин «сигнальный путь TGF- $\beta$ » используется для описания событий нисходящего сигналинга, связанных с TGF- $\beta$  и TGF- $\beta$ -подобными лигандами. Например, в одном сигнальном пути лиганд TGF- $\beta$  связывается с рецептором TGF- $\beta$  типа II и активирует его. Рецептор TGF- $\beta$  типа II рекрутирует и образует гетеродимер с рецептором TGF- $\beta$  типа I. Полученный гетеродимер обеспечивает фосфорилирование рецептора типа I, который, в свою очередь, фосфорилирует и активирует член семейства белков SMAD. Запускается сигнальный каскад, который хорошо известен специалистам в данной области техники и в конечном итоге приводит к контролю экспрессии медиаторов, участвующих, среди прочего, в росте клеток, дифференцировке клеток, онкогенезе, апоптозе и клеточном гомеостазе. Другие сигнальные пути TGF- $\beta$  также рассматриваются для манипуляций в соответствии со способами, описанными в данном документе.

### **Модуляторы сигнального пути TGF- $\beta$**

**[0193]** В настоящем изобретении предложена иммуномодулирующая система, содержащая модуляторы сигналинга TGF- $\beta$  (например, полипептиды, которые модулируют сигналинг TGF- $\beta$ , или последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды, которые модулируют сигналинг TGF- $\beta$ ). В некоторых вариантах осуществления модуляторы сигналинга TGF- $\beta$  вызывают клеточную реакцию при связывании с TGF- $\beta$  или рецептором TGF- $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления модуляторы сигналинга TGF- $\beta$  секретируются из клетки.

**[0194]** В различных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены модифицированные иммунные клетки (например, T-клетки), которые экспрессируют химерный антигенный рецептор вместе с модулятором сигналинга TGF- $\beta$ . Такой модулятор может связывать сам TGF- $\beta$  или рецепторы TGF- $\beta$ . CAR-T-клетки, экспрессирующие такие модуляторы, называются в данном документе «бронированными» TGF- $\beta$  CAR-T-клетками.

### *Антигенсвязывающие молекулы к TGFβ и TGFβR2*

**[0195]** В некоторых вариантах реализации модуляторы сигналинга TGF-β представляют собой антигенсвязывающие молекулы (например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие молекулы (например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты) специфически связываются с TGF-β. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие молекулы (например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты) специфически связываются с рецептором TGF-β (TGFβR) (например, TGFβR1, TGFβR2).

**[0196]** Модуляторы сигналинга TGF-β (например, молекула антитела к TGFβ или молекула антитела к TGFβR) могут включать все или подмножество петель связывания антигена из CDR или тяжелой цепи, описанных в данном документе. Примеры аминокислотных последовательностей антигенсвязывающих агентов к TGFβ или к TGFβR2, описанных в данном документе, включая переменные области, показаны в таблице 1. Дополнительные антитела к TGFβ или к TGFβR2 также описаны в патентах США № 7723486 и 9783604; публикациях заявок на патент США № US20160017026A1 и US20180105597, US20190119387; и международных патентных заявках №№ WO2012093125A1 WO2011/012609, WO 2017/141208 A1; каждая из которых в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки. Антигенсвязывающие агенты, применимые в описанной в данном документе иммуномодулирующей системе, включают, но не ограничиваются ими, антитела, двухвалентные фрагменты, такие как (Fab')<sub>2</sub>, моновалентные фрагменты, такие как Fab, одноцепочечные антитела, одноцепочечные Fv (scFv), однодоменные антитела, поливалентные одноцепочечные антитела, диатела, триатела и т.п., которые специфически связываются с антигеном (например, эпитопом TGFβR).

**[0197]** В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующая система содержит модулятор сигналинга TGF-β (например, антигенсвязывающий агент к TGFβ или к TGFβR2), который имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, указанной в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующая система содержит модулятор сигналинга TGF-β, содержащий одну или более последовательностей CDR антитела или его фрагмента, описанного в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления модулятор сигналинга TGF-β по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность переменной 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 1. В некоторых вариантах осуществления VH из модулятора сигналинга TGF- $\beta$  представляет собой однодоменное антитело (VH).

**[0198]** В некоторых вариантах осуществления модулятор сигналинга TGF- $\beta$  содержит лидерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления модулятор сигналинга TGF- $\beta$  представляет собой мономер. В некоторых вариантах осуществления модулятор сигналинга TGF- $\beta$  представляет собой димер. В некоторых вариантах осуществления модулятор сигналинга TGF- $\beta$  представляет собой тример.

**[0199]** В некоторых вариантах осуществления модулятор сигналинга TGF- $\beta$  содержит линкер для соединения доменов в тандеме. В некоторых вариантах осуществления линкер включает GGGGS (SEQ ID NO: 59). В некоторых вариантах осуществления линкер включает (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 59), где n равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10. В некоторых вариантах осуществления линкер включает GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 61).

**[0200]** В некоторых вариантах осуществления модулятор сигналинга TGF- $\beta$  содержит аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, которая имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% % идентичности с последовательностью VL, указанной в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие агенты к TGF $\beta$  по настоящему изобретению содержат аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая идентична последовательности VH, указанной в таблице 1.

**[0201]** В некоторых вариантах осуществления модулятор сигналинга TGF- $\beta$  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 1. В некоторых вариантах осуществления модулятор сигналинга TGF- $\beta$  по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая идентична последовательности vH, указанной в таблице 1.

**[0202]** В некоторых вариантах осуществления VH модулятора сигналинга TGF- $\beta$  (например, однодоменного антитела) содержит лидерную последовательность при условии, что она имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к TGF $\beta$  с vH (например, однодоменное антитело) содержит лидерную последовательность, указанную в таблице 1.

*Таблица 1. Иллюстративные антигенсвязывающие молекулы к TGF $\beta$  и к TGF $\beta$ R2*

SEQ ID NO	Последовательность
SEQ ID NO: 1 TGFb scFv VH-VL1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQ GLEWMGGVIPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLR SEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLE PEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKR
SEQ ID NO: 2 TGFb scFv VH-VL2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQ GLEWMGGVIPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLR SEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLE PEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKR
SEQ ID NO: 3 TGFb scFv VL-VH	ETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLE PEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKR GGGGSGGGGSGGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVIPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 4 TGFbR2 scFv VH-VL	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPG KGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRTISIDTSKSQFSLKLSSVTA ADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG GGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFLTISSE LEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 5 TGFbR2 scFv VL-VH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFLTISSE LEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK GGGGSGGGGSGGGGSSQLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRTISIDTSKSQFSLKLSSVTAADTAVYYCP

	RGPTMIRGVIDSWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 6 mTGFbR2 VH1	EVQLLES <del>GGGLVQPGGSLRL</del> SCAASGFTFTTYGMGWVRQAPG KGLEWVSWIEKTGNKTY <del>YADSVKGRFTISR</del> DNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKARHIK <del>VRSRDFDYWGQ</del> GT <del>LVTVSS</del>
SEQ ID NO: 7	EVQLLES <del>GGGLVQPGGSLRL</del> SCAASGFTFTTYGMGWVRQAPG KGLEWVSWIEKTGNKTY <del>YADSVKGRFTISR</del> DNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK <del>AGRHIK</del> VRSRDFDYWGQGT <del>LVTVSS</del>
SEQ ID NO: 8 hTGFbR2 VH1	EVQLLES <del>GGGLVQPGGSLRL</del> SCAASGFTFGTEQMWWVRQAPG KGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMN <del>SLRAEDTAVYYCAKRRPTGV</del> SGTFYDYWGQ GT <del>LVTVSS</del>
SEQ ID NO: 9	EVQLLES <del>GGGLVQPGGSLRL</del> SCAASGFTFGTEQMWWVRQAPG KGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISR <del>DNSKNTLYLQMN</del> SL RAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGT <del>LVTVSS</del> ggggsEV QLLES <del>GGGLVQPGGSLRL</del> SCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK LEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISR <del>DNSKNTLYLQMN</del> SLRA EDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGT <del>LVTVSS</del>
SEQ ID NO: 10	EVQLLES <del>GGGLVQPGGSLRL</del> SCAASGFTFGTEQMWWVRQAPG KGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISR <del>DNSKNTLYLQMN</del> SL RAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGT <del>LVTVSS</del> ggggsggg gsEVQLLES <del>GGGLVQPGGSLRL</del> SCAASGFTFGTEQMWWVRQAP GKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISR <del>DNSKNTLYLQMN</del> S LRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGT <del>LVTVSS</del>
SEQ ID NO: 11	EVQLLES <del>GGGLVQPGGSLRL</del> SCAASGFTFGTEQMWWVRQAPG KGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISR <del>DNSKNTLYLQMN</del> SL RAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGT <del>LVTVSS</del> GGSEPK SsDKTHTCPPCgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPG KGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSGGSEPK SsDKTHTCPPCgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGggggsggsE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK GLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 13	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPG KGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSgggssgggs gGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 14	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPG KGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSgggssgggs gGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGggggsggsEVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTG VSGTFYDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 15	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPG KGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSggggsEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK LEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSggggsEVQLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEF VSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 16	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPG  KLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL  RAEDTAVYYCAKRRPTGVS GTFYDYWGQGTLVTVSSggggsEV  QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK  LEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA  EDTAVYYCAKRRPTGVS GTFYDYWGQGTLVTVSSggggsEVQLL  ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKLEF  VSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT  AVYYCAKRRPTGVS GTFYDYWGQGTLVTVSSSEVQLLESGGGL  VQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKLEFVSRIDSP  GGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC  AKRRPTGVS GTFYDYWGQGTLVTVSSggggsggggsEVQLLESGG  GLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKLEFVSRID  SPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY  CAKRRPTGVS GTFYDYWGQGTLVTVSSggggsggggsEVQLLESG  GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKLEFVSRI  DSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY  YCAKRRPTGVS GTFYDYWGQGTLVTVSS</p>
SEQ ID NO: 17	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQ  GLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLR  SEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG  GSGGGGSALETVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA  WYQQKPGQAPRL LIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE  PEDFAVYYCQYADSPITFGQGRLEIKggggsQVQLVQSGAEVK  KPGSSVKV SCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIV  DIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCAST  LGLVLDAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSALETV  LTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA WYQQKPGQAPRL  LIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQY  ADSPITFGQGRLEIK</p>
SEQ ID NO: 18	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQ  GLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLR  SEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG  GSGGGGSALETVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA  WYQQKPGQAPRL LIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE</p>

	<p>PEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKggggsggggsQVQLVQSG  AEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGG  VIPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTA  VYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT  LTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSA  LETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQ  APRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC  QQYADSPITFGQGTRLEIK</p>
SEQ ID NO: 19	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQ  GLEWMGGVIPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLR  SEDTA  VYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT  LTVTVSSGGGGSGGG  GSGGGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA  WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE  PEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKGGSEPKSsDKTHTCPPC  gggsgggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ  GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>
SEQ ID NO: 20	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQ  GLEWMGGVIPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLR  SEDTA  VYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT  LTVTVSSGGGGSGGG  GSGGGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA  WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE  PEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKGGSEPKSsDKTHTCPPC  gggsgggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ  GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGggggsggsQVQLVQSGAE  VKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVIP  IVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTA  VYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT  LTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSALET  VLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPR  LLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ  YADSPITFGQGTRLEIK</p>
SEQ ID NO: 21	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQ  GLEWMGGVIPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLR  SEDTA  VYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT  LTVTVSSGGGGSGGG</p>

	<p>GSGGGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA  WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE  PEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKgggssgggsgGQPREPQVY  TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT  TPPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNH  YTQKSLSLSPG</p>
<p>SEQ ID NO: 22</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQ  GLEWMGGVIPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLR  SEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGG  GSGGGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLA  WYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE  PEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKgggssgggsgGQPREPQVY  TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT  TPPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNH  YTQKSLSLSPGggggsggsQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG  YTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVIPIVDIANYAQRFKGRVTI  TADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQ  GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERA  TLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRF  SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIK</p>
<p>SEQ ID NO: 23</p>	<p>QLQVQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPG  KGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRAITSIDTSKSFSLKLSVTA  ADTAVYYCPRGPTMIRGVDSWGGQGTLLTVSSGGGGSGGGGS  GGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQK  PGQAPRLLIYDASNRAITGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAV  YYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKggggsQLQVQESGPGLVKVPSETL  SLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEKTYYN  PSLKSRAITSIDTSKSFSLKLSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGV  IDSWGGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSP  GERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAITGI  PARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGT  KVEIK</p>
<p>SEQ ID NO: 24</p>	<p>QLQVQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPG  KGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRAITSIDTSKSFSLKLSVTA  ADTAVYYCPRGPTMIRGVDSWGGQGTLLTVSSGGGGSGGGGS</p>

	<p>GGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQK  PGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV  YYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKggggsggggsQLQVQESGPGLVKP  SETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEK  TYYNPSLKS RATISIDTSK SQFSLKLSSVTAADTAVYYCPRGPT  MIRGVIDSWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPA  TSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN  RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTF  GQGTKVEIK</p>
SEQ ID NO: 25	<p>QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPG  KGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKS RATISIDTSK SQFSLKLSSVTA  ADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGS  GGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQK  PGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV  YYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKGGSEPKSsDKTHTCPPCgggssgg  gsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC  SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>
SEQ ID NO: 26	<p>QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPG  KGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKS RATISIDTSK SQFSLKLSSVTA  ADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGS  GGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQK  PGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV  YYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKGGSEPKSsDKTHTCPPCgggssgg  gsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE  SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC  SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGggggsggsQLQVQESGPGLVKPSE  TSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEKTY  YNPSLKS RATISIDTSK SQFSLKLSSVTAADTAVYYCPRGPTMIR  GVIDSWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSL  SPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RAT  GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQG  TKVEIK</p>
SEQ ID NO: 27	<p>QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPG  KGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKS RATISIDTSK SQFSLKLSSVTA</p>

	ADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKgggssggsgGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDGFLLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
SEQ ID NO: 28	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPG KGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRAATISIDTSKSQFSLKLSVTA ADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKgggssggsgGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDGFLLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGggggsggsQLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNS YFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRAATISIDTS KSQFSLKLSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLVTV SSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQ SVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 29	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGQESMYWVRQAPG KGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKSGTRIKQGFQDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 30	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWVRQAPG KGLEWVSAIEPIGHRITYYANSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKQAPGEKWARRWDLQDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 31	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTDQMWRQAPG KGLEFVSRIDSPGGRTYYANSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKRQAPGVSGKYVDYWGQGTLVTVSS

**[0203]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент к TGFβ или к TGFβR представляет собой антитело. Структурная единица природного антитела млекопитающих представлена тетрамером. Каждый тетрамер состоит из двух пар

полипептидных цепей, каждая из которых имеет одну «легкую» (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа). N-концевая часть каждой цепи включает вариабельную область из около 100-110 или более аминокислот, которая в первую очередь отвечает за распознавание антигена. С-концевая часть каждой цепи определяет константную область, которая в первую очередь отвечает за эффекторную функцию. Легкие цепи человека можно классифицировать как легкие цепи каппа и лямбда. Тяжелые цепи можно классифицировать как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон, а изотип антитела определить как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. В легкой и тяжелой цепях вариабельная и константная области соединены областью «J», состоящей примерно из 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает область «D», состоящая еще примерно из 10 аминокислот. В целом смотрите *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Вариабельные области каждой пары легкая/тяжелая цепь образуют связывающий сайт антитела. Предпочтительными изотипами для молекул антител к TGFβ 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 осуществления молекула антитела к TGFβ имеет изотип IgG1.

**[0204]** Вариабельные области каждой пары тяжелой и легкой цепей образуют сайт связывания антигена. Таким образом, интактное антитело IgG имеет два одинаковых сайта связывания. Однако бифункциональные или биспецифические антитела представляют собой искусственные гибридные конструкции, которые имеют две разные пары тяжелая цепь / легкая цепь, что приводит к двум различным сайтам связывания.

**[0205]** Все цепи имеют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями, также называемыми областями, определяющими комплементарность, или CDR. CDR из двух цепей каждой пары выровнены по каркасным областям, что позволяет связываться со специфическим эпитопом. От N-конца к С-концу как легкие, так и тяжелые цепи включают домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Назначение аминокислот для каждого домена соответствует определениям Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), или Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al. *Nature* 342:878-883 (1989). В контексте данного документа CDR относятся к каждой из тяжелых (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и легких (LCDR1, LCDR2, LCDR3) цепей.

**[0206]** Таким образом, в одном варианте осуществления молекула антитела включает одно или оба из:

**[0207]** (a) одной, двух, трех или другого числа петель связывания антигена из CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3) одной из упомянутых выше человеческих гибридом, выбранных лимфоцитов или мышинных антител. 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

**[0208]** (b) одной, двух, трех или другого числа петель связывания антигена из CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3) одной из упомянутых выше человеческих гибридом, выбранных лимфоцитов или мышинных антител. 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.

**[0209]** В некоторых вариантах осуществления молекула антитела к TGF $\beta$  или молекула антитела к TGF $\beta$ R (например, анти-TGF $\beta$ R2) по настоящему изобретению может вызывать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) в отношении клетки, экспрессирующей TGF $\beta$ , например, опухолевой клетки. Антитела с изотипами IgG1 и IgG3 полезны для проявления эффекторной функции в антителозависимой цитотоксичности благодаря их способности связываться с Fc-рецептором. Антитела с изотипами IgG2 и IgG4 полезны для минимизации ответа ADCC из-за их низкой способности связывать Fc-рецептор. В родственных вариантах осуществления замены в области Fc или изменения в профиле гликозилирования антитела, например, путем выращивания в модифицированной линии эукариотических клеток, могут быть сделаны для повышения способности Fc-рецепторов распознавать, связывать и/или опосредовать цитотоксичность клетки, с которыми связываются антитела к TGF $\beta$  или антитела к TGF $\beta$ R, (например, против TGF $\beta$ R2) (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 TGF $\beta$ , дополнительно описаны в патенте США № 8785600 (Nam et al.), все положения которого включены в данный документ посредством ссылки.

**[0210]** 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.

**[0211]** 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).

**[0212]** 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 TGF $\beta$ , 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)).

**[0213]** В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующая система по настоящему изобретению содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу антитела к TGF $\beta$  или к TGF $\beta$ R, содержащую CDR из молекулы антитела, описанной в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления последовательности из таблицы 1 могут быть включены в молекулы, распознающие TGF $\beta$  или TGF $\beta$ R, для применения в терапевтических способах, описанных в данном документе,

(например, иммуномодулирующая система, иммунореактивные клетки или способы лечения, включающие их). 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 TGF $\beta$ . 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).)

**[0214]** После идентификации CDR и FR клонированного антитела, которые должны быть гуманизированы, идентифицируют аминокислотные последовательности, кодирующие CDR, и соответствующие последовательности нуклеиновых кислот трансплантируют к выбранным FR человека. Это можно сделать с использованием известных праймеров и линкеров, выбор которых известен в данной области техники. Все CDR конкретного антитела человека могут быть заменены по меньшей мере частью CDR нечеловеческого происхождения или только некоторые из CDR могут быть заменены CDR нечеловеческого происхождения. Необходимо только заменить количество CDR, необходимых для связывания гуманизированного антитела с предварительно заданным антигеном. После того, как CDR привиты к выбранным FR человека, полученные «гуманизированные» последовательности переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи экспрессируются с получением гуманизированного Fv или гуманизированного антитела, которое связывается с TGF $\beta$  или TGF $\beta$ R. Предпочтительно антитело с трансплантированным CDR (например, гуманизированное) связывает TGF $\beta$  или TGF $\beta$ R с аффинностью, сходной, по существу такой же или лучшей, чем у донорного антитела. Как правило, гуманизированные переменные последовательности тяжелой и легкой цепи экспрессируют в виде слитого белка с последовательностями константного домена человека, так что получают интактное антитело, которое связывается с TGF $\beta$ . Однако можно получить гуманизированное антитело Fv, не содержащее константных последовательностей.

**[0215]** Также в объем изобретения входят гуманизированные антитела, в которых заменены, удалены или добавлены определенные аминокислоты. 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)).

**[0216]** В некоторых вариантах осуществления молекула антитела к TGF $\beta$  или к TGF $\beta$ R представляет собой человеческое антитело IgG1 к TGF $\beta$  или к TGF $\beta$ R. Поскольку такие антитела обладают желаемым связыванием с молекулой TGF $\beta$  или TGF $\beta$ R, 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.

#### *Одноцепочечные антитела*

**[0217]** В одноцепочечных антителах отсутствуют некоторые или все константные домены полных антител, из которых они получены. Поэтому они могут помочь решить

некоторые проблемы, связанные с использованием полных антител. Например, одноцепочечные антитела, как правило, не подвержены определенным нежелательным взаимодействиям между константными областями тяжелой цепи и другими биологическими молекулами. Кроме того, одноцепочечные антитела значительно меньше, чем полные антитела, и могут иметь большую проникаемость, чем полные антитела, что позволяет одноцепочечным антителам более эффективно локализовать и связываться с мишень-связывающими сайтами. Кроме того, относительно небольшой размер одноцепочечных антител снижает вероятность того, что они вызовут нежелательный иммунный ответ у реципиента, чем полные антитела.

**[0218]** В некоторых вариантах осуществления модуляторы сигналинга TGF $\beta$  представляют собой одноцепочечные антигенсвязывающие молекулы (например, scFv), которые специфически связываются с TGF $\beta$ . В некоторых вариантах осуществления модуляторы сигналинга TGF $\beta$  представляют собой одноцепочечные антигенсвязывающие молекулы (например, scFv), которые специфически связываются с рецептором TGF-B (TGF $\beta$ R) (например, TGF $\beta$ R1, TGF $\beta$ R2).

**[0219]** Множество одноцепочечных антител, каждое из которых имеет один домен VH и один домен VL, ковалентно связанные первым пептидным линкером, могут быть ковалентно связаны по меньшей мере одним или более пептидными линкерами с образованием поливалентных одноцепочечных антител, которые могут быть моноспецифическими или полиспецифическими. Каждая цепь поливалентного одноцепочечного антитела включает переменный фрагмент легкой цепи и переменный фрагмент тяжелой цепи и связана пептидным линкером по меньшей мере с одной другой цепью. Пептидный линкер состоит по меньшей мере из пятнадцати аминокислотных остатков. Максимальное количество аминокислотных остатков линкера составляет примерно сто.

**[0220]** Два одноцепочечных антитела могут быть объединены с образованием диатела, также известного как бивалентный димер. Диатела имеют две цепи и два связывающих сайта и могут быть моноспецифическими или биспецифическими. Каждая цепь диатела включает домен VH, соединенный с доменом VL. Домены соединены с помощью линкеров, которые достаточно короткие, чтобы предотвратить образование пар между доменами в одной и той же цепи, что приводит к образованию пар между комплементарными доменами на разных цепях для восстановления двух антигенсвязывающих сайтов.

**[0221]** Три одноцепочечных антитела могут быть объединены с образованием триател, также известных как трехвалентные тримеры. Триатела конструируют с

аминокислотным концом домена VL или VH, непосредственно слитым с карбоксильным концом домена VL или VH, т.е. без какой-либо линкерной последовательности. Триатело имеет три головы Fv с полипептидами, расположенными циклически, голова к хвосту. Возможная конформация триатела плоская с тремя связывающими сайтами, расположенными в плоскости под углом 120 градусов друг к другу. Триатела могут быть моноспецифическими, биспецифическими или триспецифическими.

#### *Однодоменные антитела*

**[0222]** Однодоменные антитела (sdAb) отличаются от обычных 4-цепочечных антител наличием одиночного вариабельного домена мономерного антитела. Например, верблюдовые и акулы производят sdAb, называемые антителами, состоящими только из тяжелых цепей, (HcAb), в которых, естественно, отсутствуют легкие цепи. Антигенсвязывающий фрагмент в каждом плече антитела, состоящих только из тяжелых цепей, верблюдовых имеет один вариабельный домен тяжелой цепи (VHH), который может иметь высокую аффинность к антигену без необходимости вовлечения легкой цепи. VHH верблюдовых известен как наименьший функциональный антигенсвязывающий фрагмент с молекулярной массой около 15 кДа.

**[0223]** В одном аспекте настоящей заявки предложены выделенные однодоменные антитела (обозначаемые в данном документе как «sdAb к TGFβR»), которые специфически связываются с TGFβR, такими как TGFβR2 человека. В некоторых вариантах осуществления sdAb к TGFβR модулирует активность TGFβ. В некоторых вариантах осуществления sdAb к TGFβ представляет собой антагонистическое антитело. Кроме того, предусмотрены антигенсвязывающие фрагменты, полученные из любого из описанных в данном документе sdAb к TGFβR, и антигенсвязывающие белки, содержащие любое из sdAb к TGFβR, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления sdAb к TGFβR содержат одну, две и/или три последовательности CDR, указанные в таблице 1. Примеры sdAb к TGFβR представлены в таблице 1.

**[0224]** В некоторых вариантах осуществления некоторые или все последовательности CDR тяжелой цепи можно использовать в другом антигенсвязывающем агенте, например, в гуманизированной или химерной молекуле антитела с трансплантированным CDR. Варианты осуществления включают молекулу антитела, которая содержит достаточное количество CDR, например, все три CDR из одной из указанных выше вариабельных областей тяжелой цепи, чтобы обеспечить связывание с TGFβ.

**[0225]** 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.

**[0226]** В некоторых вариантах осуществления модуляторы TGF $\beta$  по настоящему изобретению содержат аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи, указанную в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие агенты к TGF $\beta$  представляют собой однодоменные антитела, содержащие только тяжелую цепь, (например, антигенсвязывающие агенты, которые не содержат легкую цепь иммуноглобулина).

**[0227]** 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, фосфатидилэтаноламиновую 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.

*Внеклеточный домен TGFβR*

**[0228]** Рецепторы TGF-β, предполагаемые для применения в иммуномодулирующей системе, описанной в данном документе, могут представлять собой любой рецептор TGF-β, включая рецепторы из семейства активин-подобных киназ (ALK), семейства костных морфогенетических белков (BMP), семейства белков Nodal, семейства факторов роста и дифференцировки (GDF) и семейства рецепторов TGF-β. Рецепторы TGF-β представляют собой рецепторы серин/треонинкиназы, которые влияют на различные пути роста и дифференцировки в клетке. В некоторых вариантах осуществления модулятор сигналинга TGFβ представляет собой сконструированный рекомбинантный внеклеточный домен (ВКД) рецептора TGFβ (например, TGFβR1, TGFβR2). В некоторых вариантах осуществления рецептор TGF-β, полезный для иммуномодулирующей системы, описанной в данном документе, представляет собой рецептор TGF-β типа II (например, TGF-βR2).

**[0229]** В некоторых вариантах осуществления модулятор TGFβ содержит TGFβR, представленный в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления модулятор TGFβ содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью, указанной в таблице 2.

*Таблица 2. Иллюстративные внеклеточные домены TGFβR*

<p>SEQ ID NO: 32 mTGFbR2ECD (I24-K31,F57-L185)</p>	<p>IPPHVPKSDVEMEAQKDA SIHLSCNRTIHPLKHFNSDV MASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSI TAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYHG FTLEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYI IFSEEYTTSSPDL</p>
<p>SEQ ID NO: 33 huTGFbR1+2 ECD v1</p>	<p>LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMC IAEIDLIPDRPFVCA PSSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIEL PTTVKSSPGLGPVEGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDN NGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEK PQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDA ASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNT SNPD [hTGFbR1-ECD(L34-E125)- hTGFbR2-ECD(A44-D151)]</p>
<p>SEQ ID NO: 34 huTGFbR1+2 ECD v2</p>	<p>QCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCI AEIDLIPDRPFVCA PSSKTGSVTTTYCCNQDHCNNGGG</p>

	<p>GSAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKP  QEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA  SPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSE  [hTGFbR1-ECD(Q35-N107)-4GS- 4GS-hTGFbR2-  ECD(L34-E125)]</p>
<p>SEQ ID NO: 35  mTGFbR1+2 ECD v1</p>	<p>LQCFCHLCTKDNFTCETDGLCFVSVTETTDKVIHNSMC  IAEIDLIPRDRPFVCAPSSKTGAVTTTYCCNQDHCNKIE  LPTTGPFSEKQSAGLGPVELGGGGSIPPHVPKSVNSDV  MASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSI  TAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHG  FTLEDAASPCKVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYI  IFSEEYTTSSPD  [mTGFbR1-ECD(L30-L126)-4GS-mTGFbR2-ECD(I24-  K31,F57-D184)]</p>
<p>SEQ ID NO: 36  huTGFbR1+2 ECD v2</p>	<p>QCFCHLCTKDNFTCETDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCI  AEIDLIPRDRPFVCAPSSKTGAVTTTYCCNQDHCNNGGG  GSAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEK  PHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDA  ASPCKVMKE  [mTGFbR1-ECD(Q31-N107)-4GS-mTGFbR2-ECD(I24-  K31,F57-E150)]</p>
<p>SEQ ID NO: 37  ВКД TGFbR2 мыши с IgK<sub>ss</sub></p>	<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKD  ASIHLSNRTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKF  CDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRK  NDKNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPCKVMKEKK  RAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDL</p>
<p>SEQ ID NO: 38  Димер ВКД TGFbR2 мыши с  линкером 8(G4S) и IgK<sub>ss</sub> с  <b>меткой Flag</b></p>	<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKD  ASIHLSNRTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKF  CDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRK  NDKNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPCKVMKEKK  RAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDLGGGGS  GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGI  PPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSNRTIHPLKHFNSDVM  ASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSIT</p>

	AICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLYHGF TLEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYII FSEEYTTSSPDLGGGGS <b>DYKDDDDK</b>
--	--

### Химерные антигенные рецепторы

**[0230]** В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложена иммуномодулирующая система, содержащая модуляторы сигналинга TGF- $\beta$  (например, полипептиды, которые модулируют сигналинг TGF- $\beta$ , или последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды, которые модулируют сигналинг TGF- $\beta$ ) и химерный антигенный рецептор (CAR), который может связываться с представляющим интерес антигеном. 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 некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению содержат от N-конца к С-концу сигнальный или лидерный пептид, антигенсвязывающий домен, трансмембранный и/или шарнирный домен, костимулирующий домен и внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления CAR представляют собой «CAR первого поколения», например, включают те, которые обеспечивают исключительно сигналы CD3 $\zeta$  при связывании антигена, CAR «второго поколения» включают те, которые обеспечивают как костимуляцию (например, CD28 или CD137), так и активацию (CD3 $\zeta$ ). CAR «третьего поколения» включают те, которые обеспечивают множественную костимуляцию (например, CD28 и CD137) и активацию (CD3). В различных вариантах осуществления выбран CAR, обладающий высокой аффинностью или авидностью в отношении антигена.

**[0231]** Антигенсвязывающий мотив CAR, как правило, создается по образцу одноцепочечного вариабельного 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). Альтернативные клетки-мишени для экспрессии CAR (такие как НК или гамма-дельта Т-клетки) также находятся в стадии разработки (Brown C E et al. *Clin Cancer Res*. 2012; 18(8):2199-209; Lehner M et al. *PLoS One*. 2012; 7 (2):e31210).

**[0232]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR представляет собой однодоменное антитело. В некоторых вариантах осуществления CAR содержат от N-конца к C-концу сигнальный или лидерный пептид, vH, трансмембранный и шарнирный домен CD28, костимулирующий домен CD28 и внутриклеточный домен CD3-дзета.

**[0233]** Связывающие мотивы CAR могут представлять собой относительно стабильный структурный домен, такой как константный домен IgG, или могут быть разработаны в качестве удлиненного гибкого линкера. 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 дисиалоганглиозида GD2; Orentas et al., неопубликованные наблюдения). На сегодняшний день сигнальные мотивы, используемые в CAR, всегда включают цепь CD3- $\zeta$ , поскольку этот основной мотив является ключевым сигналом для активации Т-клеток. Первые зарегистрированные CAR второго поколения содержали сигнальные домены CD28 и трансмембранную последовательность CD28. Этот мотив также использовали в CAR третьего поколения, содержащих сигнальные мотивы CD137 (4-1BB) (Zhao Y et al. *J Immunol.* 2009; 183 (9): 5563-74). С появлением новых технологий активация Т-клеток частицами, связанными с антителом к CD3 и к CD28, и наличие канонического «сигнала 2» от CD28 больше не требовалось, чтобы он был закодирован самим CAR. Было обнаружено, что с помощью активации частиц векторы третьего поколения не превосходят векторы второго поколения в анализах *in vitro*, и они не давали явных преимуществ по сравнению с векторами второго поколения в мышинных моделях лейкоза (Haso W, Lee D W, Shah N N, Stetler-Stevenson M, Yuan C M, Pastan I H, Dimitrov D S, Morgan R A, FitzGerald D J, Barrett D M, Wayne A S, Mackall C L, Orentas R J. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B cell precursor acute lymphoblastic leukemia, *Blood.* 2013; 121 (7):1165-74; Kochenderfer J N et al. *Blood.* 2012; 119 (12):2709-20). Это подтверждается клиническим успехом CD19-специфических CAR, которые имеют сигнальный формат CD28/CD3- $\zeta$  (Lee D W et al. American Society of Hematology Annual Meeting. New Orleans, La.; Dec. 7-10, 2013) и CD137/CD3- $\zeta$  второго поколения (Porter D L et al. *N Engl J Med.* 2011; 365 (8): 725-33). В дополнение к CD137, другие члены суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, такие как OX40, также способны обеспечивать важные устойчивые сигналы в трансдуцированных CAR Т-клетках (Yvon E et al. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(18):5852-60). Не

менее важными являются условия культивирования, в которых культивировали популяции CAR T-клеток.

**[0234]** Характеристики CAR включают в себя их способность перенаправлять T-клеточную специфичность и реактивность к выбранной мишени не рестриктированным по MHC образом, и использование антигенсвязывающих свойств моноклональных антител. Не рестриктированное по MHC распознавание антигена дает T-клеткам, экспрессирующим CAR, способность распознавать антиген независимо от процессинга антигена, таким образом обходя основной механизм ускользания опухоли от иммунологического ответа. Более того, при экспрессии в T-клетках CAR преимущественно не димеризуются с эндогенными альфа- и бета-цепями T-клеточного рецептора (TCR).

#### *Внеклеточный домен*

**[0235]** Как описано в данном документе, CAR содержит специфический для мишени связывающий элемент, иначе называемый антигенсвязывающим доменом или фрагментом. Выбор домена зависит от типа и количества лигандов, которые определяют поверхность целевой клетки. Например, антигенсвязывающий домен может быть выбран для распознавания лиганда (например, ракового антигена), который действует как маркер клеточной поверхности на клетках-мишенях, связанных с конкретным болезненным состоянием (например, злокачественным новообразованием). Таким образом, примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут действовать как лиганды для антигенсвязывающего домена в CAR, включают маркеры, связанные с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями, аутоиммунными заболеваниями и раковыми клетками.

**[0236]** В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CAR содержит антигенсвязывающий агент, который специфически связывается с раковым антигеном. В некоторых вариантах осуществления CAR связывается с опухолевым антигеном. Любой опухолевый антиген (антигенный пептид) можно использовать в вариантах осуществления, связанных с опухолью, описанных в данном документе. Источники антигена включают, но не ограничиваются ими, раковые белки. Антиген может быть экспрессирован в виде пептида или интактного белка или его части. Интактный белок или его часть могут быть нативными или подвергнутым мутагенезу. Неограничивающие примеры опухолевых антигенов включают карбоангидразу IX (CA1X), карциноэмбриональный антиген (CEA), CD8, CD7, CD 10, CD 19, CD20, CD22, CD30, CD33, CLL1, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, CD123, CD44V6, антиген инфицированной цитомегаловирусом (CMV) клетки (например, антиген клеточной поверхности), эпителиальный гликопротеин-2 (EGP-2), эпителиальный гликопротеин-40 (EGP-40),

молекула адгезии эпителиальных клеток (EpcAM), рецепторные тирозин-протеинкиназы erb-B2,3,4 (erb-B2,3,4), фолат-связывающий белок (FBP), фетальный ацетилхолиновый рецептор (AChR), фолатный рецептор-альфа, ганглиозид G2 (GD2), ганглиозид G3 (GD3), гуанилатциклазу C (GCC), рецептор эпидермального фактора роста человека 2 (ITER-2), обратную транскриптазу теломеразу человека (hTERT), субъединицу альфа-2 рецептора интерлейкина-13 (IL-13R $\alpha$ 2), каппа-легкую цепь, рецептор с доменом, содержащим киназную вставку, (KDR), антиген Льюис Y (LeY), молекулу клеточной адгезии L1, (L1CAM), melanoma antigen family A, 1 (MAGE-A1), муцин 16 (MUC16), муцин 1 (MUC1), мезотелин (MSLN), ERBB2, MAGEA3, p53, MART1, GPI00, протеиназу 3 (PR1), тирозиназу, сурвивин, hTERT, EphA2, лиганды NKG2D, раково-тестикулярный антиген NY-ES0-1, онкофетальный антиген (h5T4), антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), простатспецифический мембранный антиген (PSMA), PTK7 ROR1, опухолеассоциированный гликопротеин 72 (TAG-72), рецептор 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-R2), и белок опухоли Вильмса (WT-1), BCMA, NKCS1, EGF1R, EGFR-VIII, CD99, CD70, ADGRE2, CCR1, LILRB2, PRAME CCR4, CD5, CD3, TRBC1, TRBC2, TIM-3, интегрин B7, ICAM-1, CD70, Tim3, CLEC12A и ERBB.

**[0237]** В определенных вариантах осуществления CAR связывается с полипептидом CD19. В определенных вариантах осуществления CAR связывается с полипептидом CD19 человека. В определенных вариантах осуществления CAR связывается с внеклеточным доменом белка CD19. В определенных вариантах осуществления CAR к CD19 содержит последовательность, указанную в таблице 3.

**[0238]** В определенных вариантах осуществления CAR связывается с полипептидом GCC. В определенных вариантах осуществления CAR связывается с полипептидом GCC человека. В определенных вариантах осуществления CAR связывается с внеклеточным доменом белка GCC. В определенных вариантах осуществления CAR к GCC содержит последовательность, указанную в таблице 3.

**[0239]** В определенных вариантах осуществления CAR связывается с полипептидом мезотелина. В определенных вариантах осуществления CAR связывается с полипептидом мезотелина человека. В определенных вариантах осуществления CAR связывается с внеклеточным доменом белка мезотелина.

**[0240]** В определенных вариантах осуществления CAR связывается с патогенным антигеном, например, для применения в лечении и/или предупреждении патогенной инфекции или другого инфекционного заболевания, например, у субъекта с ослабленным иммунитетом. Неограничивающие примеры патогена включают вирус, бактерию, грибок, паразит и простейшее, которые способны вызывать заболевание.

**[0241]** Неограничивающие примеры вирусов включают *Retroviridae* (например, вирусы иммунодефицита человека, такие как HIV-1 (также называемый HDTV-III, LAV или HTLV-IIELAV, или HIV-III; и другие изоляты, такие как HIV-LP; пикорнавирусы (например, вирусы полиомиелита, вирус гепатита А, энтеровирусы, вирусы Коксаки человека, риновирусы, эховирусы); *Calciviridae* (например, штаммы, вызывающие гастроэнтерит); *Togaviridae* (например, вирусы энцефалита лошадей, вирус краснухи); *Flaviridae* (например, вирус денге, вирусы энцефалита, вирус желтой лихорадки); *Coronaviridae* (например, коронавирусы); *Rhabdoviridae* (например, вирусы везикулярного стоматита, вирус бешенства); *Filoviridae* (например, вирусы Эбола); *Paramyxoviridae* (например, вирусы парагриппа, вирус эпидемического паротита, вирус кори, респираторно-синцитиальный вирус); *Orthomyxoviridae* (например, вирусы гриппа); *Bungaviridae* (например, хантавирус, бунгавирусы, флебовирусы и наировирусы); *Arenaviridae* (вирусы геморрагической лихорадки); *Reoviridae* (например, реовирусы, орбивирусы и ротавирусы); *Birnaviridae*, *Hepadnaviridae* (вирус гепатита В); *Parvoviridae* (парвовирусы); *Papovaviridae* (папилломавирусы, полиомавирусы); *Adenoviridae* (большинство аденовирусов); *Herpesviridae* (вирус простого герпеса (HSV) 1 и 2, вирус ветряной оспы, цитомегаловирус (CMV), вирус герпеса); *Poxviridae* (вирус натуральной оспы, вирус коровьей оспы, вирусы оспы); и *Iridoviridae* (например, вирус африканской чумы свиней); и неклассифицированные вирусы (например, возбудитель дельта-гепатита (считается дефектным сателлитом вируса гепатита В), возбудители гепатита ни А, ни В (класс 1 = внутриутробно; класс 2 = передающиеся парентерально (т. гепатит С); Норфолк и родственные вирусы, а также астровирусы).

**[0242]** Неограничивающие примеры бактерий включают *Pasteurella*, *Staphylococci*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, виды *Pseudomonas* и виды *Salmonella*. Конкретные примеры инфекционных бактерий включают, но не ограничиваются ими, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* sp. (например, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* группы А), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* группы В), *Streptococcus* (группа *viridans*), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (анаэробные виды), *Streptococcus pneumoniae*, патогенные виды *Campylobacter*, *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus*

moniliformis, Treponema palladium, Treponema pertenue, Leptospira, Rickettsia, и Actinomyces israelii.

**[0243]** В определенных вариантах осуществления патогенный антиген представляет собой вирусный антиген, присутствующий в цитомегаловирусе (CMV), вирусный антиген, присутствующий в вирусе Эпштейна-Барра (EBV), вирусный антиген, присутствующий в вирусе иммунодефицита человека (HIV), или вирусный антиген, присутствующий в вирусе гриппа.

**[0244]** В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CAR содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер включает GGGGS (SEQ ID NO: 59). В некоторых вариантах осуществления линкер включает (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 59), где n равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10. В некоторых вариантах осуществления линкер включает GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 61).

**[0245]** В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит антитело IgA, антитело IgG, антитело IgE, антитело IgM, би- или полиспецифическое антитело, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, фрагмент Fd', фрагмент Fd, выделенные CDR или их набор; одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), слитую молекулу полипептид-Fc, однодоменное антитело (sdAb), верблюжье антитело; маскированное антитело, малые модульные иммунофармацевтические препараты («SMIPTM»), одиночную цепь, тандемное диатело, VHH, антикалин, наноантитело, Humabody, миниантитело, BiTE, белки с анкириновыми повторами, DARPIN, авимер, DART, TCR-подобное антитело, аднектин, аффилин, транс-тело; аффитело, TrimerX, микропротеин, финомер, центирин; и KALBITOR, или их фрагменты.

**[0246]** В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR содержит однодоменное антитело (sdAb). В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело (sdAb),

#### *Трансмембранный домен*

**[0247]** Как описано в данном документе, CAR содержит трансмембранный домен. Что касается трансмембранного домена, CAR содержит один или более трансмембранных доменов, слитых с внеклеточным антигенсвязывающим доменом 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.

**[0248]** Трансмембранные области для конкретного применения в описанных в данном документе CAR могут происходить из (т.е. включать по меньшей мере трансмембранную(-ые) область(-и)) альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, мезотелина, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. 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.

**[0249]** 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.

**[0250]** В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен в CAR по настоящему изобретению представляет собой трансмембранный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD28 включает последовательность нуклеиновой кислоты FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CD28 содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен включает последовательность, которая имеет по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 20, 10 или 5 модификаций (например, замен) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42, или последовательность, которая имеет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 42.

**[0251]** В CAR спейсерный домен, также называемый шарнирным доменом, может быть расположен между внеклеточным доменом и трансмембранным доменом или между внутриклеточным доменом и трансмембранным доменом. Спейсерный домен означает

любой олигопептид или полипептид, который служит для связывания трансмембранного домена с внеклеточным доменом и/или трансмембранного домена с внутриклеточным доменом. Спейсерный домен содержит до 300 аминокислот, предпочтительно от 10 до 100 аминокислот и наиболее предпочтительно от 25 до 50 аминокислот.

**[0252]** В некоторых вариантах осуществления линкер может включать спейсерный элемент, который, если он присутствует, увеличивает размер линкера, так что расстояние между эффекторной молекулой или обнаруживаемым маркером и антителом или антигенсвязывающим фрагментом увеличивается. Иллюстративные спейсеры известны специалистам и включают те, которые перечислены в патентах США №№ 7964566, 7498298, 6884869, 6323315, 6239104, 6034065, 5780588, 5665860, 5663149, 5635483, 5599902, 5554725, 5530097, 5521284, 5504191, 5410024, 5138036, 5076973, 4986988, 4978744, 4879278, 4816444, и 4486414, а также в публикациях патента США №№ 20110212088 и 20110070248, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

**[0253]** Спейсерный домен предпочтительно имеет последовательность, которая способствует связыванию CAR с антигеном и усиливает сигналинг в клетку. Примеры аминокислот, которые, как ожидается, будут способствовать связыванию, включают цистеин, заряженную аминокислоту, а также серин и треонин в потенциальном сайте гликозилирования, и эти аминокислоты можно использовать в качестве аминокислот, составляющих спейсерный домен.

**[0254]** В некоторых вариантах осуществления CAR содержит шарнирный домен. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает последовательность нуклеиновой кислоты IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKP (SEQ ID NO: 41). В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает последовательность, которая имеет по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 20, 10 или 5 модификаций (например, замен) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41, или последовательность с 95-99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 41.

**[0255]** В некоторых вариантах осуществления шарнирный и трансмембранный домены получены из одной и той же молекулы. В других вариантах осуществления шарнирный и трансмембранный домены получены из разных молекул (например, CD8, слитый с CD28). В некоторых вариантах осуществления CAR содержит шарнирный домен. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает последовательность

IEVMYPPPYLDNEKSNGTPIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFPIFWV (SEQ ID NO: 43). В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает последовательность, имеющую по меньшей мере одну, две или три модификации (например, замены), но не более 20, 10 или 5 модификаций (например, замен) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43.

### *Внутриклеточный домен*

**[0256]** 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.

**[0257]** 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).

**[0258]** Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности регулируют первичную активацию комплекса TCR стимулирующим образом или ингибирующим образом. Первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют стимулирующим образом, могут содержать сигнальные мотивы, известные как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM. Примеры ITAM, содержащие первичные цитоплазматические сигнальные последовательности, которые особенно применимы в описанных в данном документе CAR, включают последовательности, полученные из TCR-дзета (CD3-дзета), FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. Конкретные неограничивающие примеры ITAM включают пептиды, имеющие последовательности аминокислот с номерами от 51 до 164 CD3-дзета. (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--932170.1), аминокислот с номерами с 45 по 86 в Fc-эпсилон RI-гамма. (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--004097.1), номера аминокислот с 201 по 244 в Fc-эпсилон RI-бета. (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--000130.1), номера аминокислот с 139 по 182 в CD3-гамма. (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--000064.1), номера аминокислот с 128 по 171 в CD3-дельта. (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--000723.1), номера аминокислот с 153 по 207 в CD3-эпсилон. (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--000724.1), аминокислот с номерами с 402 по 495 в CD5 (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--055022.2), аминокислот с номерами с 707 по 847 в 0022 (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--001762.2), аминокислот с номерами с 166 по 226 в CD79a (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--001774.1), аминокислот с номерами с 182 по 229 в CD79b (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--000617.1), и аминокислот с номерами с 177 по 252 в CD66d (эталонная последовательность NCBI: NP.sub.--001806.2), и их вариантов, обладающих той же функцией, что и эти пептиды. Номер аминокислоты, основанный на информации об аминокислотной последовательности идентификатор эталонной последовательности NCBI или GenBank, описанной в данном документе, нумеруется на основе полной длины предшественника (содержащего последовательность сигнального пептида и т. д.) каждого белка. В одном варианте осуществления цитоплазматическая сигнальная молекула в CAR содержит цитоплазматическую сигнальную последовательность, полученную из CD3-дзета.

**[0259]** В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR может быть сконструирован так, чтобы содержать сигнальный домен CD3-дзета сам по себе или в сочетании с любым другим желаемым цитоплазматическим доменом(-ами), применимыми в контексте CAR. Например, внутриклеточный домен CAR может содержать часть дзета-цепи CD3 и костимуляторную сигнальную область. Костимулирующая сигнальная область относится к части CAR, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимуляторная молекула представляет собой молекулу клеточной поверхности, отличную от рецептора антигена или их лигандов, которая необходима для эффективного ответа лимфоцитов на антиген. К примерам подобных костимулирующих молекул относятся CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, связанный с функцией лимфоцитов антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и лиганд, который специфически связывается с CD83, и т. п. Конкретные неограничивающие примеры таких костимулирующих молекул включают пептиды, имеющие последовательности аминокислот с номерами с 236 по 351 в CD2 (эталонная последовательность NCBI: NP--001758.2), аминокислот с номерами с 421 по 458 в CD4 (эталонная последовательность NCBI: NP 000607.1), аминокислот с номерами с 402 по 495 в CD5 (эталонная последовательность NCBI: NP--055022.2), аминокислот с номерами с 207 по 235 в CD8-альфа. (эталонная последовательность NCBI: NP--001759.3), аминокислот с номерами с 196 по 210 в CD83 (GenBank: AAA35664.1), аминокислот с номерами с 181 по 220 в CD28 (эталонная последовательность NCBI: NP--006130.1), аминокислот с номерами с 214 по 255 в CD137 (4-1BB, эталонная последовательность NCBI: NP--001552.2), аминокислот с номерами с 241 по 277 в CD134 (OX40, эталонная последовательность NCBI: NP--003318.1) и аминокислот с номерами с 166 по 199 в ICOS (эталонная последовательность NCBI: NP--036224.1), и их вариантов, обладающих той же функцией, что и эти пептиды. Таким образом, несмотря на то, что в качестве примера в данном документе приводится 4-1BB в качестве костимулирующего сигнального элемента, другие костимулирующие элементы входят в объем изобретения.

**[0260]** Цитоплазматические сигнальные последовательности внутри цитоплазматической сигнальной части CAR могут быть связаны друг с другом в случайном или заданном порядке. Необязательно, связь может образовывать короткий олиго- или полипептидный линкер, предпочтительно длиной от 2 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой глицин-сериновый дублет или линкер из трех аланинов.

**[0261]** В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит костимулирующий сигнальный домен CD28. В некоторых вариантах осуществления

внутриклеточный домен CAR включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 44).

**[0262]** В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD28.

**[0263]** В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит CD3-дзета с одним или более модифицированными иммунорецепторными тирозиновыми активирующими мотивами (ITAM). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит CD3-дзета с немодифицированным первым из трех иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов (ITAM) и измененными вторым и третьим ITAM, названными «1XX». В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEG LFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 45)

**[0264]** В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, содержащий модифицированный полипептид CD3z (например, модифицированный полипептид CD3z человека), содержащий нативный ITAM1, нативный BRS1, нативный BRS2, нативный BRS3, вариант ITAM2 с двумя мутациями с потерей функции и вариант ITAM3 с двумя мутациями с потерей функции, и костимулирующую сигнальную область, содержащую полипептид CD28 (например, полипептид CD28 человека).

**[0265]** В еще одном варианте осуществления внутриклеточный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен 4-1BB. В еще одном варианте осуществления внутриклеточный домен содержит сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD28 и 4-1BB.

**[0266]** В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR содержит сигнальный домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета.

**[0267]** В некоторых вариантах осуществления CAR содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в таблице.

3.

*Таблица 3. Иллюстративные химерные антигенные рецепторы*

	Последовательность
--	--------------------

Anti-CD19 CAR	<p>MGTSLLCWMALCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISC  KASGYAFSSSWMNWVKQRPGKLEWIGRIYPGDEDTNYSGKFK  DKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSLLYGDYLDYW  GQGTTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVT  MTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPDRFSGS  GSGTSYFLTINMEAEADAATYYCQQWNINPLTFGAGTKLELKRS  DPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC  DIFWVLWVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSLLHSDYMNMT  PRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKPPGGGSFRT  PIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR  REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA  YSEIGMKGERRRGKGHGDL YQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR  (SEQ ID NO: 49)</p>
CAR к CD19 мышь	<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTGEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKA  SGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKG  QATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDY  WGQTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDR  VSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRF  TGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIK  IEFMYPPPYLDNERSNGTIIHIKEKHLCHTQSSPKLFWALVVVAGV  LFCYGLLVTVALCVIWTNSRRNLLQSDYMNMTPRRPGLTRKPY  <u>QPYAPA</u>  <u>RDFAAYRPRAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLE</u>  KKRARDPEMGGKQQRRRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTK  GERRRGKGHGDL YQGLSTATKDTYDALHMQLAPR (SEQ ID NO:  62)</p>
CAR к CD19 человека (с CD3- 1xx)	<p>MALPVTALLLPLALLLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGY  AFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQAT  LTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWG  QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVS  VTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTG  SGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRA  AAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLV  VGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSLLHSDYMNMTPRRPGP  TRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL</p>

	NLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKM AEAFSEIGMKGERRRGKGDGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPP R (SEQ ID NO: 63)
CAR κ GCC V1- 01	MGWSCILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG ASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSV DTPKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRG TLVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPR RPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQK DKMAEAFSEIGMKGERRRGKGDGLFQGLSTATKDTFDALHMQ ALPPR (SEQ ID NO: 47)
CAR κ GCC V51	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGR FTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDNKDYWGQGT LVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVK FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEM GGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGDGL FQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 48)
CAR κ GCC V5	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS GFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGR FTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGT AVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPS KPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGD GLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 50)
CAR κ GCC V36	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAAS GFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGR FTISRDNANKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTRDNKDYWGQGT LVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPS

	<p>KPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV</p> <p>RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS</p> <p>RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP</p> <p>EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH</p> <p>DGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 51)</p>
CAR <sub>к</sub> GCC V1	<p>MGWSCIIIFLVATATGVHSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG</p> <p>ASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSrvAMSV</p> <p>DTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRG</p> <p>TLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP</p> <p>PSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM</p> <p>NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQG</p> <p>QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP</p> <p>EMGGKPRRKNPQEGLF</p> <p>NELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH</p> <p>DGLFQGLSTATKDTFD</p> <p>ALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 52)</p>
CAR <sub>к</sub> GCC V48	<p>MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLTCAAS</p> <p>GFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYPDSVKGR</p> <p>FTVSRDNAKNSLYLQMDNLRAEDTAMYCYTRDYNKDLWGQGT</p> <p>LVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP</p> <p>PSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV</p> <p>RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS</p> <p>RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP</p> <p>EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH</p> <p>DGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 53)</p>
CAR <sub>к</sub> GCC V8	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGK</p> <p>GLEWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSVYLQMNSL</p> <p>RAEDTGYYCATDFTRDVWGQGT</p> <p>TVTVSS</p> <p>RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP</p> <p>PSKPFW</p> <p>VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV</p> <p>RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS</p> <p>RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP</p> <p>EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH</p> <p>DGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: 54)</p>
CAR <sub>к</sub> GCC V9	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGR</p> <p>GLEWVAKIRYDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL</p> <p>RAEDTAVYYCATDFTRDVWGQGT</p> <p>TVTVSS</p>

	RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFW VLVVGGV LACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 55)
CAR к GCC V30	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFNFGRYWMSWVRQAPGK GREWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCATDFTRDVWGQGT TTVTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFW VLVVGGV LACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 56)
CAR к GCC V31	QVQLVESGGGVVRP GGSLRLS CAASGFTFSRYWMSWVRQAPGK GREWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSL RADDTAVYYCATDFTRDVWGQGT TTVTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFW VLVVGGV LACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 57)

*Функциональные особенности CAR*

**[0268]** Также в объем изобретения явно включены функциональные части описанных в данном документе CAR. Термин «функциональная часть» при использовании в отношении CAR относится к любой части или фрагменту одного или более CAR, описанных в данном документе, причем часть или фрагмент сохраняет биологическую активность CAR, частью которого он является (исходный CAR). Функциональные части охватывают, например, те части CAR, которые сохраняют способность распознавать клетки-мишени или обнаруживать, лечить или предотвращать заболевание в такой же степени, в той же степени или в большей степени, чем исходный CAR. Что касается

исходного CAR, функциональная часть может составлять, например, около 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% или более исходного CAR.

**[0269]** Функциональная часть может содержать дополнительные аминокислоты на N- или C-конце части или на обоих концах, при этом дополнительные аминокислоты не встречаются в аминокислотной последовательности исходного CAR. Желательно, чтобы дополнительные аминокислоты не мешали биологической функции функциональной части, например, распознавать клетки-мишени, обнаруживать злокачественное новообразование, лечить или предотвращать злокачественное новообразование и т. д. Более желательно, чтобы дополнительные аминокислоты повышали биологическую активность по сравнению с биологической активностью исходного CAR.

**[0270]** В объем настоящего изобретения включены функциональные варианты CAR, описанные в данном документе. Термин «функциональный вариант», используемый в данном документе, относится к CAR, полипептиду или белку, обладающему существенной или значимой идентичностью или сходством последовательности с исходным CAR, при этом функциональный вариант сохраняет биологическую активность CAR, вариантом которого он является. Функциональные варианты охватывают, например, те варианты CAR, описанные в данном документе (исходный CAR), которые сохраняют способность распознавать клетки-мишени в такой же степени, в той же степени или в большей степени, что и исходный CAR. Что касается исходного CAR, функциональный вариант может, например, быть по меньшей мере приблизительно на 30%, 50%, 75%, 80%, 90%, 98% или более идентичным по аминокислотной последовательности с исходным CAR.

**[0271]** Функциональный вариант может, например, содержать аминокислотную последовательность исходного CAR с по меньшей мере одной консервативной аминокислотной заменой. Альтернативно или дополнительно функциональные варианты могут содержать аминокислотную последовательность исходного CAR с по меньшей мере одной неконсервативной аминокислотной заменой. В этом случае предпочтительно, чтобы неконсервативная аминокислотная замена не мешала или не подавляла биологическую активность функционального варианта. Неконсервативная аминокислотная замена может усиливать биологическую активность функционального варианта таким образом, что биологическая активность функционального варианта увеличивается по сравнению с исходным CAR.

**[0272]** Аминокислотные замены CAR предпочтительно представляют собой консервативные аминокислотные замены. Консервативные аминокислотные замены известны в данной области техники и включают аминокислотные замены, при которых одну аминокислоту, имеющую определенные физические и/или химические свойства,

заменяют на другую аминокислоту, обладающую такими же или аналогичными химическими или физическими свойствами. Например, консервативная замена аминокислоты может представлять собой кислую/отрицательно заряженную полярную аминокислоту, замененную на другую кислую/отрицательно заряженную полярную аминокислоту (например, Asp или Glu), аминокислоту с неполярной боковой цепью, замененную на другую аминокислоту с неполярной боковой цепью (например, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Cys, Val, и т.д.), основную/положительно заряженную полярную аминокислоту, замененную на другую основную/положительно заряженную полярную аминокислоту (например, Lys, His, Arg, и т.д.), незаряженную аминокислоту с полярной боковой цепью, замененную на другую незаряженную аминокислоту с полярной боковой цепью (например, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr и т. д.), аминокислоту с бета-разветвленной боковой цепью, замененную на другую аминокислоту с бета-разветвленной боковой цепью (например, Ile, Thr и Val), аминокислоту с ароматической боковой цепью, замененную на другую аминокислоту с ароматической боковой цепью (например, His, Phe, Trp и Tyr) и т. д.

**[0273]** CAR могут состоять по существу из указанной аминокислотной последовательности или последовательностей, описанных в данном документе, так что другие компоненты, например, другие аминокислоты, существенно не изменяют биологическую активность функционального варианта.

**[0274]** CAR (включая функциональные части и функциональные варианты) могут быть любой длины, т. е. могут содержать любое количество аминокислот, при условии, что CAR (или их функциональные части или функциональные варианты) сохраняют свою биологическую активность, например, способность специфически связываться с антигеном, обнаруживать пораженные клетки у млекопитающего или лечить или предотвращать заболевание у млекопитающего и т. д. Например, CAR может иметь длину от около 50 до около 5000 аминокислот, например 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 и более аминокислот в длину.

**[0275]** CAR (включая функциональные части и функциональные варианты по изобретению) могут содержать синтетические аминокислоты вместо одной или более природных аминокислот. Такие синтетические аминокислоты известны в данной области техники и включают, например, аминокислоты циклогексанкарбоновую кислоту, норлейцин,  $\alpha$ -амино-*n*-декановую кислоту, гомосерин, S-ацетиламинометилцистеин, транс-3- и транс-4-гидроксипролин, 4-аминофенилаланин, 4-нитрофенилаланин, 4-хлорфенилаланин, 4-карбоксифенилаланин,  $\beta$ -фенилсерин  $\beta$ -гидроксифенилаланин, фенилглицин,  $\alpha$ -нафтилаланин, циклогексилаланин, циклогексилглицин, индолин-2-карбоновую кислоту,

1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3- карбоновую кислоту, аминомалоновую кислоту, моноамид аминомалоновой кислоты, N<sup>1</sup>-бензил-N<sup>1</sup>-метиллизин, N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>-дибензиллизин, 6-гидроксилизин, орнитин, -аминоциклопентанкарбоновую кислоту, α-аминоциклогексанкарбоновую кислоту, α-аминоциклогептанкарбоновую кислоту, α-(2-амино-2-норборнан)-карбоновую кислоту, γ-диаминомасляную кислоту, β-диаминопропионовую кислоту, гомофенилаланин и α-трет-бутилглицин.

**[0276]** CAR (включая функциональные части и функциональные варианты) могут быть гликозилированы, амидированы, карбоксилированы, фосфорилированы, этерифицированы, N-ацилированы, циклизованы, например, через дисульфидный мостик, или превращены в кислотно-аддитивную соль и/или необязательно димеризованы или полимеризованы, или конъюгированы.

#### *Замены и варианты*

**[0277]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рассматриваются варианты аминокислотных последовательностей антител, предложенных в настоящем документе. Например, может быть желательно улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела могут быть получены путем введения соответствующих модификаций в последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Любая комбинация делеции, вставки и замены может быть использована для получения конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками, например, антигенсвязывающими характеристиками.

#### а) Варианты замены, вставки и делеции

**[0278]** 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.

**[0279]** Аминокислоты можно поделить на группы в соответствии с общими свойствами боковых цепей:

**[0280]** (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

**[0281]** (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

- [0282] (3) кислые: Asp, Glu;
- [0283] (4) основные: His, Lys, Arg;
- [0284] (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- [0285] (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.
- [0286] Неконсервативные замены приводят к замене члена одного из этих классов на члена другого класса.
- [0287] Один тип заменяемого варианта включает замену одного или более остатков гипервариабельной 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).
- [0288] Изменения (например, замены) могут быть сделаны в HVR, например, для улучшения аффинности антитела. Такие изменения могут быть произведены в «горячих точках» HVR, т. е. остатках, кодируемых кодонами, которые подвергаются мутации с высокой частотой во время процесса соматического созревания (см., например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207: 179-196 (2008)), и/или SDR (а-CDR), при этом полученный вариант VH или VL тестируется на связывание близость. Созревание аффинности путем конструирования и повторного выбора из вторичных библиотек описано, например, в Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).) В некоторых вариантах осуществления созревание аффинности, разнообразие вводится в переменные гены, выбранные для созревания, любым из множества способов (например, подверженной ошибкам ПЦР, перетасовкой цепей или олигонуклеотид-направленным мутагенезом). Затем создают вторичную библиотеку. Затем проводят скрининг библиотеки для идентификации любых вариантов антител с требуемой аффинностью. Другой способ для внесения разнообразия включает подходы, направленные на HVR, в которых несколько аминокислотных остатков HVR (4-6 аминокислотных остатков подряд) являются рандомизированными. Остатки HVR, вовлеченные в связывание

антигена, могут быть специфически идентифицированы, например, с использованием аланин-сканирующего мутагенеза или моделирования. Мишенями, в частности являются CDR-H3 и CDR-L3.

**[0289]** 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 VHH, приведенных ранее, каждый HVR или не изменен, или содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

**[0290]** 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 подвергнуты скринингу для определения наличия в них желаемых свойств.

**[0291]** 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

**[0292]** 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.

**[0293]** 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. *TECH 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.

**[0294]** В некоторых вариантах осуществления представлены варианты антител, имеющие углеводную структуру, в которой отсутствует фукоза, присоединенная (прямо или косвенно) к Fc-области. Например, количество фукозы в таком антителе может составлять от 1% до 80%, от 1% до 65%, от 5% до 65% или от 20% до 40%. Количество фукозы определяют, рассчитывая среднее количество фукозы в сахарной цепи Asn297 относительно общего количества гликоструктур, присоединенных к Asn 297 (например, комплексных, гибридных или содержащих большое количество маннозы структур), согласно данным масс-спектрометрии MALDI-TOF, как описано, например, в WO 2008/077546. Asn297 относится к остатку аспарагина, расположенному в положении 297 в области Fc (согласно нумерации EU остатков области Fc); при этом Asn297 также может быть расположен на около  $\pm 3$  аминокислот выше или ниже положения 297, т.е. между положениями 294 и 300, вследствие незначительных вариаций последовательностей в антителах. Такие варианты фукозилирования могут иметь улучшенную функцию АЗКЦ. См., например, патентные публикации США № US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Примеры публикаций, относящихся к «дефукозилированным» или «дефицитным по фукозе» вариантам антител, включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech.*

Bioeng. 87: 614 (2004). Примеры линий клеток, способных вырабатывать дефукозилированные антитела, включают клетки CHO Lec13 с дефицитом фукозилирования белка (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986); заявка на патент США № US 2003/0157108 A1, Presta, L; and WO 2004/056312 A1, Adams et al.), и линии клеток с нокаутом, таких как ген альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8, клетки с нокаутом CHO (см., например, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94 (4):680-688 (2006); и WO2003/085107).

**[0295]** 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 Fc-области. 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.).

**[0296]** 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***

**[0297]** CAR, Т-клетка, экспрессирующая CAR, моноклональные антитела, их антигенсвязывающие фрагменты, специфичные в отношении одного или более антигенов, описанных в настоящем документе, также могут экспрессироваться (например, коэкспрессироваться) с белком-меткой. В некоторых вариантах осуществления сайт распознавания фурином и расположенная ниже рибосомная последовательность 2А предназначены для одновременной бицистронной экспрессии последовательности метки и последовательности CAR. В некоторых вариантах осуществления последовательность 2А включает последовательность нуклеиновой кислоты GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления фуриновая последовательность и последовательность P2А включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления метка P2А включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 или последовательность, идентичность которой составляет по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%.

**[0298]** CAR, Т-клетка, экспрессирующая CAR, моноклональные антитела, их антигенсвязывающие фрагменты, специфичные в отношении одного или более антигенов, описанных в данном документе, также могут быть конъюгированы с обнаруживаемым маркером; например, обнаруживаемый маркер, который можно обнаружить с помощью ИФА, спектрофотометрии, проточной цитометрии, микроскопии или методов диагностической визуализации (таких как компьютерная томография (КТ), компьютерная аксиальная томография (САТ), магнитно-резонансная томография (МРТ), ядерно-магнитно-резонансная томография (ЯМРТ), магнитно-резонансная томография (МТР), ультразвуковое исследование, фиброоптическое исследование и лапароскопическое исследование). Конкретные неограничивающие примеры обнаруживаемых маркеров включают флуорофоры, хемилюминесцентные агенты, ферментативные связи, радиоактивные изотопы и тяжелые металлы или соединения (например, суперпарамагнитные нанокристаллы оксида железа для обнаружения с помощью МРТ). Например, полезные обнаруживаемые маркеры включают флуоресцентные соединения, в том числе флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, 5-диметиламин-1-нафталинсульфонилхлорид, фикоэритрин, лантаноидные люминофоры и т.п. Также используются биолюминесцентные маркеры, такие как люцифераза, зеленый флуоресцентный белок (GFP), желтый флуоресцентный белок (YFP). CAR, Т-клетка,

экспрессирующая CAR, антитело или его антигенсвязывающую часть, также могут быть конъюгированы с ферментами, пригодными для обнаружения, такими как пероксидаза хрена,  $\beta$ -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза, глюкозооксидаза и т.п. Когда CAR, Т-клетка, экспрессирующая CAR, антитело или его антигенсвязывающую часть конъюгируют с обнаруживаемым ферментом, их можно обнаружить путем добавления дополнительных реагентов, которые используются ферментом для получения продукта реакции, который может быть обнаружен. Например, когда присутствует пероксидаза хрена, добавление перекиси водорода и диаминобензидина приводит к окрашиванию продукта реакции, который можно обнаружить визуально. CAR, Т-клетка, экспрессирующая CAR, антитело или его антигенсвязывающую часть также могут быть конъюгированы с биотином и обнаружены путем непрямого измерения связывания авидина или стрептавидина. Следует отметить, что сам авидин может быть конъюгирован с ферментом или флуоресцентной меткой.

**[0299]** CAR, Т-клетка, экспрессирующая CAR, антитело или его антигенсвязывающая часть могут быть конъюгированы с парамагнитным агентом, таким как гадолиний. Парамагнитные агенты, такие как суперпарамагнитный оксид железа, также используются в качестве меток. Антитела также могут быть конъюгированы с лантаноидами (такими как европий и диспрозий) и марганцем. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент также могут быть помечены заранее определенными полипептидными эпитопами, распознаваемыми вторичным репортером (такими как последовательности пар лейциновых молний, сайты связывания вторичных антител, металл-связывающие домены, эпитопные метки).

**[0300]** CAR, Т-клетка, экспрессирующая CAR, антитело или его антигенсвязывающую часть также могут быть конъюгированы с аминокислотой, меченной радиоактивным изотопом. Радиоактивная метка может использоваться как в диагностических, так и в терапевтических целях. Например, радиоактивную метку можно использовать для обнаружения одного или более антигенов, описанных в данном документе, и клеток, экспрессирующих антиген, с помощью рентгеновского излучения, спектров излучения или других диагностических методов. Кроме того, радиоактивная метка может быть использована терапевтически в качестве токсина для лечения опухолей у субъекта, например, для лечения нейробластомы. Примеры меток для полипептидов включают, помимо прочего, следующие радиоизотопы или радионуклеотиды:  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ .

**[0301]** 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.

### **Иммунореактивные клетки и клетки-хозяева**

**[0302]** В одном аспекте настоящей заявки предложена сконструированная иммунная эффекторная клетка (например, иммунореактивная клетка). В контексте данного документа термин «иммунореактивная клетка» относится к клетке, функционирующей в иммунном ответе, или к ее предшественнику, или ее потомству. В некоторых вариантах осуществления иммунореактивная клетка содержит иммуномодулирующую систему, описанную в данном документе, (например, клетку, содержащую нацеливающий агент, специфичный к опухолеассоциированному антигену или стрессовому лиганду, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ ). В некоторых вариантах осуществления иммунореактивная клетка содержит иммуномодулирующую систему, описанную в данном документе, (например, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR); и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид, который модулирует сигналинг TGF- $\beta$ ).

**[0303]** В некоторых вариантах осуществления иммунная эффекторная клетка представляет собой Т-клетку, НК-клетку, мононуклеарную клетку периферической крови (РВМС), гемопоэтическую стволовую клетку, плюрипотентную стволовую клетку или эмбриональную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунореактивная клетка представляет собой Т-клетку.

**[0304]** В данном документе термин Т-клеткой может быть любая Т-клетка, такая как культивируемая Т-клетка, например, первичная Т-клетка или Т-клетка из культивируемой линии Т-клеток, например, Jurkat, SupT1 и т. д., или Т-клетка, полученная от млекопитающего. Если Т-клетка получена от млекопитающего, она может быть получена из многочисленных источников, включая, но не ограничиваясь ими, кровь, костный мозг, лимфатический узел, тимус или другие ткани или жидкости. Т-клетки также могут быть обогащенными или очищенными. Т-клетка может представлять собой Т-клетку человека. Т-клетка может представлять собой Т-клетку, выделенную из человека. Т-клетка может представлять собой Т-клетку любого типа и может находиться на любой стадии

развития, включая, помимо прочего, CD4+/CD8+ двойные положительные Т-клетки, CD4+ Т-хелперы, например, клетки Th1 и Th2, CD8+ Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), инфильтрирующие опухоль клетки, Т-клетки памяти, стволовые клетки памяти, т.е. Tscm, наивные Т-клетки и т.п. Т-клетка может быть CD8+ Т-клеткой или CD4+ Т-клеткой.

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

**[0306]** 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 *E. coli* DH5 $\alpha$ , клетки яичника китайского хомячка, клетки обезьяны, клетки COS, клетки HEK293 и т. п. Для целей амплификации или репликации рекомбинантного вектора экспрессии клетка-хозяин может быть прокариотической клеткой, например, клеткой DH5 $\alpha$ . Для получения рекомбинантного CAR клетка-хозяин может представлять собой клетку млекопитающего. Клетка-хозяин может представлять собой человеческую клетку. Хотя клетка-хозяин может относиться к любому типу клеток, может происходить из любого типа ткани и может находиться на любой стадии развития, клетка-хозяин может быть лимфоцитом периферической крови (PBL) или мононуклеарной клеткой периферической крови (PBMC). Клетка-хозяин может представлять собой Т-клетку.

**[0307]** В варианте осуществления также предложена популяция клеток, включающая по меньшей мере одну клетку-хозяина, описанную в данном документе. Популяция клеток может представлять собой гетерогенную популяцию, включающую клетку-хозяина, содержащую любой из описанных рекомбинантных векторов экспрессии, в дополнение по меньшей мере к одной другой клетке, например, клетке-хозяину (например, Т-клетке), которая не содержит ни одного из рекомбинантных векторов экспрессии или

клетки, отличной от Т-клетки, например, В-клетки, макрофага, нейтрофила, эритроцита, гепатоцита, эндотелиальной клетки, эпителиальной клетки, мышечной клетки, клетки мозга и т. д. Альтернативно, популяция клеток может быть по существу гомогенной популяцией, в которой популяция в основном содержит клетки-хозяева (например, состоящие в основном из), содержащие рекомбинантный вектор экспрессии. Популяция также может быть клональной популяцией клеток, в которой все клетки популяции являются клонами одной клетки-хозяина, содержащей рекомбинантный вектор экспрессии, так что все клетки популяции содержат рекомбинантный вектор экспрессии. В одном варианте осуществления популяция клеток представляет собой клональную популяцию, включающую клетки-хозяева, содержащие рекомбинантный вектор экспрессии, как описано в данном документе.

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

### **Нуклеиновые кислоты и векторы экспрессии**

**[0309]** Кроме того, вариантом осуществления изобретения является нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую любой из CAR, антитело или его антигенсвязывающую часть, описанные в данном документе (включая их функциональные части и функциональные варианты). Нуклеиновые кислоты по изобретению могут содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую любую из лидерных последовательностей, антигенсвязывающих доменов, трансмембранных доменов и/или внутриклеточных Т-клеточных сигнальных доменов, описанных в данном документе.

**[0310]** 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.

**[0311]** В варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота может содержать модифицированную по кодонам нуклеотидную последовательность, которая кодирует антигенсвязывающий домен CAR по изобретению. В еще одном варианте осуществления изобретения нуклеиновая кислота может содержать нуклеотидную последовательность с модифицированными кодонами, которая кодирует любой из описанных в данном документе CAR (включая их функциональные части и функциональные варианты).

**[0312]** 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.

**[0313]** Таким образом, изобретение один или более векторов экспрессии, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, человеческое, гуманизированное, химерное антитело или антигенсвязывающий фрагмент любого из вышеперечисленных), цепь антитела (например, тяжелую цепь, легкую цепь) или антигенсвязывающую часть цепи антитела, связывающего TGF $\beta$  или TGF $\beta$ R. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен один или более векторов экспрессии, содержащих нуклеиновую кислоту внеклеточного домена TGF $\beta$ R.

**[0314]** 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.

**[0315]** Также предложена нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере около 70% или более, например, около 80%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с любой из нуклеиновых кислот, которые кодируют описанную в данном документе конструкцию CAR.

**[0316]** 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.

**[0317]** 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.

**[0318]** 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).

**[0319]** Также можно использовать бактериофаговые векторы, такие как  $\lambda$ ,  $\lambda$ ZapII (Stratagene), EMBL4 и  $\lambda$ NMI 149. Примеры векторов экспрессии растений включают pBIO1, pBI101.2, pBHO1.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). Примеры векторов экспрессии на животных включают pEUK-C1, pMAM и pMAMneo (Clontech). Рекомбинантный вектор экспрессии может представлять собой вирусный вектор, например, ретровирусный вектор или лентивирусный вектор. Лентивирусный вектор представляет собой вектор, полученный из по меньшей мере части лентивирусного генома, включая, в частности, самоинактивирующийся лентивирусный вектор, как предлагается в Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Другие примеры лентивирусных векторов, которые можно использовать в клинике, включают, например, но не в порядке ограничения, технологию доставки генов LENTIVECTOR® от Oxford BioMedica plc, векторную систему LENTIMAX™ от Lentigen и т.п. Неклинические типы лентивирусных векторов также доступны и известны специалисту в данной области техники.

**[0320]** 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).

**[0321]** 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)).

**[0322]** В одном варианте осуществления рекомбинантные векторы экспрессии могут быть получены с использованием стандартных методов рекомбинантных ДНК, описанных, например, в Sambrook et al., см. выше, и Ausubel et al., см. выше. Конструкции векторов экспрессии, которые являются кольцевыми или линейными, могут быть приготовлены таким образом, чтобы содержать систему репликации, функционирующую в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Системы репликации могут быть получены, например, из ColE1, плазмиды 2 $\mu$ ,  $\lambda$ , SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота и т.п.

**[0323]** 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.

**[0324]** 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.

**[0325]** Рекомбинантный вектор экспрессии может содержать нативный или ненативный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей CAR (включая ее функциональные части и функциональные варианты), или с нуклеотидной последовательностью, которая комплементарна или гибридизуется с

нуклеотидной последовательностью, кодирующей CAR. Выбор промоторов, например, сильных, слабых, индуцируемых, тканеспецифичных и специфичных для развития, находится в пределах обычной квалификации специалиста в данной области техники. Аналогичным образом, комбинирование нуклеотидной последовательности с промотором также находится в рамках квалификации специалиста в данной области техники. Промотор может представлять собой невирусный промотор или вирусный промотор, например, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV или промотор, присутствующий в длинном концевом повторе вируса мышинных стволовых клеток.

**[0326]** 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.

**[0327]** Дополнительно могут быть созданы рекомбинантные векторы экспрессии, включающие суицидальный ген. В контексте данного документа термин «суицидальный ген» относится к гену, который заставляет клетку, экспрессирующую суицидальный ген, погибать. Суицидальный ген может быть геном, который придает чувствительность к агенту, например, лекарственному 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.

### **Способы лечения**

**[0328]** Настоящее изобретение относится к способам лечения, включающим введение субъекту антигенсвязывающей молекулы к TGF $\beta$ , TGF $\beta$ R или внеклеточного домена TGF $\beta$ R. В некоторых вариантах осуществления CAR и антигенсвязывающие молекулы, описанные в данном документе, можно использовать в способах лечения или предотвращения заболевания у млекопитающего. В этом отношении вариант осуществления обеспечивает способ лечения или предотвращения злокачественного новообразования у млекопитающего, включающий введение млекопитающему CAR, нуклеиновых кислот, рекомбинантных векторов экспрессии, клеток-хозяев, популяции клеток, антител и/или их антигенсвязывающие части и/или фармацевтические композиции в количестве, эффективном для лечения или предотвращения злокачественного новообразования у млекопитающего.

**[0329]** В некоторых вариантах осуществления CAR экспрессируется на донорских клетках, и антигенсвязывающая молекула к TGFβ, к TGFβR или внеклеточный домен TGFβR секретируется этими клетками. В некоторых вариантах осуществления донорские Т-клетки для применения в Т-клеточной терапии получают от пациента (например, для аутологичной Т-клеточной терапии). В других вариантах осуществления донорские Т-клетки для применения в Т-клеточной терапии получают от субъекта, который не является пациентом, (например, аллогенная Т-клеточная терапия). CAR+ Т-клетки можно вводить в терапевтически эффективном количестве. Например, терапевтически эффективное количество Т-клеток может составлять по меньшей мере около  $10^4$  клеток, по меньшей мере около  $10^5$  клеток, по меньшей мере около  $10^6$  клеток, по меньшей мере около  $10^7$  клеток, по меньшей мере около  $10^8$  клеток, по меньшей мере около  $10^9$  или не менее по меньшей мере около  $10^{10}$ .

**[0330]** В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество Т-клеток составляет около  $10^4$  клеток, около  $10^5$  клеток, около  $10^6$  клеток, около  $10^7$  клеток или около  $10^8$  клеток. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество CAR Т-клеток составляет около  $2 \times 10^6$  клеток/кг, около  $3 \times 10^6$  клеток/кг, около  $4 \times 10^6$  клеток/кг, около  $5 \times 10^6$  клеток/кг, около  $6 \times 10^6$  клеток/кг, около  $7 \times 10^6$  клеток/кг, около  $8 \times 10^6$  клеток/кг, около  $9 \times 10^6$  клеток/кг, около  $1 \times 10^7$  клеток/кг, около  $2 \times 10^7$  клеток/кг, около  $3 \times 10^7$  клеток/кг, около  $4 \times 10^7$  клеток/кг, около  $5 \times 10^7$  клеток/кг, около  $6 \times 10^7$  клеток/кг, около  $7 \times 10^7$  клеток/кг, около  $8 \times 10^7$  клеток/кг, или около  $9 \times 10^7$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток составляет от около  $1 \times 10^6$  до около  $2 \times 10^6$  CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток на кг массы тела до максимальной дозы около  $1 \times 10^8$  CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток.

**[0331]** В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток составляет от около  $0,25 \times 10^6$  до  $2 \times 10^6$ . В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток составляет около  $0,25 \times 10^6$ ,  $0,3 \times 10^6$ ,  $0,4 \times 10^6$ , около  $0,5 \times 10^6$ , около  $0,6 \times 10^6$ , около  $0,7 \times 10^6$ , около  $0,8 \times 10^6$ , около  $0,9 \times 10^6$ , около  $1,0 \times 10^6$ , около  $1,1 \times 10^6$ , около  $1,2 \times 10^6$ , около  $1,3 \times 10^6$ , около  $1,4 \times 10^6$ , около  $1,5 \times 10^6$ , около  $1,6 \times 10^6$ , около  $1,7 \times 10^6$ , около  $1,8 \times 10^6$ , около  $1,9 \times 10^6$ , или около  $2,0 \times 10^6$  CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток.

**[0332]** В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество CAR-положительных жизнеспособных Т-клеток составляет от около  $0,4 \times 10^8$  до

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

**[0333]** Вариант осуществления дополнительно включает лимфодеплецию млекопитающего перед введением CAR, раскрытых в данном документе. Примеры лимфодеплеции включают, но не ограничиваются ими, немиелоаблативную лимфодеплетирующую химиотерапию, миелоаблативную лимфодеплетирующую химиотерапию, тотальное облучение тела и т. д.

**[0334]** Для целей способов, в которых вводят клетки-хозяева или популяции клеток, клетки могут быть клетками, которые являются аллогенными или аутологичными для млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетки являются аутологичными для млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетки являются аллогенными 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.

**[0335]** 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.

**[0336]** Что касается способов, злокачественное новообразование может представлять собой любое злокачественное новообразование, 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 внутривнутрипеченочных 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), лимфомы 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 мочеточника.

**[0337]** В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак желудочно-кишечного тракта. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак желудка. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой колоректальный рак. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование характеризуется аномальной экспрессией TGF $\beta$  или аномальным сигналингом TGF $\beta$ .

**[0338]** 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 злокачественного новообразования у млекопитающего.

**[0339]** Кроме того, лечение или предотвращение, обеспечиваемые данным способом, могут включать лечение или предотвращение одного или более патологических состояний или симптомов заболевания, например, злокачественного новообразования, подлежащего лечению или профилактике. Кроме того, для целей данного документа «предотвращение» может включать отсрочку дебюта заболевания или его симптома или патологического состояния.

**[0340]** Способы тестирования CAR на способность распознавать клетки-мишени и антигенную специфичность известны в данной области техники. Например, в Clay et al., *J. Immunol*, 163: 507-513 (1999) описаны способы измерения высвобождения цитокинов (например, интерферона- $\gamma$ , гранулоцитарного/моноцитарного колониестимулирующего фактора (GM-CSF), фактора некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ) или интерлейкина 2 (IL-2)). Кроме того, функцию CAR можно оценить путем измерения клеточной цитотоксичности, как описано в Zhao et al, *J. Immunol*, 174: 4415-4423 (2005).

**[0341]** В другом варианте осуществления предложено применение CAR, нуклеиновых кислот, рекомбинантных векторов экспрессии, клеток-хозяев, популяций клеток, антител или их антигенсвязывающих частей и/или фармацевтических композиций по изобретению для лечения или профилактики пролиферативного нарушения, например, злокачественного новообразования у млекопитающего. Злокачественное новообразование может быть любым из описанных в данном документе злокачественных новообразований.

**[0342]** 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, интраокулярное и подкожное введение. Конкретный способ применения и режим дозирования выбираются лечащим врачом с учетом особенностей конкретного случая (например, субъект, заболевание, сопутствующее болезненное состояние и является ли лечение профилактическим). В случаях, когда вводят более одного агента или композиции, можно использовать один или более путей введения; например, химиотерапевтический агент можно вводить перорально, а антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат, или композицию можно вводить внутривенно. Способы введения включают инъекции, для которых CAR, CAR-T-клетки, конъюгаты, антитела, антигенсвязывающие фрагменты или композиции предложены в нетоксичном фармацевтически приемлемом носителе, таком как вода, солевой раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы, 5% сывороточный альбумин человека, нелетучие масла, этилолеат или липосомы. В некоторых вариантах осуществления можно использовать местное введение описанных соединений, например,

путем нанесения антитела или антигенсвязывающего фрагмента на область ткани, из которой была удалена опухоль, или на область, предположительно предрасположенную к развитию опухоли. В некоторых вариантах осуществления замедленное внутриопухолевое (или околоопухолевое) высвобождение фармацевтического препарата, который включает терапевтически эффективное количество антитела или антигенсвязывающего фрагмента, может быть полезным. В других примерах конъюгат наносят в виде глазных капель местно на роговицу или интравитреально в глаз.

**[0343]** 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.

**[0344]** Иллюстративные дозы антител или конъюгатов могут находиться в диапазоне от около 0,01 до около 30 мг/кг, например, от около 0,1 до около 10 мг/кг.

**[0345]** В конкретных примерах субъекту вводят терапевтическую композицию, которая включает один или более конъюгатов, антител, композиций, CAR, CAR T-клеток или дополнительных агентов, по схеме многократного ежедневного дозирования, например, по меньшей мере два дня подряд, 10 дней подряд и так далее, например, в течение нескольких недель, месяцев или лет. В одном примере субъекту вводят конъюгаты, антитела, композиции или дополнительные агенты в течение периода по меньшей мере 30 дней, например, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 24 месяца или по меньшей мере 36 месяцев.

**[0346]** В некоторых вариантах осуществления раскрытые способы включают хирургическое вмешательство, лучевую терапию и/или химиотерапию субъекту в сочетании с раскрытым антителом, антигенсвязывающим фрагментом, конъюгатом, CAR или T-клеткой, экспрессирующей CAR, (например, последовательно, по существу одновременно, или одновременно). Способы и терапевтические дозы таких агентов и

способов лечения известны специалистам в данной области техники и могут быть определены квалифицированным клиницистом. Схемы приготовления и дозирования дополнительного агента могут быть использованы в соответствии с инструкциями производителя или же по определению практикующего специалиста. Схемы подготовки и дозирования для такой химиотерапии также описаны в *Chemotherapy Service*, (1992) Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

**[0347]** В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия может включать введение субъекту терапевтически эффективного количества дополнительного ингибитора злокачественного новообразования. Неограничивающие примеры дополнительных терапевтических агентов, которые можно использовать с комбинированной терапией, включают агенты, связывающие микротрубочки, интеркаляторы ДНК или сшивающие ДНК агенты, ингибиторы синтеза ДНК, ингибиторы транскрипции ДНК и РНК, антитела, ферменты, ингибиторы ферментов, регуляторы генов, и ингибиторы ангиогенеза. Эти агенты (которые вводят в терапевтически эффективном количестве) и способы лечения можно использовать по отдельности или в комбинации. Например, любой подходящий противораковый или антиангиогенный агент можно вводить в комбинации с CAR, CAR-T-клетками, антителами, антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатами, описанными в данном документе. Способы и терапевтические дозы таких агентов известны специалистам в данной области техники и могут быть определены квалифицированным клиницистом.

**[0348]** Дополнительные химиотерапевтические агенты включают, помимо прочего, алкилирующие агенты, такие как азотистые иприты (например, хлорамбуцил, хлорметин, циклофосфамид, ифосфамид и мелфалан), нитрозомочевины (например, кармустин, фотемустин, ломустин и стрептозоцин), соединения платины (например, карбоплатин, цисплатин, оксалиплатин и BBR3464), бусульфан, дакарбазин, мехлорэтамин, прокарбазин, темозоломид, тиотепа и урамустин; антимаетаболиты, такие как фолиевая кислота (например, метотрексат, пеметрексед и ралтитрексед), пурины (например, кладрибин, клофарабин, флударабин, меркаптопурин и тиогуанин), пиримидин (например, капецитабин), цитарабин, фторурацил и гемцитабин; растительные алкалоиды, такие как подофиллум (например, этопозид и тенипозид), таксан (например, доцетаксел и паклитаксел), барвинок (например, винбластин, винкристин, виндезин и винорелбин); цитотоксические/противоопухолевые антибиотики, такие как члены семейства антрациклинов (например, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, идарубицин, митоксантрон и валрубицин), блеомицин, рифампицин, гидроксимочевину и митомицин; ингибиторы топоизомеразы, такие как топотекан и иринотекан; моноклональные антитела,

такие как алемтузумаб, бевацизумаб, цетуксимаб, гемтузумаб, ритуксимаб, панитумумаб, пертузумаб и трастузумаб; фотосенсибилизаторы, такие как аминоклевулиновая кислота, метиламиноклевулилат, порфирин натрия и вертепорфин; и другие агенты, такие как алитретиноин, алтретамин, амсакрин, анагрелид, триоксид мышьяка, аспарагиназа, акситиниб, бексаротен, бевацизумаб, бортезомиб, целекоксиб, денилейкин дифтитокс, эрлотиниб, эстрамустин, гефитиниб, гидроксикарбамид, иматиниб, лапатиниб, пазопаниб, пентостатин мазопрокол, митотан, пегаспаргаза, тамоксифен, сорафениб, сунитиниб, вемурафиниб, вандетаниб и третиноин. Выбор и терапевтические дозы таких агентов известны специалистам в данной области техники и могут быть определены квалифицированным клиницистом.

**[0349]** Комбинированная терапия может обеспечить синергизм и оказаться синергетическим, то есть эффект, достигаемый при совместном использовании активных ингредиентов, больше, чем сумма эффектов, возникающих при использовании соединений по отдельности. Синергетический эффект может быть достигнут, когда активные ингредиенты: (1) совместно составлены и введены или доставлены одновременно в комбинированном стандартном лекарственном составе; (2) доставлены путем чередования, или параллельно в виде отдельных составов; или (3) при помощи какой-либо другой схемы. При доставке попеременно синергетический эффект может быть достигнут, когда соединения вводят или доставляют последовательно, например, путем различных инъекций в отдельных шприцах. Как правило, при чередовании эффективную дозировку каждого активного ингредиента вводят последовательно, то есть последовательно, тогда как при комбинированной терапии эффективные дозировки двух или более активных ингредиентов вводят вместе.

**[0350]** В различных вариантах осуществления иммуномодулирующая система, содержащая модулятор сигналинга  $TGF\beta$ , описанный в данном документе, может быть включена в курс лечения, который дополнительно включает введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного агента. В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации с иммуномодулирующей системой, содержащей модулятор сигналинга  $TGF\beta$ , как описано в данном документе, может представлять собой химиотерапевтический агент. В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации с антигенсвязывающим агентом, как описано в данном документе, может представлять собой агент, который ингибирует воспаление.

**[0351]** В некоторых вариантах осуществления модулятор сигналинга  $TGF\beta$  представляет собой однодоменное антитело или секретируемый scFv со специфичностью в

отношении TGF $\beta$  человека. В некоторых вариантах осуществления модулятор сигналинга TGF $\beta$  представляет собой однодоменное антитело или секретируемый scFv со специфичностью в отношении TGF $\beta$ R человека. В некоторых вариантах осуществления модулятор сигналинга TGF $\beta$  может быть конъюгирован (например, связан) с терапевтическим агентом (например, химиотерапевтическим агентом и радиоактивным атомом) для связывания с раковой клеткой, доставки терапевтического агента в раковую клетку и уничтожения раковой клетки, которая экспрессирует TGF $\beta$  человека. В некоторых вариантах осуществления модулятор сигналинга TGF $\beta$  связан с терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент, цитокин, радиоактивный атом, кРНК или токсин. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой радиоактивный атом.

**[0352]** В некоторых вариантах осуществления способы можно применять в комбинации с другими видами терапии нарушений с аномальным сигналингом TGF $\beta$ . Например, композицию можно вводить субъекту одновременно, до или после химиотерапии. В некоторых вариантах осуществления композицию можно вводить субъекту одновременно, до или после метода адоптивной терапии.

**[0353]** В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации с иммуномодулирующей системой, содержащей модулятор сигналинга TGF $\beta$ , как описано в данном документе, можно вводить одновременно с модулятором сигналинга TGF $\beta$ , в тот же день или на той же неделе. В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации с модулятором сигналинга TGF $\beta$ , как описано в данном документе, может вводиться в одном составе с иммуномодулирующей системой. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент вводят временно разделено от введения модулятора сигналинга TGF $\beta$ , как описано в данном документе, например, за один или более часов до или после, за один или более дней до или после, за одну или более недель до или после или за одну или более месяцев до или после введения модулятора сигналинга TGF $\beta$ . В различных вариантах осуществления частота введения одного или более дополнительных агентов может быть такой же, аналогичной или отличной от частоты введения модулятора сигналинга TGF $\beta$ , как описано в данном документе.

**[0354]** В некоторых вариантах осуществления композиции могут быть составлены с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, например, дополнительными терапевтическими средствами для лечения или профилактики ассоциированного с TGF $\beta$  нарушения (например, злокачественного новообразования или

аутоиммунного нарушения) у субъекта. Дополнительные агенты для лечения ассоциированного с TGF $\beta$  нарушения у субъекта будут варьироваться в зависимости от конкретного заболевания, которое лечат, но могут включать, помимо прочего, ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизолон, осфамид, карбоплатин, этопозид, дексаметазон, цитарабин, цисплатин, циклофосфамид или флударабин.

### **Композиции**

**[0355]** В настоящем документе предложены композиции для применения в генной терапии, иммунотерапии и/или клеточной терапии, которые включают один или более описанных CAR, или Т-клеток, экспрессирующих CAR, антитела, антигенсвязывающие фрагменты, конъюгаты, CAR или Т-клетки, экспрессирующие CAR, который специфически связывается с одним или более антигенами, описанными в данном документе, в носителе (таком как фармацевтически приемлемый носитель). Композиции могут быть приготовлены в виде единичных дозированных форм для введения субъекту. Количество и время введения находятся на усмотрении лечащего врача для достижения желаемого результата. Композиции могут быть приготовлены для системного (например, внутривенного) или местного (например, внутриопухолевого) введения. В одном примере раскрытые CAR или Т-клетки, экспрессирующие CAR, антитело, антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат, готовят для парентерального введения, такого как внутривенное введение. Композиции, содержащие CAR или Т-клетку, экспрессирующую CAR, конъюгат, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, можно использовать, например, для лечения и обнаружения опухоли, например, и не ограничиваясь этим, нейроblastомы. В некоторых примерах композиции полезны для лечения или обнаружения карциномы. Композиции, содержащие CAR или Т-клетку, экспрессирующую CAR, конъюгат, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, также можно использовать, например, для обнаружения патологического ангиогенеза.

**[0356]** Композиции для введения могут включать раствор CAR или Т-клеток, экспрессирующих CAR, конъюгат, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые растворены в фармацевтически приемлемом носителе, таком как водный носитель. Можно использовать различные водные носители, например забуференный солевой раствор и т.п. Данные растворы являются стерильными и, как правило, не содержат нежелательных веществ. Данные композиции могут быть стерилизованы обычными, хорошо известными способами стерилизации. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения их к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH агенты и буферные агенты, агенты, регулирующие

токсичность, адъювантные агенты и т.п., например, ацетат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, лактат натрия и т.п. Концентрация CAR или Т-клеток, экспрессирующих CAR, антитело или антигенсвязывающий фрагмент или конъюгат, в этих составах может широко варьироваться и будет выбираться в первую очередь на основе объемов жидкости, вязкости, массы тела и т.п. в соответствии с выбранным способом введения и потребностями субъекта. Специалистам в данной области техники известны или очевидны актуальные способы получения таких дозированных форм для применения в генной терапии, иммунотерапии и/или клеточной терапии.

**[0357]** Типичная композиция для внутривенного введения включает от около 0,01 до около 30 мг/кг антитела или антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата на субъекта в день (или соответствующую дозу CAR или Т-клеток, экспрессирующих CAR, конъюгат, включающий антитело или антигенсвязывающий фрагмент). Реальные способы приготовления композиций для введения известны или очевидны специалистам в данной области техники и более подробно описаны в таких публикациях, как Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1995).

**[0358]** Парентеральные составы с контролируемым высвобождением могут быть изготовлены в виде имплантатов, масляных растворов для инъекций или систем частиц. Для общего обзора систем доставки белков см. Banga, A.J., Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995). Системы частиц включают микросферы, микрочастицы, микрокапсулы, нанокапсулы, наносферы и наночастицы. Микрокапсулы содержат терапевтический белок, такой как цитотоксин или лекарственное средство, в качестве центрального ядра. В микросферах терапевтическое средство распределено по всей частице. Частицы, микросферы и микрокапсулы размером менее около 1 мкм обычно называют наночастицами, наносферами и нанокапсулами, соответственно. Капилляры имеют диаметр около 5 мкм, поэтому внутривенно вводятся только наночастицы. Микрочастицы, как правило, имеют диаметр около 100 мкм и вводятся подкожно или внутримышечно. См., например, Kreuter, J., Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., pp. 219-342 (1994); и Tice & Tabibi, Treatise on Controlled Drug Delivery, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y., pp. 315-339, (1992).

**[0359]** Полимеры можно использовать для ионно-контролируемого высвобождения CAR или Т-клеток, экспрессирующих CAR, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или композиции конъюгатов, описанных в данном документе. В данной области техники известны различные разлагаемые и неразлагаемые полимерные матрицы для использования в контролируемой доставке лекарственных средств (Langer, Accounts Chem. Res. 26:537-

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

### **Наборы**

**[0360]** В одном аспекте также предложены наборы, в которых используются CAR, описанные в данном документе. Например, наборы для лечения опухоли у субъекта или создания CAR-T-клетки, которая экспрессирует один или более CAR, описанных в данном документе. Наборы, как правило, включают описанное антитело, антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат, молекулу нуклеиновой кислоты, CAR, или T-клетку, экспрессирующую CAR, как описано в данном документе. В набор может быть включено более одного из описанных антител, антигенсвязывающих фрагментов, конъюгатов, молекул нуклеиновых кислот, CAR или T-клеток, экспрессирующих CAR.

**[0361]** Набор может включать контейнер и этикетку или листок-вкладыш на контейнере или связанный с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и т.д. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер, как правило, содержит композицию, включающую одно или более описанных антител, антигенсвязывающих фрагментов, конъюгатов, молекул нуклеиновой кислоты, CAR или T-клеток, экспрессирующих CAR. В некоторых вариантах осуществления контейнер может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). На этикетке или на листке-вкладыше указано, что композицию применяют для лечения конкретного патологического состояния.

**[0362]** Этикетка или листок-вкладыш, как правило, дополнительно включают инструкции по применению раскрытых антител, антигенсвязывающих фрагментов, конъюгатов, молекул нуклеиновых кислот, CAR или Т-клеток, экспрессирующих CAR, например, в способе лечения или предотвращения опухоли или создания CAR-Т-клетки. Листок-вкладыш, как правило, включает инструкции, обычно включаемые в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, противопоказаниях и/или предостережениях относительно применения таких терапевтических продуктов. Учебные материалы могут быть в письменном виде, в электронной форме (например, на компьютерной дискете или компакт-диске) или могут быть визуальными (например, в виде видеофайлов). Наборы могут также включать дополнительные компоненты для облегчения конкретного применения, для которого предназначен набор. Так, например, набор может дополнительно содержать средства для обнаружения метки (такие как ферментные субстраты для ферментативных меток, наборы фильтров для обнаружения флуоресцентных меток, соответствующие вторичные метки, такие как вторичное антитело и т.п.). Наборы могут дополнительно включать буферы и другие реагенты, как правило, используемые для практического применения конкретного способа. Такие наборы и соответствующее их содержимое хорошо известны специалистам в данной области техники.

**[0363]** 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.

**[0364]** 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.

**[0365]** 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**

**[0366]** 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. Иммунореактивные клетки, коэкспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR) и модулятор сигналинга TGF-В*

**[0367]** Этот пример иллюстрирует коэкспрессию модулятора сигналинга TGF-β и CAR с использованием иммуномодулирующей системы в Т-клетках человека. Иммуномодулирующие конструкции, кодирующие модулятор сигналинга TGF-В (например, анти-TGFβ и анти-TGFβR2) и CAR к CD19 человека (внеклеточный антигенсвязывающий домен SJ25C1), упаковывали для ретровирусной доставки. Линию ретровирусных упаковочных клеток Phoenix A (ATCC) выращивали до 50-70% слияния в DMEM с 20% FBS и пеницилином/стрептомицином. Комплексы ДНК готовили с использованием соответствующих плазмид, кодирующих модулятор сигналинга TGF-В и конструкцию CAR, хелперных плазмид gag-pol и pVSVG и реагента для трансдукции Fugene HD (Promega) в соответствии с протоколом производителя. Через 20-48 часов после трансфекции вирусный супернатант собирали, разделяли на аликвоты и замораживали для дальнейшего применения.

**[0368]** PBMC человека выделяли из лейкопаков с использованием градиента плотности и замораживали до дальнейшего применения. Т-клетки человека выделяли методом магнитной селекции (набор для выделения Т-клеток; Stemcell) из предварительно замороженных PBMC. Очищенные Т-клетки человека культивировали в течение 2 дней в полной среде Optimizer (базальная среда Optimizer (ThermoFisher, № A10221-01) + 26 мл добавки OptiMizer (ThermoFisher, № A10484-02) + 20 мл ICSR (CTS Immune Cell SR), ThermoFisher, № A25961-01) + 10 мл 200 мМ L-глутамин (Gibco 25030-081) + PenStrep (Gibco 15140-122)), содержащего 2 нг/мл человеческого IL-2 (Miltenyi) и частицы T-cell Transact (Miltenyi)).

**[0369]** Т-клетки переносили на покрытые ретронектином планшеты (Takara; 40 мкг/мл ретронектина) и подвергали трансдукции соответствующим объемом вируса с использованием центрифугирования. Трансдукцию подтверждали и количественно определяли с помощью проточной цитометрии в разные моменты времени. Вкратце, клетки инкубировали с 250 нг белка hCD19-hFc (RnD Systems) или белка hGCC-Fc собственного производства в буфере для FACS в течение 1 часа при 4°C. После промывки буфером для FACS клетки ресуспендировали со вторичным антителом к Fc человека (Biolegend) в течение 20 минут при комнатной температуре. В некоторых экспериментах добавляли антитела к CD4, CD8 или других поверхностных маркеров. Мертвые клетки исключали из анализа с помощью фиксирующего красителя для определения жизнеспособности (Thermofisher). Клетки фиксировали в PBS, 2% FCS, 4% формальдегиде перед анализом с помощью проточной цитометрии (FACS Fortessa, BD Biosciences). Эффективность трансдукции представлена в виде % живых клеток, положительных в отношении окрашивания на CAR. Результаты проточной цитометрии показали, что популяции 87,6% лимфоцитов, 76,1% синглетов, 78,3% живых CD3+ клеток и 75,8% клеток демонстрируют экспрессию CAR (Фиг. 1A-1D). Эффективность трансдукции показана в виде % живых клеток, положительных в отношении окрашивания на CAR (Фиг. 1E).

Пример 2. Уничтожение *in vitro* с использованием модулирующих TGF-β CAR-T-клеток человека

**[0370]** Этот пример иллюстрирует уничтожение *in vitro* человеческими CAR-T-клетками, коэкспрессирующими модулятор сигналинга TGF-β. Уничтожение *in vitro* «бронированными» CAR-T-клетками человека сравнимо с «небронированными» CAR-T-клетками

**[0371]** Клетки Raji (ATCC CD19-положительные) или Raji CD19ko (отрицательные по CD19 человека) окрашивали красителем для оценки пролиферации eFluor 450 (Thermofisher) в соответствии с протоколом производителя и высевали в 96-луночные планшеты не менее чем за 2 часа до добавления модулирующих TGF-β CAR-T-клеток, описанных в Примере 1. CAR-T-клетки добавляли в соотношения эффектор:мишень 0:1, 0,3:1, 1:1, 3:1, 9:1, и только Т-клетки инкубировали в течение ночи при 37°C. На следующий день проводили FACS-окрашивание с использованием конъюгированных с флуорохромом антител к CD107a человека (LAMP-1) (Biolegend), TCR α/β (Biolegend) и антитела к CD4 человека (Biolegend). Клетки инкубировали с антителами в течение 30 мин при 4°C, промывали PBS и окрашивали фиксирующим красителем для определения жизнеспособности (Thermofisher) согласно протоколу производителя. Клетки промывали

1x буфером для связывания аннексина V (Biolegend) и окрашивали аннексином V FITC. Клетки фиксировали в Cytotfix (BD Biosciences) перед анализом на FACS Fortessa (BD Biosciences). Модулирующие TGF- $\beta$  Т-клетки с CAR к CD19 продемонстрировали специфическое уничтожение мишеней *in vitro* для CD19-положительных клеток Raji (Фиг. 2А), но не для CD19-отрицательных контрольных клеток (Raji CD19ko) (Фиг. 2В).

Пример 3. Секреция модуляторов TGF- $\beta$  из иммунореактивных клеток

**[0372]** Этот пример демонстрирует, что модулирующие TGF- $\beta$  CAR-Т-клетки секретируют коэкспрессированные модуляторы TGF- $\beta$  (например, анти-TGF- $\beta$ , которые связывают TGF- $\beta$ , и анти-TGF $\beta$ R2, которые связывают TGF $\beta$ R2).

**[0373]** Супернатант из модулирующих TGF- $\beta$  CAR-Т-клеток анализировали с помощью ELISA для обнаружения антител к TGF- $\beta$  и к TGF $\beta$ R2. 96-луночные планшеты Maxisorp покрывали рекомбинантным человеческим TGF- $\beta$  (4 мкг/мл; RnD System) или hTGF $\beta$ R2-Fc (0,1 мг/мл; RnD System) в 100 мкл покрывающего буфера в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали 1x промывочным буфером и блокировали в течение 1 часа разбавителем реагентов при комнатной температуре. Добавляли супернатант CAR-Т, рекомбинантное антитело к TGF $\beta$ R2 с flag или рекомбинантное антитело к TGF- $\beta$  с flag и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре.

**[0374]** После еще одной стадии промывки добавляли конъюгированное с HRP антитело к метке Flag и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Планшеты промывали и добавляли субстрат TMB на 10-20 минут. Реакцию останавливали, используя стоп-реагент, и планшеты считывали при 450 нм с помощью планшетного ридера Pherastar. ELISA с использованием покрытого TGF-b выявил высокие уровни VH-VL1 scFv к TGF-b и VH-VL2 scFv к TGF-b по сравнению с VL-VH scFv к TGF-b с использованием конъюгированных с HRP антител к метке Flag для обнаружения связывающего вещества (Фиг. 3А). ELISA с использованием покрытого TGFbR2-Fc выявил высокие уровни VH-VL scFv к TGFbR2, VL-VH TGFbR2 к scFv и VH1 к hTGFbR2 из человеческих CAR-Т-клеток, но не смог обнаружить VH1 к mTGFbR2 (Фиг. 3В). Связывающие TGF- $\beta$  вещества и связывающие TGF $\beta$ R2 вещества секретируются модулирующими TGF- $\beta$  CAR-Т-клетками, и связывались с родственным им антигеном.

Пример 4. CAR-Т клетки человека секретируют нейтрализующие антитела к TGF- $\beta$ /TGF $\beta$ R2

**[0375]** Этот пример иллюстрирует присутствие нейтрализующих антител к TGF- $\beta$ /TGF $\beta$ R2 в супернатантах модулирующих TGF- $\beta$  CAR-Т-клеток.

**[0376]** Функциональную оценку связывающих веществ, блокирующих TGF- $\beta$ , на супернатанте CAR-T-клеток проводили с использованием репортерных клеток SBE-Luc (клетки HEK293, экспрессирующие люциферазу светлячка под контролем Smad-связывающего элемента (SBE) (BPS Biosciences)), предназначенных для мониторинга активности сигнального пути TGF- $\beta$ /SMAD. Белки TGF- $\beta$  связываются с родственными им рецепторами на клеточной поверхности, иницируя сигнальный каскад, который приводит к фосфорилированию и активации SMAD2 и SMAD3, которые затем образуют комплекс с SMAD4. Комплекс SMAD перемещается в ядро и связывается со SMAD-связывающим элементом (SBE), что приводит к транскрипции и экспрессии TGF- $\beta$ /SMAD-чувствительных генов. Присутствие блокирующих связывающих веществ определяли по их способности ингибировать индуцированную TGF- $\beta$  экспрессию люциферазы в репортерных клетках SBE-Luc. Иллюстративный анализ для оценки способности ингибировать TGF- $\beta$ -индуцированную репортерную активность проводили следующим образом.

**[0377]** Клетки SBE-Luc высевали в покрытые поли-D-лизином 96-луночные планшеты в концентрации  $1 \times 10^5$  клеток/лунка в 100 мкл свежей среды (X-VIVO15, содержащей 1x раствор пенициллина/стрептомицина) и инкубировали в течение 4 часов при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Супернатант из CAR-T-клеток или их разведения смешивали с эквивалентным объемом TGF- $\beta$  (4 нг/мл в X-VIVO15) и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут, чтобы позволить TGF- $\beta$  образовать комплекс с содержащимся TGF- $\beta$  в супернатанте CAR-T-клеток. 100 мкл смеси добавляли к репортерным клеткам SBE-Luc в двух повторностях и инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Конечная концентрация TGF- $\beta$  составляла 1 нг/мл. Каждый эксперимент включал кривую титрования возрастающих разведений антитела TGF- $\beta$  (1D11 (BioXcell) или связывающих TGF- $\beta$  веществ или связывающих TGF $\beta$ R2 веществ) в присутствии 1 нг/мл TGF- $\beta$ .

**[0378]** На следующий день 100 мкл культурального супернатанта удаляли и добавляли 100 мкл содержащего люциферин-D реагента для обнаружения (система для люциферазного анализа ONE-Step™). Клетки ресуспендировали и переносили на белый планшет для обнаружения, и измеряли люминесценцию с помощью планшетного ридера Pherastar. Люциферазную активность регистрировали как CPM. Данные анализировали с использованием MS Excel или призмы Graphpad Prism. Аппроксимация нелинейной регрессии была выполнена с использованием сигмоидальной зависимости доза-ответ (угловой коэффициент) в Graphpad Prism. Рассчитывали значения IC50.

**[0379]** Ингибирующую активность (%) рассчитывали с помощью следующего уравнения:

Ингибирование (%) =  $(1 - \text{CPM образца} / \text{CPM макс. обработанного TGF-}\beta \text{ (1 нг/мл) образца}) \times 100$

**[0380]** Результаты продемонстрировали, что супернатант из CAR-T-клеток, секретирующих конструкции VH-VL1 scFv к TGF- $\beta$  (SEQ ID NO: 1) и VH-VL2 scFv к TGF- $\beta$  (SEQ ID NO: 2), ингибирует сигналинг TGF- $\beta$  (Фиг. 4). Дополнительные конструкции были сконструированы и проверены с использованием репортерного анализа гена люциферазы на секрецию мультимерных связывающих веществ к TGF- $\beta$  или TGF $\beta$ R2 (Фиг. 5 и Фиг. 6). Были идентифицированы модулирующие TGF- $\beta$  CAR-T-клетки, которые секретируют мультимерные антитела к TGF- $\beta$  и TGF $\beta$ R2. Мультимерные связывающие TGF- $\beta$  вещества могут секретироваться CAR-T-клетками человека и ингибировать сигналинг TGF- $\beta$  независимо от линкера. Четыре различных линкера были проанализированы, как показано на фигуре ниже. Аналогичные результаты наблюдались при использовании человеческих T-клеток с CAR к GCC (данные не показаны).

Пример 5. Модулирующие TGF- $\beta$  CAR-T-клетки секретируют мультимерные связывающие вещества к TGF- $\beta$  или TGF $\beta$ R2

**[0381]** Этот пример иллюстрирует скрининг и идентификацию мышинных CAR-T-клеток, которые секретируют мультимерные связывающие вещества к TGF- $\beta$  или TGF $\beta$ R2. Для получения мышинных CAR-T-клеток линию ретровирусных упаковочных клеток Platinum-E выращивали до 50-70% слияния в DMEM с 20% FBS и пеницилином/стрептомицином. Комплексы ДНК готовили с использованием плазмид иммуномодулирующей системы, кодирующих конструкцию CAR и модулятор TGF $\beta$  (например, мономер scFv к TGF- $\beta$ , димер scFv к TGF- $\beta$ ), упаковочной конструкции и реагента для трансдукции Fugene HD в соответствии с протоколом производителя. Раствор перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут и добавляли 850 мкл комплекса в чашку площадью 10 см<sup>2</sup> с клетками. Мышиные T-клетки выделяли методом магнитной селекции с использованием набора для выделения T-клеток из селезенки мышей Balb/c или C57BL/6, соответственно. Очищенные T-клетки мыши культивировали в течение 2 дней с частицами с активатором мышинных T-клеток (соотношение 1:1) в RPMI с 10% инактивированной нагреванием FCS, пеницилином/стрептомицином и мышинным IL-2 (30 ед/мл). Вирус собирали примерно через 48 часов после трансфекции и фильтровали через шприцевой фильтр с диаметром пор 0,4 мкм. T-клетки переносили на планшеты, покрытые ретронектином (покрытые 40 мкг/мл

ретронекина в соответствии с протоколом производителя), и подвергали трансдукции соответствующим объемом вируса с использованием центрифугирования. Трансдукцию подтверждали и количественно определяли с помощью проточной цитометрии в разные моменты времени.

**[0382]** Клетки инкубировали с 250 нг белка hCD19-hFc в буфере для FACS в течение 1 часа при 4°C. После промывки буфером для FACS клетки ресуспендировали со вторичным антителом к Fc человека в течение 20 минут при комнатной температуре. В некоторых экспериментах добавляли антитела к CD4, CD8 или других поверхностных маркеров. Мертвые клетки исключали из анализа с помощью фиксирующего красителя для определения жизнеспособности. Клетки фиксировали в PBS, 2% FCS, 4% формальдегиде перед анализом с помощью проточной цитометрии (FACS Fortessa). Эффективность трансдукции представлена в виде процента (%) живых клеток, положительных в отношении окрашивания на CAR.

**[0383]** Результаты проточной цитометрии показали относительную долю «небронированных» Т-клеток, мономера TGF- $\beta$ , димера TGF- $\beta$  и нетрансдуцированных клеток. Супернатант мышинных CAR-T-клеток, собранных на д+2 после трансдукции, исследовали на ингибирование сигналинга TGF- $\beta$  в репортерном анализе SBE-Luc TGF- $\beta$  (метод описан в Примере 4). Супернатант мышинового CAR-T, секретирующего мономер и димер scFv TGF- $\beta$ , ингибировал передачу сигнала TGF- $\beta$  на основе репортерной активности люциферазы. Были идентифицированы мышинные CAR-T-клетки, которые секретируют мультимерные антитела к TGF- $\beta$  и TGF $\beta$ R2.

**[0384]** Супернатант собирали через два дня после трансдукции и замораживали при -80°C до применения для ELISA. ELISA выполняли, как описано в Примере 3. Рекомбинантный белок TGF $\beta$ R2 человека - Fc человека использовали для связывания связывающих веществ к TGF $\beta$ R2 человека, а рекомбинантный белок TGF $\beta$ R2 мыши - Fc использовали для исследования связывания связывающих веществ к TGF $\beta$ R2 с TGF $\beta$ R2 мыши. Связывание детектировали с использованием конъюгированных с HRP антител к Flag и соответствующего субстрата. Как показано на Фиг. 7, секреция связывающих мономеров и димеров hTGF $\beta$ R2-VH2 и hTGF $\beta$ R2-VH3 и мономера и димера VH-VL scFv к TGF $\beta$ R2 и их связывание с TGF $\beta$ R2 человека. Ни одно из связывающих веществ из протестированных супернатантов не связывалось с TGF $\beta$ R2 мыши, что подтверждает специфичность в отношении TGF $\beta$ R2 человека.

*Пример 6. Противоопухолевая эффективность in vivo CAR-T-клеток, секретирующих модуляторы сигналинга TGF- $\beta$*

**[0385]** Этот пример иллюстрирует противоопухолевую эффективность *in vivo* CAR-T-клеток, секретирующих мкАт к TGF- $\beta$ . «Бронированные» CAR-T-клетки мыши (коэкспрессирующие CAR к CD19 человека и модулятор сигналинга TGF $\beta$ ) ингибируют рост сингенной опухоли EMT6-hCD19 лучше, чем «небронированные» CAR-T-клетки. Кроме того, «бронированные» CAR-T-клетки уменьшают метастазирование в печень и легкие. Была получена линия клеток карциномы молочной железы EMT6, сверхэкспрессирующая CD19 человека в качестве антигена-мишени CAR-T-клеток и люциферазу светлячка. Клетки EMT6 трансдуцировали вирусом, несущим плазмиду, кодирующую CD19 человека под контролем промотора EF1a, и ген устойчивости к пурамицину. Клетки EMT6-hCD19 подвергали положительной селекции с использованием пурамицина и дополнительно очищены с помощью сортировки методом FACS. Клетки EMT6-hCD19 трансдуцировали вирусом, несущим плазмиду, кодирующую люциферазу светлячка под контролем промотора EF1a, и ген устойчивости к неомицину (Amsbio) при  $5 \times 10^7$  ME/мл; MOI = 10, в присутствии полибрена. Клетки EMT6-hCD19-Fluc подвергали положительной селекции с использованием G418 (500 мкг/мл).

**[0386]** Самкам мышей Balb/c в возрасте 6–16 недель (Jackson Labs) вводили  $0,2 \times 10^6$  жизнеспособных опухолевых клеток EMT6-hCD19-Fluc в жировую ткань молочной железы (ортогипотически). Через 6 дней после имплантации размер опухоли достигал около  $50 \text{ мм}^3$ , и мышей рандомизировали в группы лечения с аналогичным средним размером опухоли (в среднем  $\sim 50 \text{ мм}^3$ ) и лечили циклофосфамидом (CPA; 200 мг/кг в/б). На следующий день в хвостовую вену вводили 500000 мышинных CAR-T-клеток от конгенных по CD45.1 мышей Balb/c. Группа 1 получала нетрансдуцированные T-клетки, группа 2 получала CAR-T-клетки, а группа 3 получала клетки, секретирующие VH-VL1 scFv к TGF- $\beta$  CAR-T-клетки. Массу тела измеряли два раза в неделю для контроля токсичности.

**[0387]** Размер опухоли измеряли дважды в неделю, и объем опухоли рассчитывали по формуле: объем опухоли ( $\text{мм}^3$ ) = длина  $\times$  ширина  $\times$  высота  $\times 0,5236$  (Фиг. 8). Любых мышей с опухолями более  $2000 \text{ мм}^3$  или язвенными опухолями умерщвляли. Противоопухолевую эффективность оценивали как уменьшение размера опухоли по сравнению с контрольными мышами, которым вводили нетрансдуцированные T-клетки. Мышей без каких-либо обнаруживаемых опухолей определяли как мышей, которые достигли полного ответа.

**[0388]** CAR-T-клетки, секретирующие связывающее TGF- $\beta$  вещество, показали высокую противоопухолевую эффективность по сравнению с «небронированными» CAR-T или нетрансдуцированными CAR-T-клетками. Печень и легкие визуализировали на наличие опухолевых клеток, экспрессирующих люциферазу светлячка, путем инъекции

люциферина и визуализации с помощью IVIS. Раствор D-люциферина (D-люциферин, калиевая соль люциферина VivoGlo™) готовили в концентрации 15 мг/мл и использовали в концентрации 150 мг/кг. Мыши, получавшие CAR-T-клетки, которые секретируют связывающие TGF-β вещества, были способны уменьшать метастазирование в печень и легкие (Фиг. 8А-8Е).

**[0389]** Мышиные CAR-T против CD19 человека, секретирующие ингибирующее антитело к TGF-β (TGF-β scFv VH-VL1), ингибируют рост сингенной опухоли EMT6-hCD19 лучше, чем «небронированные» CAR-T-клетки, и уменьшают метастазирование в печень и легкие. Количество CAR-T клеток предварительно подвергали титрованию для получения субоптимального эффекта для «небронированных» CAR-T с целью выявления улучшенной активности «бронированных» CAR-T клеток.

Пример 7. «Бронированные» мышиные CAR-T-клетки, которые секретируют внеклеточный домен (ВКД) TGFβR2, ингибируют сигналинг TGFβ

**[0390]** Репортерный анализ SBE-Luc TGF-β проводили, сравнивая супернатант из «бронированных» мышиных CAR-T-клеток, секретирующих различные лиганды-ловушки TGF-β (от VH-VL1 scFv к TGF-β до мономеров, гомодимеров (Фиг. 9А) и гетеродимеров ВКД TGFβR2 (Фиг. 9В)) с «небронированными» CAR-T-клетками. Репортерный анализ SBE-Luc TGF-β показал, что супернатант из «бронированных» мышиных CAR-T-клеток против CD19 человека, которые секретируют димер внеклеточного домена (ВКД) TGFβR2, но не мономеры, хорошо ингибирует и демонстрирует ингибирование, сравнимое с димером VH-VL1 scFv к TGF-β. Супернатанты собирали через 2 дня после трансдукции. Оценивали ингибирование гетеродимера ВКД TGFβR2, включая ВКД TGFβR2 и ВКД TGFβR1. Идентифицировали гетеродимер ВКД TGFβR2, который ингибирует сигналинг TGF-β более сильно, чем VH-VL1 scFv к TGF-β. Иллюстративные последовательности ВКД TGFβR2 показаны в таблице 4.

*Таблица 4. Иллюстративные последовательности ВКД TGFβR2*

TGFβR2 ECD мономер
METDTLLLWVLLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDV MASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKND KNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFS EEYTTSSPDL (SEQ ID NO: 37)
TGFβR2 ECD димер
METDTLLLWVLLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDV MASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKND KNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFS



**[0391]** Этот пример иллюстрирует относительную противоопухолевую эффективность *in vivo* CAR-T-клеток, секретирующих мкАт к TGFβ или TGFβ R2-ВКД.

**[0392]** Мышиные CAR-T-клетки, секретирующие димер ВКД1+2 TGFβR2, проявляют улучшенную противоопухолевую функцию *in vivo* по сравнению с «небронированными» CAR-T-клетками. Самкам мышей Balb/c в возрасте 6–16 недель (Jackson Labs) вводили  $0,2 \times 10^6$  жизнеспособных опухолевых клеток EMT6-hCD19-Fluc в жировую ткань молочной железы (ортотопически). Через 6 дней после имплантации размер опухоли достигал около 50 мм<sup>3</sup>, и мышей рандомизировали в группы лечения с аналогичным средним размером опухоли (в среднем ~ 50мм<sup>3</sup>, n=8 на группу) и лечили циклофосфамидом (CPA; 200 мг/кг в/б). На следующий день в хвостовую вену вводили 2 миллиона мышиных CAR-T-клеток от конгенных по CD45.1 мышей Balb/c. Группа 1 получала нетрансдуцированные контрольные Т-клетки, группа 2 получала «небронированные» CAR-T-клетки, группа 3 получала CAR-T-клетки, секретирующие димер ВКД1+2 TGFβR, и группа 4 системно получала антитело к TGF-β (клон 1D11.16.8; 10 мг/кг; 3 инъекции/неделю; в/в). Массу тела измеряли два раза в неделю для контроля токсичности. Размер опухоли измеряли дважды в неделю, и объем опухоли рассчитывали по формуле: объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = длина x ширина x высота x 0,5236. Любых мышей с опухолями более 2000 мм<sup>3</sup> или язвенными опухолями умерщвляли в соответствии с протоколом института здоровья животных. Противоопухолевую эффективность оценивали как уменьшение размера опухоли по сравнению с контрольными мышами, которым вводили нетрансдуцированные Т-клетки. Мышей без каких-либо обнаруживаемых опухолей определяли как мышей, которые достигли полного ответа.

**[0393]** Мышиные CAR-T против CD19 человека, секретирующий лиганд-ловушку TGF-β (димер1 ВКД1+2 mTGFβR2), ингибирует рост сингенной опухоли EMT6-hCD19 лучше, чем «небронированные» CAR-T-клетки, вызывая 3 полных ответа по сравнению с отсутствием полных ответов у контрольных мышей, которые получали «небронированные» CAR-T или нетрансдуцированные Т-клетки или системно получали антитело к TGF-β (1D11, 10 мг/кг, 3 раза в неделю в/в). (Фиг. 10)

Пример 9. Противоопухолевая эффективность «бронированных» CAR-T-клеток, секретирующих модулятор сигналинга TGF-β, в модели сингенной опухоли (MC38-hCD19)

**[0394]** Этот пример иллюстрирует относительную противоопухолевую эффективность *in vivo* CAR-T-клеток, секретирующих мкАт к TGFβ или TGFβ R2-ВКД. Улучшенная функция мышиных CAR-T-клеток, «бронированных» мкАт к TGF-b (VH-VL1 scFv к TGF-b), в другой сингенной модели опухоли (MC38-hCD19).

**[0395]** Линию клеток колоректального рака MC38, сверхэкспрессирующую CD19 человека в качестве целевого антигена CAR-T-клеток и люциферазу светлячка, получали и использовали для визуализации. Вкратце, клетки MC38 трансдуцировали вирусом, несущим плазмиду, кодирующую CD19 человека под контролем промотора EF1a и ген устойчивости к пурамицину, (CD19\_FL\_WT\_pLVX-EF1a-IRES-Puro). Клетки MC38-hCD19 подвергали положительной селекции с использованием пурамицина. Клетки MC38-hCD19 трансдуцировали вирусом, несущим плазмиду, кодирующую люциферазу светлячка под контролем промотора EF1a и ген устойчивости к неомицину (Amsbio, кат. № LVP435-PBS,  $5 \times 10^7$  ME/мл; MOI = 10) в присутствии полибрена. Клетки MC38-hCD19-Fluc подвергали положительной селекции с использованием G418 (генетицина).

**[0396]** Самкам мышей C57BL/6 в возрасте 6-16 недель (Jackson Labs) инокулировали  $0,2 \times 10^6$  жизнеспособных опухолевых клеток MC38-hCD19-Fluc подкожно. Через семь дней после имплантации размер опухоли достигал примерно 50 мм<sup>3</sup>, и мышей случайным образом распределяли по группам лечения с аналогичным средним размером опухоли (в среднем ~50 мм<sup>3</sup>; n=8 в группе) и лечили циклофосфамидом (CPA; 200 мг/кг внутривенно). На следующий день 100000 мышинных CAR-T-клеток (или нетрансдуцированных T-клеток в качестве отрицательного контроля) от конгенных по CD45.1 мышей C57BL/6 инъецировали в хвостовую вену. Группа 1 получала нетрансдуцированные T-клетки. Группа 2 получала «небронированные» CAR-T-клетки. Группа 3 получала T-клетки, секретирующие CAR к TGF- $\beta$ , (VH-VL1 scFv к TGF- $\beta$ ). Массу тела измеряли два раза в неделю для контроля токсичности. Размер опухоли измеряли дважды в неделю, и объем опухоли рассчитывали по формуле: объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = длина x ширина x высота x 0,5236. Любых мышей с опухолями более 2000 мм<sup>3</sup> или язвенными опухолями умерщвляли в соответствии с протоколом института здоровья животных. Противоопухолевую эффективность оценивали как уменьшение размера опухоли по сравнению с контрольными мышами, которым вводили нетрансдуцированные T-клетки. Мышей без каких-либо обнаруживаемых опухолей определяли как мышей, которые достигли полного ответа.

**[0397]** CAR-T-клетки, секретирующие ингибирующее связывающее вещество к TGF- $\beta$  (VH-VL1 scFv к TGF- $\beta$ ), продемонстрировали более высокую эффективность по сравнению с «небронированными» CAR-T-клетками, вызывая 7 полных ответов у 8 получавших лечение мышей по сравнению с отсутствием полных ответов в контрольных группах, которым вводили равное количество либо «небронированных» CAR-T, либо нетрансдуцированных T-клеток. (Фиг. 11)

Пример 10. CAR-T-клетки, секретирующие модулятор сигналинга TGF-β, усиливают активацию иммунного ответа хозяина

**[0398]** Этот пример демонстрирует, что РНК-секвенирование показало усиленную активацию иммунного ответа хозяина CAR-T-клетками, секретирующими связывающее вещество к TGF-β.

**[0399]** Самкам мышей Balb/c в возрасте 6-16 недель (Jackson Labs) инокулировали  $0,2 \times 10^6$  жизнеспособных опухолевых клеток EMT6-hCD19-Fluc в жировую ткань молочной железы (ортогепатически). Через 6 дней после имплантации размер опухоли достигал примерно 50 мм<sup>3</sup>, и мышей случайным образом распределяли по группам лечения с аналогичным средним размером опухоли (в среднем ~50 мм<sup>3</sup>; n=8 в группе) и лечили циклофосфамидом (CPA; 200 мг/кг внутривентриально). На следующий день в хвостовую вену вводили 2 миллиона мышинных CAR-T-клеток от конгенных по CD45.1 мышей Balb/c. Группа 1 получала нетрансдуцированные контрольные Т-клетки, группа 2 получала «небронированные» CAR-T клетки, группа 3 получала CAR-T клетки, секретирующие VH-VL1 scFv к TGF-β. Группа 4 системно получала антитело к TGF-β (клон 1D11.16.8; BioXcell; 10 мг/кг; 3 раза в неделю в/в), а группа 5 получала изотипическое контрольное антитело (клон MOPC21; BioXcell; 10 мг/кг; 3 раза в неделю в/в). Массу тела измеряли два раза в неделю для контроля токсичности. Размер опухоли измеряли дважды в неделю, и объем опухоли рассчитывали по формуле: объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = длина x ширина x высота x 0,5236.

**[0400]** Мышей подвергали эвтаназии на 12-й день, а опухоли собирали, быстро замораживали и хранили при -80°C. РНК экстрагировали и выполняли секвенирование РНК с последующим компьютерным анализом, как показано на Фиг. 12.

**[0401]** Опухоли от мышей, которым вводили CAR-T-клетки, секретирующие VH-VL1 scFv к TGF-β, имели значительно повышенные показатели инфильтрирующих опухоль Т-клеток (CD3d+, CD3e+, CD3g+) и, в частности, CD8+ Т-клеток (CD8a+) и цитотоксических Т-клеток (GzmB+) по сравнению с мышами из других групп (Фиг. 13)

**[0402]** Оценки представленности ssGSEA показали увеличение сигнатур Т-клеток и сигнатур IFNγ в опухолях мышей, которым вводили CAR-T-клетки, секретирующие VH-VL1 scFv к TGF-β, что указывает на усиление инфильтрации CAR-T-клеток и/или активацию эндогенной иммунной системы. Повышенные сигнатуры активированного эндотелия, костимуляции и презентации антигена в опухолях мышей, которым вводили CAR-T-клетки, секретирующие VH-VL1 scFv к TGF-β, ясно демонстрируют активацию эндогенной иммунной системы. Следовательно, бронирование CAR-T-клеток блокирующими антителами (или другими связывающими веществами), ингибирующими

противоопухолевую эффективность пути TGF- $\beta$ , по меньшей мере, частично за счет улучшения эндогенного иммунного ответа. (Фиг. 14)

Пример 11. FACS опухолевых образцов из мышей EMT6-hCD19, получавших лечение «небронированными» CAR-T-клетками

**[0403]** Самкам мышей Balb/c в возрасте 6-16 недель (Jackson Labs) инокулировали  $0,2 \times 10^6$  жизнеспособных опухолевых клеток EMT6-hCD19-Fluc в жировую ткань молочной железы (ортогипотически). Через 6 дней после имплантации размер опухоли достигал примерно 50 мм<sup>3</sup>, и мышей случайным образом распределяли по группам лечения с аналогичным средним размером опухоли (в среднем ~50 мм<sup>3</sup>; n=8 в группе) и лечили циклофосфамидом (CPA; 200 мг/кг внутривенно). На следующий день в хвостовую вену вводили 2 миллиона мышиных CAR-T-клеток от конгенных по CD45.1 мышей Balb/c. Группа 1 получала нетрансдуцированные контрольные Т-клетки, группа 2 получала «небронированные» CAR-T клетки, группа 3 получала CAR-T-клетки, секретирующие мономер VH-VL1 scFv к TGF- $\beta$ . Массу тела измеряли два раза в неделю для контроля токсичности. Размер опухоли измеряли дважды в неделю, и объем опухоли рассчитывали по формуле: объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = длина x ширина x высота x 0,5236.

**[0404]** Мышей подвергали эвтаназии на 7-й день, а опухоли собирали, взвешивали и обрабатывали для анализа методом FACS. Вкратце, опухоли разрезали на мелкие кусочки и расщепляли с использованием наборов для диссоциации опухолей мышей (Miltenyi) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы ресуспендировали в PBS с 2% FCS, фильтровали и помещали в 96-луночный планшет для FACS-окрашивания. Fc-рецепторы блокировали (TruStain FcX (антитело к CD16/32 мыши); Biolegend) и CAR метили в течение 1 часа при 4°C с использованием rhuCD19 (RnD Systems), а затем метили на hCD19-Fc с использованием антител к Fc IgG человека, поверхностные маркеры, включая TCR $\alpha/\beta$ , CD8 $\alpha$ , CD4, CD25, CD62L, CD11b, Gr1, CD11c, CD45.1 и CD45, живые клетки окрашивали с использованием красителя для определения жизнеспособности (ebioscience), а внутриклеточные антигены, включая GzmB, Ki67 и FoxP3, окрашивали с использованием набора буферов для окрашивания Foxp3/фактора транскрипции eBioscience (Thermofisher). Образцы фильтровали и получали данные на проточном цитометре BD Fortessa.

**[0405]** Как показано на Фиг. 15, FACS-окрашивание показало снижение количества опухолевых hCD19<sup>+</sup> клеток в образцах мышей, которым вводили CAR-T-клетки, секретирующие VH-VL scFv к TGF- $\beta$ , по сравнению с контролями, которым вводили нетрансдуцированные клетки или «небронированные» CAR-T-клетки, и увеличение инфильтрации Т-клеток (на мг опухолевой ткани). Гейтирование по CD45.1<sup>+</sup> и CD45.1<sup>-</sup> Т-клеткам демонстрирует, в частности, увеличение инфильтрации эндогенными Т-клетками

(CD45.1-). Перенесенные CAR-T-клетки (CD45.1+) из этих образцов имели более высокий уровень экспрессии CAR, а CD8+ Т-клетки демонстрировали более высокую экспрессию CD25, что указывает на усиление активации. CD8+ Т-клетки из Т-клеток-хозяев (CD45.1-) имели более высокую экспрессию GzmB, что указывает на более высокую цитотоксичность. Таким образом, эти данные FACS указывают на то, что бронирование CAR-T-клеток связывающими агентами к TGF- $\beta$  усиливает функцию CAR-T-клеток и эндогенный иммунный ответ.

Пример 12. Модель ксенотрансплантата демонстрирует улучшенную функцию Т-клеток с CAR к GCC человека, «бронированных» блокирующими антителами к TGF- $\beta$  или к TGF $\beta$ R2

**[0406]** Самкам мышей NSG в возрасте 6–16 недель (Jackson Labs) подкожно инокулировали  $2 \times 10^6$  жизнеспособных опухолевых клеток GSU. Через 7 дней после имплантации размер опухоли достигал примерно 50 мм<sup>3</sup>, и мышей рандомизировали в группы лечения с аналогичным средним размером опухоли (в среднем ~50 мм<sup>3</sup>; n=6 в группе). На следующий день в хвостовую вену вводили 500000 или 100000 Т-клеток с CAR к GCC человека. Группа 1 получала нетрансдуцированные контрольные Т-клетки, группа 2 получала «небронированные» CAR-T клетки, группа 3 получала CAR-T клетки, секретирующие мономер VH-VL1 scFv к TGF-b, группа 4 получала мономер VH3 к TGF $\beta$ R2 и группа 5 получала CAR-T клетки, секретирующие димер VHH к TGF $\beta$ R2. Массу тела измеряли два раза в неделю для контроля токсичности. Размер опухоли измеряли дважды в неделю, и объем опухоли рассчитывали по формуле: объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = длина x ширина x высота x 0,5236. Т-клетки с CAR к GCC, «бронированные» блокирующими антителами к TGF- $\beta$  или к TGF $\beta$ R2, демонстрировали более быструю реакцию, чем «небронированные» контрольные CAR-T, при 500000 пересаженных клеток и повышенную противоопухолевую эффективность при 100000 пересаженных CAR-T-клеток. (Фиг. 16).

**[0407]** Концентрации модуляторов TGF $\beta$  в опухоли и плазме определяли с использованием анализа методом ЖХ/МС с иммунным захватом антителом к Flag. Как показано на Фиг. 17A-17D, низкие количества секретируемого антитела к TGF- $\beta$  или антитела к TGF $\beta$ R2 в кровотоке мышей, получавших лечение «бронированными» CAR-T-клетками. Плазму собирали у мышей, которым вводили указанное количество «бронированных» или «небронированных» Т-клеток с CAR к GCC, используя пробирки с ЭДТА.

**[0408]** Как показано на Фиг. 20А-20С, «бронированные» CAR-T-клетки также продемонстрировали противоопухолевую активность в положительных по GСC моделях ксенотрансплантатов GSU, HT55 и MDA-MB-231-FP4 Luc.

**[0409]** Метастазы в печень оценивали с помощью внутриселезеночной инъекции опухолевых клеток HT55 с последующей внутривенной инъекцией CAR-T-клеток. «Бронированные» CAR-T-клетки замедляли метастазирование в печень по сравнению с изотипическим контролем (Фиг. 21А-21С)

Пример 13. Повторная стимуляция антигеном в GСC-положительных опухолях

**[0410]** 100000 Т-клеток с CAR к GСC, «небронированных» или «бронированных» (коэкспрессирующих CAR к GСC и модулятор TGFβ (например, TGFβR2-VНН)) совместно культивировали в двух повторностях с 200000 опухолевых клеток HT29-GСC или исходных опухолевых клеток HT29 (отрицательных по GСC) в присутствии или в отсутствие TGF-β (1 нг/мл или 10 нг/мл). Каждые 3-4 дня половину CAR-T-клеток на лунку переносили на новый планшет с опухолевыми клетками в тех же условиях (с или без TGF-β 1 нг/мл или 10 нг/мл). Супернатанты собирали и замораживали для последующей оценки. Клетки оценивали для подсчета клеток и анализа FACS-окрашивания

**[0411]** Опухолевые клетки оценивали с помощью CellTiterGlo (Promega) в соответствии с протоколом производителя. Планшеты анализировали с помощью планшетного ридера Pherastar. Процент уничтожения оценивали по следующей формуле:

$$\% \text{ уничтожения} = (1 - (\text{сигнал от тестируемой лунки} / \text{сигнал от контрольной лунки})) * 100$$

**[0412]** Контрольные лунки содержали опухолевые клетки, совместно культивируемые с нетрансдуцированными Т-клетками от того же донора, что и используемые CAR-T-клетки. FACS-окрашивание проводили один раз в неделю с использованием конъюгированных с флуорохромом антител к CD4, CD8, CD25 человека и антител к маркерам истощения PD-1, TIM-3, Lag-3 и TIGIT (Biolegend). Мертвые клетки исключали с помощью фиксирующего красителя для определения жизнеспособности Efluor 506 (ThermoFisher; согласно протоколу производителя). Клетки, экспрессирующие CAR, инкубировали с GСC-hFc в течение 1 часа при 4°C, промывали PBS с 2% FCS и обнаруживали с помощью вторичного мышиного антитела к IgG человека (30 минут, 4°C).

**[0413]** После нескольких циклов повторной стимуляции клетками-мишенями, моделирующими хроническую активацию антигена, TGF-β индуцирует ингибирование функции CAR-T-клеток. Только CAR-T-клетки, секретирующие модулятор TGFβ (например, димер VНН к TGFβR2), защищены от ингибирующего действия стимуляции TGF-β (1 нг/мл или 10 нг/мл) (Фиг. 18А-18С). Ингибирующий эффект на уничтожение

CAR-T-клетками коррелирует с ингибированием пролиферации и индукцией маркера истощения Lag3.

*Пример 14. Повторная стимуляция антигеном в мезотелин (Msln)-положительных опухолях*

**[0414]** Приблизительно 100000 полученных из iPSC T-клеток с CAR к Msln, коэкспрессирующих CAR к Msln вместе с модулятором TGFβ (например, VH к TGFβR2 или dnTGFβR2) или контрольным VH к GFP (контрольный VH к Msln), совместно культивировали в двух повторностях с 40000 опухолевых клеток MiaPaca-2, сверхэкспрессирующих Msln человека, в присутствии или в отсутствие TGF-β (R&D Systems, 10 нг/мл). VH к TGFβR2 секретировался из CAR-T-клетки, в то время как dnTGFβR2 был связан с мембраной CAR-T-клетки. Каждые 3-4 дня, половину CAR-T-клеток на лунку переносили на новый планшет с опухолевыми клетками в тех же условиях (с или без TGF-β, 10 нг/мл). Супернатанты собирали и замораживали для последующей оценки. CAR-T-клетки подсчитывали с помощью проточной цитометрии и проводили FACS-фенотипирование в выбранные моменты времени (**Фиг. 22A**).

**[0415]** Жизнеспособность опухолевых клеток оценивали с помощью CellTiterGlo (Promega) согласно протоколу производителя. Планшеты анализировали с помощью планшетного ридера Pherastar. Процент уничтожения оценивали по следующей формуле:

$$\% \text{ уничтожения} = 1 - \left[ \frac{(\text{сигнал от тестируемой лунки})}{(\text{сигнал от контрольных лунок})} \right] \times 100$$

**[0416]** Контрольные лунки содержали только опухолевые клетки без эффекторных (то есть CAR-T) клеток. Процент цитотоксичности показан на **Фиг. 22B**.

Подсчет клеток проводили путем исключения мертвых клеток с использованием красителя Sytox Red (Thermofisher, в соответствии с протоколом производителя), и равные объемы клеточной суспензии получали на проточном цитометре Fortessa (BD Biosciences) с использованием автоматического пробоотборника HTS. Живые CAR-T-клетки подсчитывали путем гейтирования живых клеток, отдельных клеток и по их размерам. Результаты экстраполировали для того, чтобы получить количество клеток на лунку.

**[0417]** Было замечено, что после нескольких циклов повторной стимуляции клетками-мишенями, имитирующих хроническую антигенную активацию, TGF-β индуцировал ингибирование функции CAR-T-клеток (т.е. уничтожение) и ингибировал пролиферацию CAR-T-клеток. Только CAR-T-клетки, экспрессирующие модулятор TGFβ (например, секреция димера VH к TGFβR2 или экспрессия мембраносвязанного

dnTGFbR2), но не контрольную VH, были защищены от ингибирующего эффекта TGF- $\beta$  (10 нг/мл).

## ТАБЛИЦА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

**[0418]** В таблице 5 ниже приведены описания и последовательности, описанные в данном документе.

*Таблица 5. Таблица последовательностей*

Описание/SEQ ID NO	Последовательность
SEQ ID NO: 1 TGFb scFv VH-VL1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQG LEWMGGVIPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSE DTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYADSPITFGQGTRLEIKR
SEQ ID NO: 2 TGFb scFv VH-VL2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQG LEWMGGVIPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSE DTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYADSPITFGQGTRLEIKR
SEQ ID NO: 3 TGFb scFv VL-VH	ETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ YADSPITFGQGTRLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLVQSGAEV KKPGSSVKV SCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVIPIV DIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTL GLVLDAMDYWGQGT LVTVSS
SEQ ID NO: 4 TGFbR2 scFv VH-VL	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGK GLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKS RATISIDTSKSFSLKLSSVTAAD TAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSEIVLTQSPATLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQ

	RSNWPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 5 TGFbR2 scFv VL-VH	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPR LLIYDASNRAITGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRS NWPPTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSSQLQVQESGPGLVKP SETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEKT YYNPSLKSRATISIDTSKSSQFSLKLSVTAADTAVYYCPRGPTMIR GVIDSWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 6 mTGFbR2 VH1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFTTYGMGWVRQAPGK GLEWVSWIEKTGNKTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKARHIKVR SRDFDYWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 7	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFTTYGMGWVRQAPGK GLEWVSWIEKTGNKTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKAGRHIKVR SRDFDYWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 8 hTGFbR2 VH1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK GLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLV LTVSS
SEQ ID NO: 9 TGFbR2 VHH димер	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK GLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLVTVSSggggsEVQLLE SGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVS RIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 10	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK GLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLVTVSSgggsggggsEV QLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGL EFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 11	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK GLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSGGSEP K SsDK THTCP PCgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 12	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK GLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSGGSEP K SsDK THTCP PCgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGggggsggsEVQLLESG GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRID SPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 13	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK GLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSgggssggsgGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 14	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK GLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSgggssggsgGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGggggsggsEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDY WGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 15	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGK GLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKRRPTGVSGTFYDYWGQGTLVTVSSggggsEVQ LLE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVS RIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV

	<p>YYCAKRRPTGVSGETFYDYWGQGTLLTVSSggggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRITYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGETFYDYWGQGTLLTVSS</p>
SEQ ID NO: 16	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGETFYDYWGQGTLLTVSSggggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGETFYDYWGQGTLLTVSSggggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGETFYDYWGQGTLLTVSSggggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGETFYDYWGQGTLLTVSSgggsggggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGETFYDYWGQGTLLTVSSgggsggggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGETFYDYWGQGTLLTVSSgggsggggsEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTEQMWWVRQAPGKGLEFVSRIDSPGGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRPTGVSGETFYDYWGQGTLLTVSS</p>
SEQ ID NO: 17 TGFb-scFv VH-VL1 G4S димер	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVIPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGRLEIKggggsQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVIPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGRLEIK</p>

<p>SEQ ID NO: 18  TGFb-scFv VH-  VL1 2xG4S  димер</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQG  LEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSE  DTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG  GGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQ  KPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV  YYCQQYADSPITFGQGTRLEIKggggsggggsQVQLVQSGAEVKKPG  SSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIANY  AQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLD  AMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTL  SLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRA  PGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGT  RLEIK</p>
<p>SEQ ID NO: 19  Миниантитело  VH-VL1 scFv к  TGFb + шарнир</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQG  LEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSE  DTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG  GGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQ  KPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV  YYCQQYADSPITFGQGTRLEIKGGSEPKSsDKTHTCPPCgggsgggsg  GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG  QPENNYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPG</p>
<p>SEQ ID NO: 20  Димер  миниантитело  VH-VL1 scFv к  TGFb + шарнир</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQG  LEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSE  DTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG  GGGSALETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQ  KPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV  YYCQQYADSPITFGQGTRLEIKGGSEPKSsDKTHTCPPCgggsgggsg  GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG  QPENNYKTTTPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGggggsggsQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV  CKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFK  GRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDY  WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSALETVLTQSPGTLSLSPG  ERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPD</p>

	RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 21 TGFb-scFv VH-VL1 минибоди	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIV DIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGSALETVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIV DIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGSALETVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGggggsggsQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIV DIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGSALETVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIK
SEQ ID NO: 23	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSL KSRATISIDTSKSQFSLKLSSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNW PPTFGQGTKVEIKggggsQLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSL KSRATISIDTSKSQFSLKLSSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA

	SQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 24	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGK GLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRA TISIDTSKSQFSLKLSSVTAAD TAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSEPEDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQGTKVEIKggggsggggsQLQVQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLK SRATISIDTSKSQFSLKLSSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWG QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG SGTDFLTISSEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID NO: 25	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGK GLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRA TISIDTSKSQFSLKLSSVTAAD TAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSEPEDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQGTKVEIKGGSEPKSsDKTHTCPPCgggsgggsgGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 26	QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGK GLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRA TISIDTSKSQFSLKLSSVTAAD TAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSEPEDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQGTKVEIKGGSEPKSsDKTHTCPPCgggsgggsgGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGggggsggsQLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKSRA TIS IDTSKSQFSLKLSSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS

	QSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGKVEIK
SEQ ID NO: 27	QLQVQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGK GLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKS RATISIDTSKSQFSLKLSSVTAAD TAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQGKVEIKgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 28	QLQVQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGK GLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKS RATISIDTSKSQFSLKLSSVTAAD TAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ RSNWPPTFGQGKVEIKgggssggsgGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGggggs ggsQLQVQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPP GKGLEWIGSFYYGEKTYYNPSLKS RATISIDTSKSQFSLKLSSVTA ADTAVYYCPRGPTMIRGVIDSWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQRSNWPPTFGQGKVEIK
SEQ ID NO: 29 TGFbR2 VH2	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGQESMYWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKSGTRIKQGF DYWGQGT LVTVSS
SEQ ID NO: 30 TGFbR2 hVH2	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTEYRMWVRQAPGK GLEWVSAIEPIGHR TY YANSVRGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKQAPGEKWARRWDL DYWGQGT LVTVSS
SEQ ID NO: 31 TGFbR2 VH3	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTDQMWVRQAPGK GLEFVSRIDSPGGRTYYANSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA

	EDTAVYYCAKRQPAGVSGKYVDYWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 32 mTGFbR2ECD (I24-K31,F57- L185)	IPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSNRTIHPLKHFNSDVMASDNGG AVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAV WRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAG ETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDL
SEQ ID NO: 33 huTGFbR1+2 ECD v1	LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIP RDRPFVCAPSSKTGSVTTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPV EGGGGSTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVAVWRKNDENITLETVCHDPK LPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPKGETFFMCSCSSDECNDNIIFSE EYNTSNPD [hTGFbR1-ECD(L34-E125)- hTGFbR2-ECD(A44-D151)]
SEQ ID NO: 34 huTGFbR1+2 ECD v2	QCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPR DRPFVCAPSSKTGSVTTTTYCCNQDHCNGGGGSAVKFPQLCKFCD VRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVAVWRKNDENITLETV CHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPKGETFFMCSCSSDECND NIIFSE [hTGFbR1-ECD(Q35-N107)-4GS- 4GS-hTGFbR2-ECD(L34-E125)]
SEQ ID NO: 35 mTGFbR1+2 ECD v1	LQCFCHLCTKDNFTCETDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIP RDRPFVCAPSSKTGAVTTTTYCCNQDHCNKIELPTTGPFSEKQSAG LGPVELGGGGSIPPHVPKSVNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCDV RLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVC HDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKEKKRAGETFFMCACNMEECN DYIIFSEEYTTSSPD [mTGFbR1-ECD(L30-L126)-4GS-mTGFbR2-ECD(I24-K31,F57- D184)]
SEQ ID NO: 36 huTGFbR1+2 ECD v2	QCFCHLCTKDNFTCETDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPR DRPFVCAPSSKTGAVTTTTYCCNQDHCNGGGGSAVKLPQLCKFCD VRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLET VCHDPKLTYPHGFTLEDAASPKCVMKE [mTGFbR1-ECD(Q31-N107)-4GS-mTGFbR2-ECD(I24-K31,F57- E150)]

SEQ ID NO: 37 BKД TGFbR2 мышь с IgKss	METDTLLLWVLLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSC NRTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKS CMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHG FTLEDAASPCKVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTT SSPDL
SEQ ID NO: 38 Димер BKД TGFbR2 мышь с линкером 8(G4S) и IgKss с меткой Flag	METDTLLLWVLLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSC NRTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKS CMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHG FTLEDAASPCKVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTT SSPDLGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDVMASDN GGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCV AVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPCKVMKEKKR AGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDLGGGG <b>DYKDDDDK</b>
SEQ ID NO: 39 TGFbR2 ECD димер	METDTLLLWVLLLWVPGSTGIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSC NRTIHPLKHFNSDVMASDNGGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKS CMSNCSITAICEKPHEVCVAVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHG FTLEDAASPCKVMKEKKRAGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTT SSPDLGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSIPPHVPKSDVEMEAQKDASIHLSCNRTIHPLKHFNSDVMASDN GGAVKLPQLCKFCDVRLSTCDNQKSCMSNCSITAICEKPHEVCV AVWRKNDKNITLETVCHDPKLTYPHGFTLEDAASPCKVMKEKKR AGETFFMCACNMEECNDYIIFSEEYTTSSPDL
SEQ ID NO: 40 Мономер1 BKД huTGFbR2	LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIP RDRPFVCAPSSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPV E
SEQ ID NO: 41 Шарнирный домен CD28	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP
SEQ ID NO: 42 Трансмембранн ый домен CD28	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

SEQ ID NO: 43 Шарнирный / трансмембранный домен CD28	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVV GGVLACYSLLVTVAFIIFWV
SEQ ID NO: 44 Сигнальный домен CD28	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
SEQ ID NO: 45 Мутантный сигнальный домен CD3z-1XX	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR
SEQ ID NO: 46 КОМБИНИРОВАННЫЕ трансмембранные и внутриклеточные домены CAR	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVV GGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR
SEQ ID NO: 47 CAR к GCC V1-01	MGWSCIILFLVATATGVHSEVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG ASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSV DTPKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRG TLVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR
SEQ ID NO: 48 CAR к GCC V51	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRDYNKDYWGQGTLLVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVK

	FSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR
SEQ ID NO: 49 scFv к CD19	MGTSLLCWMALCLLGADHADAQVQLQQSGPELVKPGASVKISC KASGYAFSSSWMNWVKQRPG KGLEWIGRIYPGDEDTNYSGKFKDKATLTADKSSTAYMQLSSL TSEDSAVYFCARSLLYGDY LDYWGGQTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASP GEKVTMTCSASSSVSYMHW YQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVDPDRFSGSGSGTSYFLTINNMEA E DAATYYCQQWNINPLTF GAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIFWVL WGGV LACYSLLVTVAFI IFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYR SRDQRLPPDAHKPPGGGSRFTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSA DAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA EAYSEIGMKGERRRRGKGH DGLFQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
CAR к GCC V5 SEQ ID NO: 50	MELGLSWVFLVAILEGVQCQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS GFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEKYYVDSVKGR FTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCATDYTRDVWGQGT AVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPS KPFWV L V V V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W V RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (SEQ ID NO:)
CAR к GCC V36 SEQ ID NO: 51	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLAQPGGSLRLSCAAS GFTFSRYWMTWVRQAPGGRLEWVAKIKYDGSEKYYADSVKGR FTISRDNANKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCTR DYNKDYWGQGT LAVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPS KPFWV L V V V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W V RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP

	EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: )
CAR <sub>κ</sub> GCC V1 SEQ ID NO: 52	MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLQESGGLVVKPSETLSLTCTVSG ASISHYYWSWFRQPAGKGLEWIGRIYPSGSTSYNPSLKSRVAMSV DTPKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARDRSTGWSEWNSDLWGRG TLVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFP PSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQG QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: )
CAR <sub>κ</sub> GCC V48 SEQ ID NO: 53	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQP GGSLRLTCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGKGLEWVAKIRHDGGEK YYPDSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMDNLRAEDTAMYYCTR DYNKDLWGQGT LVTVSSRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGT IIHVKGKHLCPSPFP GP SKPFWVLVVVGGVLACYSLL VTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKH YPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNP QEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (SEQ ID NO: )
CAR <sub>κ</sub> GCC V8 SEQ ID NO: 54	QVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGK GLEWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISR DNAKNSVYLQMNSL RAEDTG VYYCATDFTRDVWGQGT TVTSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGT IIHVKGKHLCPSPFP GSKPFW VLVVVGGVLACYSLL VTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMN MTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNP QEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (
CAR <sub>κ</sub> GCC V9 SEQ ID NO: 55	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSRYWMTWVRQAPGR GLEWVAKIRYDGGEKYYVDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCATDF TRDVWGQGT TVTSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGT IIHVKGKHLCPSPFP GSKPFW VLVVVGGVLACYSLL VTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMN MTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (
CAR к GCC V30 SEQ ID NO: 56	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFGRYWMSWVRQAPGK GREWVAKIKYDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCATDFTRDVWGQGTITVTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFW VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (
CAR к GCC V31 SEQ ID NO: 57	QVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGK GREWVAKIKYDGSEKYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RADDTAVYYCATDFTRDVWGQGTITVTVSS RAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFW VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGH DGLFQGLSTATKDTFDALHMQUALPPR (
SEQ ID NO: 58 P2A	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP
SEQ ID NO: 59 Линкер G4S	GGGGS
SEQ ID NO: 60 Линкер 2x G4S	GGGSGGGGS
SEQ ID NO: 61	GGGSGGGGSGGGGS
CAR к CD19 мышь SEQ ID NO: 62	METDTLLLWVLLWVPGSTGEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKA SGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKG QATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFDY WGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDR VSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDFR TGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIK

	<p>IEFMYPYLDNERSNGTIIHIKEKHLCHTQSSPKLFWALVVVAGV  LFCYGLLVTVALCVIWTNSRRNRLQLQSDYMNMTPRRPLTRKPY  <u>QPYAPA</u>  <u>RDFAAAYRPRAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLE</u>  KKRARDPEMGGKQQRRRNPQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTK  GERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQLAPR</p>
<p>CAR к CD19  человека (с CD3-  1xx)  SEQ ID NO: 63</p>	<p>MALPVTALLLPLALLHAEVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGY  AFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQAT  LTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFDYWG  QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVS  VTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTG  SGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRA  AAIEVMYPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLV  VVGGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGP  TRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL  NLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGFLNELQKDKM  AEAFSEIGMKGERRRGKGHGGLFQGLSTATKDTFDALHMQLALPP  R</p>

## ЭКВИВАЛЕНТЫ И ОБЪЕМ

**[0419]** Специалистам в данной области техники станет понятно или они смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, существование многочисленных эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в данном документе. Объем настоящего изобретения не предназначен для ограничения вышеприведенным описанием, а скорее изложен в следующей формуле изобретения.

**[0420]** 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.

**[0421]** 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.

**[0422]** 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.

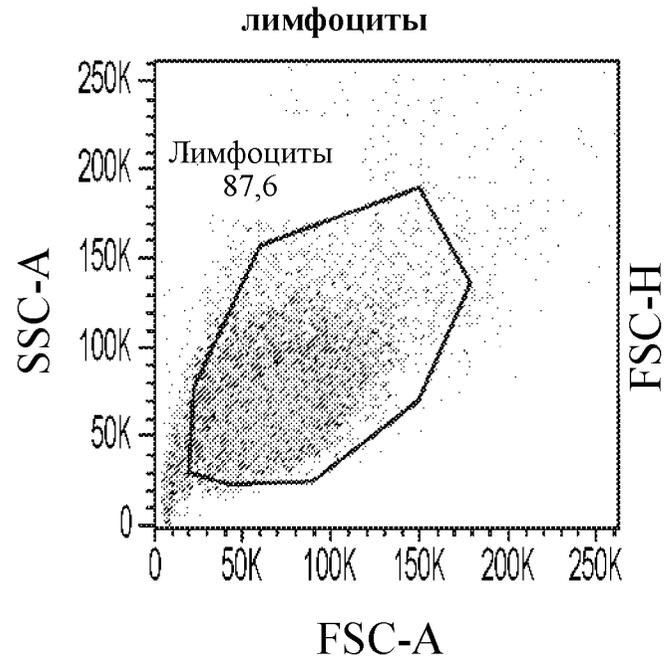
### **Формула изобретения:**

1. Популяция генетически сконструированных Т-клеток, содержащих химерный антигенный рецептор (CAR), который распознает ассоциированный с раком антиген, и модулятор сигнального пути TGF $\beta$ .
2. Популяция клеток по п. 1, отличающаяся тем, что CAR распознает антиген, выбранный из группы, состоящей из ADGRE2, CLEC12, CAIX, CEA, CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD133, CD138, антигена клетки, инфицированной цитомегаловирусом (CMV), CEACAM 5, клаудина 18.2, EGP-2, EGP-40, EpCAM, erb-B2,3,4, FBP, фетального ацетилхолинового рецептора, фолатного рецептора альфа, GCC (также известного как GUCY2C), GD2, GD3, HER-2, hTERT, IL-13R-a2, х-легкой цепи, KDR, LeY, молекулы клеточной адгезии LI, MAGE-AI, MUC1, MUC13, мезотелина, лигандов NKG2D, NY-ES0-1, онкофетального антигена (h5T4), PSCA, PSMA, PTK7, ROR1, TAG-72, TROP2, VEGF-R2 и WT-1.
3. Популяция клеток по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что модулятор сигнального пути TGF $\beta$  связывается с TGF $\beta$  или рецептором TGF $\beta$ .
4. Популяция клеток по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что модулятор сигнального пути TGF $\beta$  содержит аминокислотную последовательность, выбранную из таблицы 1.
5. Популяция клеток по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что CAR представляет собой CAR к CD19 или CAR к GCC.
6. Популяция клеток по п. 1, отличающаяся тем, что клетки являются аутологичными.
7. Популяция клеток по п. 1, отличающаяся тем, что клетки являются аллогенными.
8. Популяция клеток по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что клетки генетически модифицированы с использованием вектора, содержащего первую нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид CAR, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую модулятор сигнального пути TGF $\beta$ .

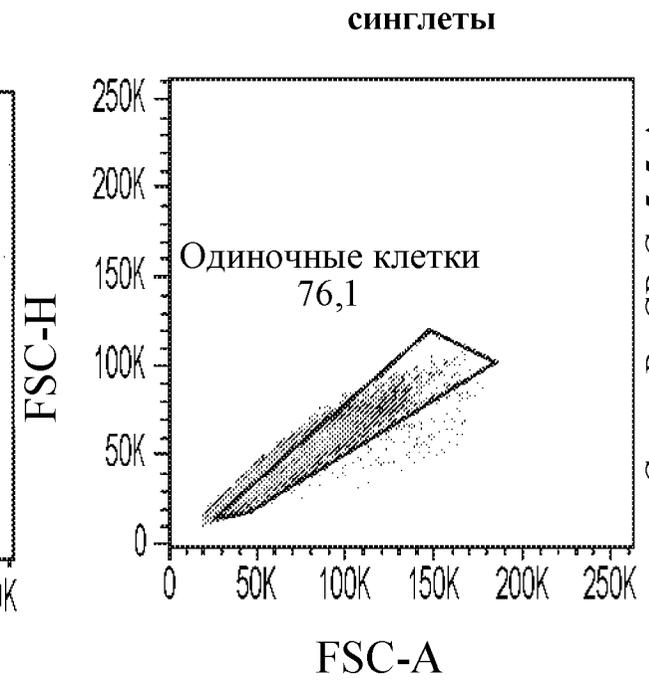
9. Популяция клеток по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что клетки генетически модифицированы с использованием двух векторов, при этом первый вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид CAR, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую модулятор сигнального пути TGF $\beta$ .
10. Популяция клеток по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, выбранный из группы, состоящей из сигнального домена CD3 $\zeta$ -цепи, CD97, 2B4 GDI 1a-CD18, CD2, ICOS, CD27, CD154, CDS, OX40, 4-1BB, DAP10, DAP12, CD28 или их комбинаций и вариантов.
11. Популяция клеток по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что CAR содержит трансмембранный домен, полученный из трансмембранного домена, выбранного из группы, состоящей из CD3, CD8, CD28, OX40, CD27, 4-1BB, DAP10, DAP12 или их комбинаций.
12. Вектор, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид CAR, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую модулятор сигнального пути TGF $\beta$ .
13. Вектор по п. 12, дополнительно содержащий сайт внутренней посадки рибосомы.
14. Вектор по п. 12, дополнительно содержащий сайт саморасщепления 2A.
15. Иммунная клетка, модифицированная вектором по любому из пп. 12-14.
16. Иммунная клетка по п. 15, отличающаяся тем, что клетка представляет собой Т-клетку.
17. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию иммунных клеток по п. 1.
18. Способ модулирования иммунного ответа у хозяина, включающий введение хозяину популяции клеток по п. 1, отличающийся тем, что модуляция иммунного ответа включает одно или более из следующих эффектов иммунных клеток хозяина: увеличение продукции IFN $\gamma$ ; увеличение продукции IL-2; увеличение презентации антигена; и увеличение пролиферации.

19. Способ лечения или предупреждения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества популяции клеток по п. 1.

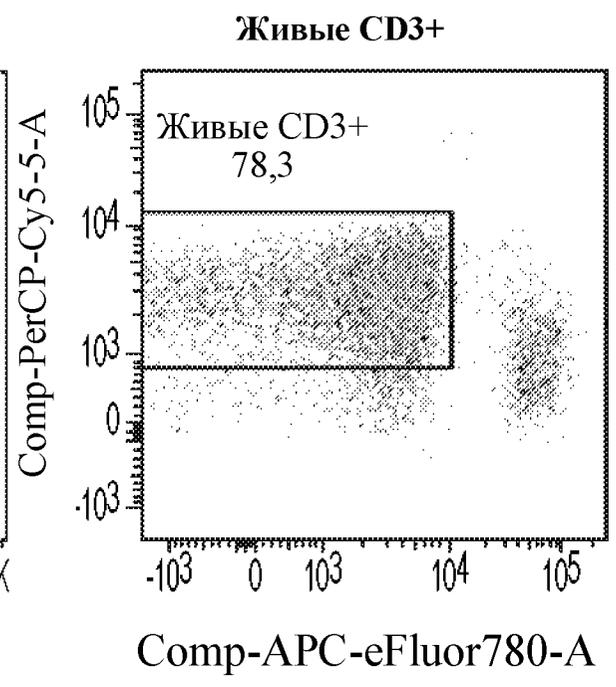
20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из лейкоза, острого лейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза, острого миелоцитарного лейкоза, острого миелобластного лейкоза, острого промиелоцитарного лейкоза, острого миеломоноцитарного лейкоза, острого моноцитарного лейкоза, острого эритролейкоза, хронического лейкоза, хронического миелоцитарного лейкоза, множественной миеломы, хронического лимфолейкоза, истинной полицитемии, лимфомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, макроглобулинемии Вальденстрема, болезни тяжелых цепей, солидных опухолей, саркомы, карциномы, фибросаркомы, миксосаркомы, липосаркомы, хондросаркомы, остеогенной саркомы, хордомы, ангиосаркомы, эндотелиосаркомы, лимфангиосаркомы, лимфангиоэндотелиосаркомы, синовиомы, мезотелиомы, опухоли Юинга, лейомиосаркомы, рабдомиосаркомы, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака яичников, рака предстательной железы, плоскоклеточного рака, базально-клеточной карциномы, аденокарциномы, карциномы потовых желез, карциномы сальных желез, папиллярной карциномы, папиллярной аденокарциномы, цистаденокарциномы, медуллярной карциномы, бронхогенного рака, почечно-клеточного рака, гепатомы, гепатоцеллюлярной карциномы, карциномы желчного протока, хориокарциномы, семиномы, эмбриональной карциномы, опухоли Вильмса, рака шейки матки, рака матки, рака яичка, карциномы легкого, мелкоклеточного карциномы легкого, карциномы мочевого пузыря, колоректального рака, эпителиального рака, глиомы, астроцитомы, медуллобластомы, краниофарингиоми, эпендимомы, пинеаломы, гемангиобластомы, акустической невромы, олигодендроглиомы, шванномы, менингиомы, меланомы, нейробластомы, ретинобластомы и их метастазов.



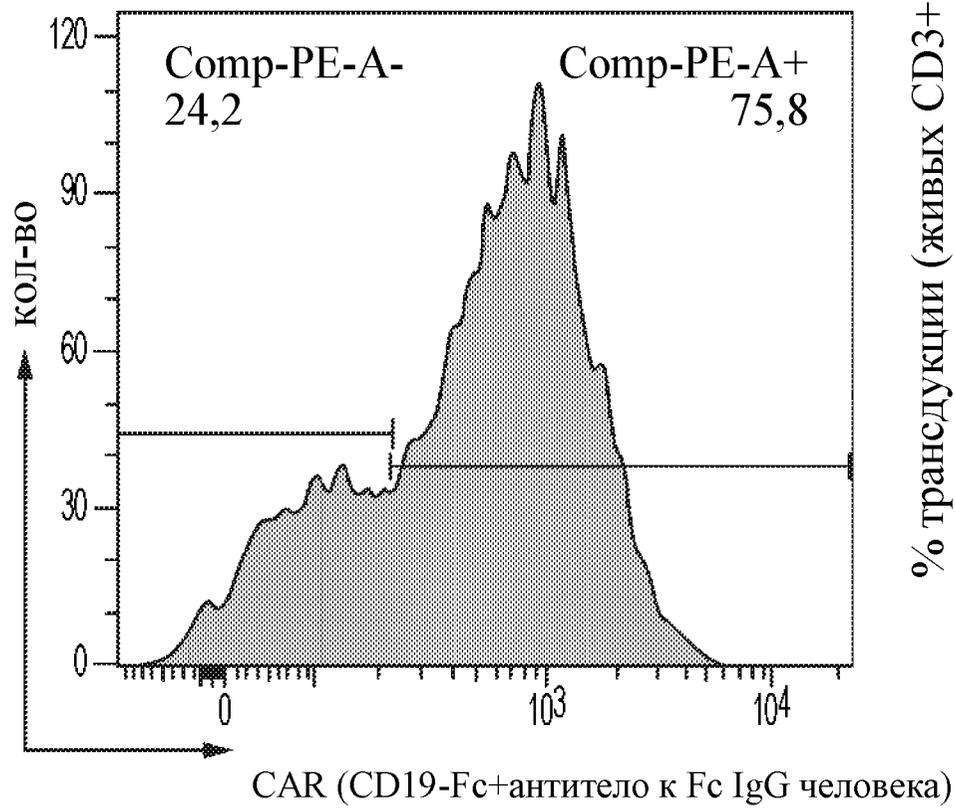
Фиг. 1А



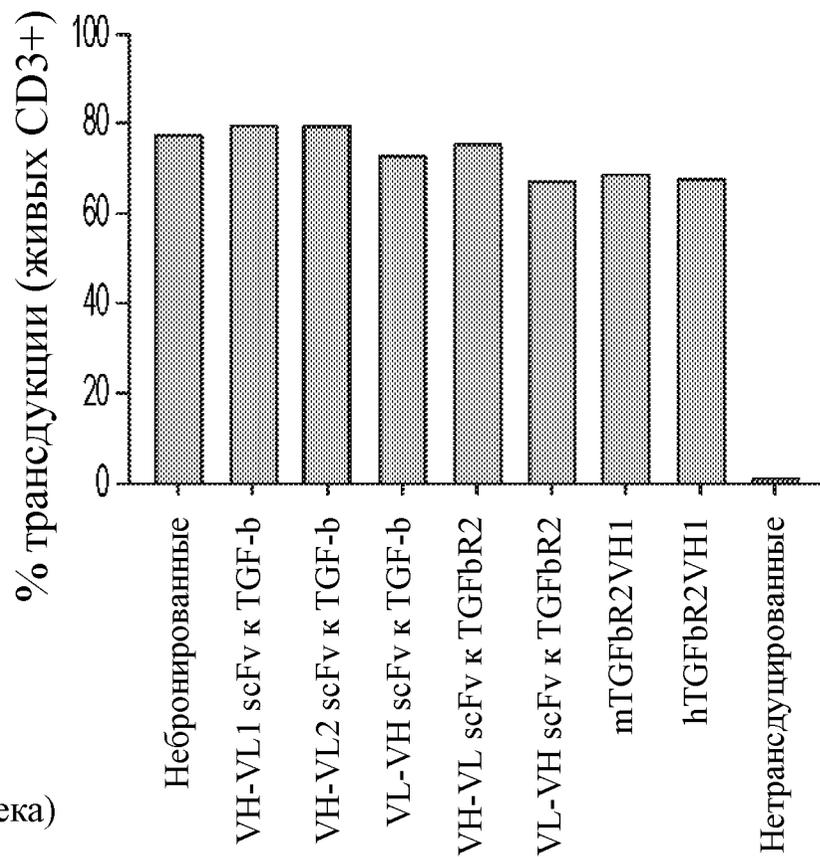
Фиг. 1В



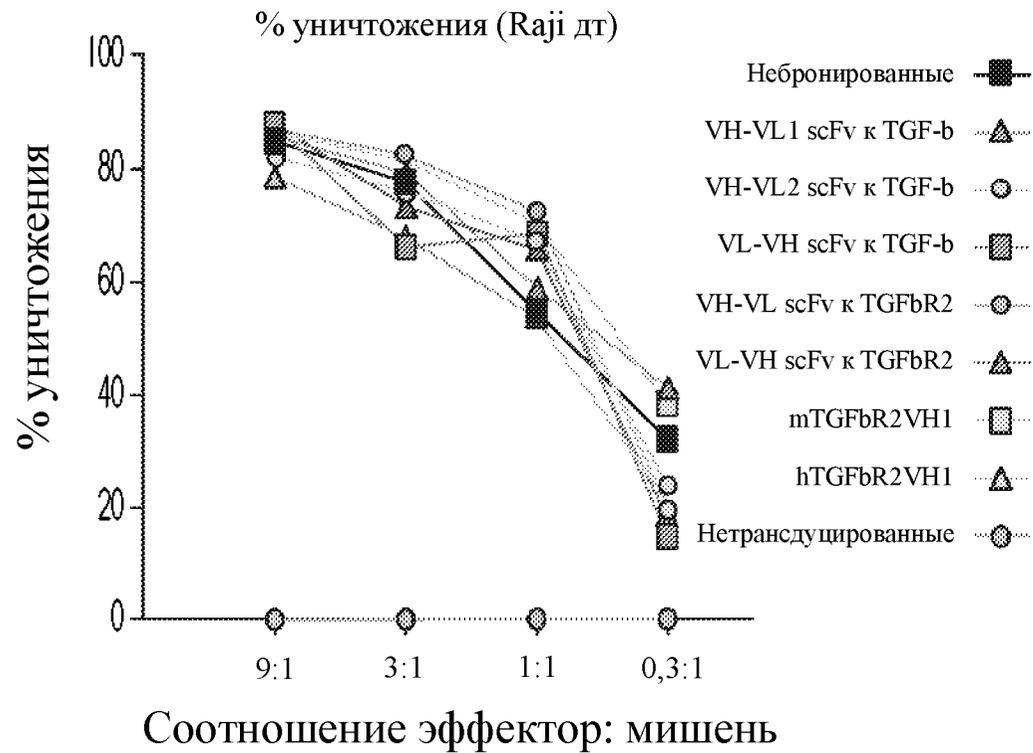
Фиг. 1С



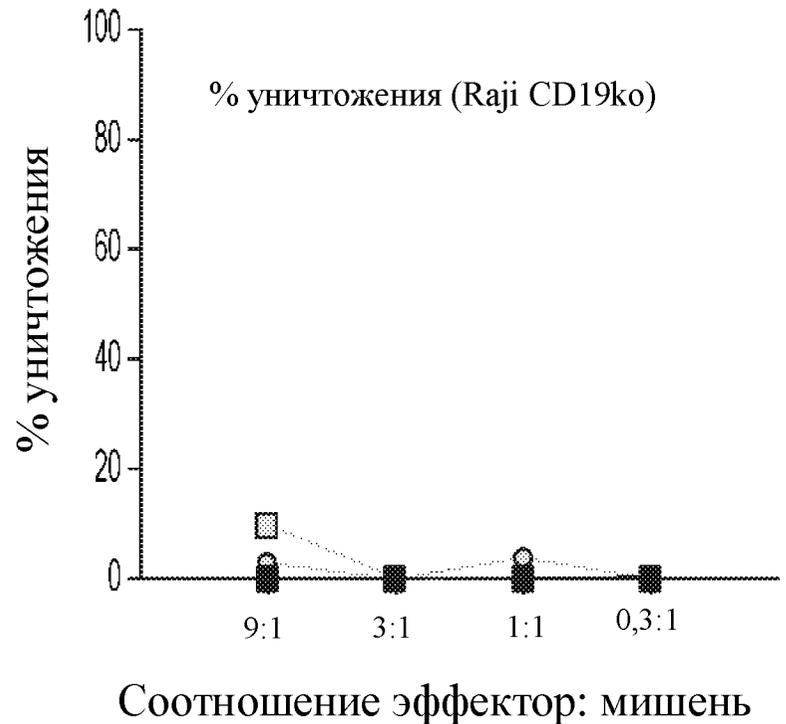
Фиг. 1D



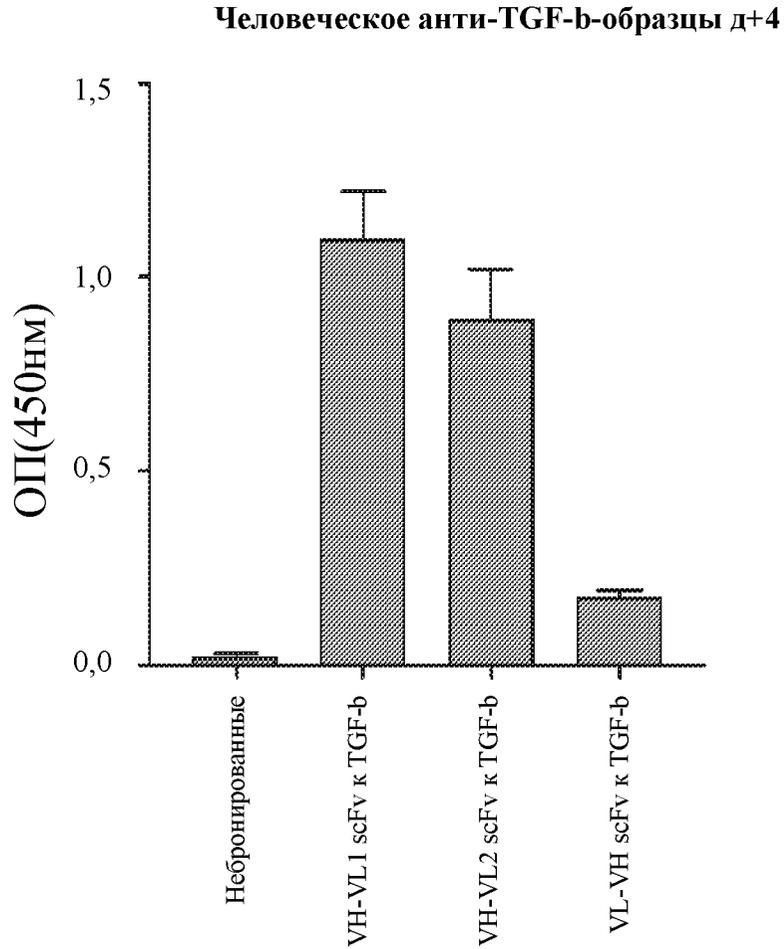
Фиг. 1E



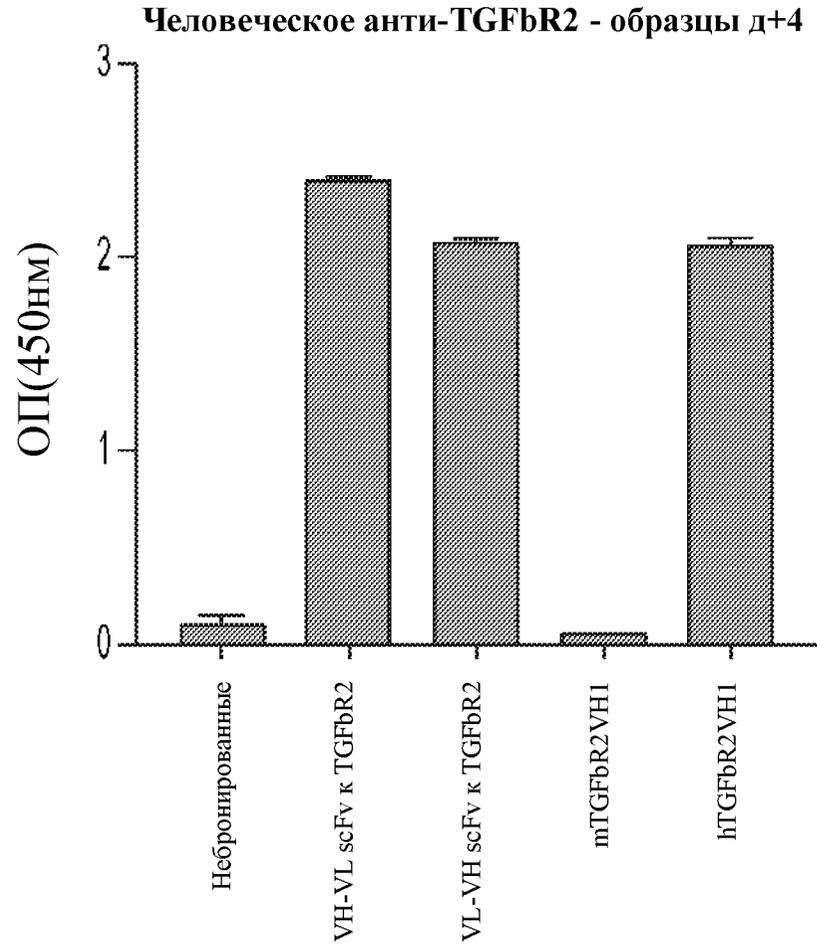
Фиг. 2А



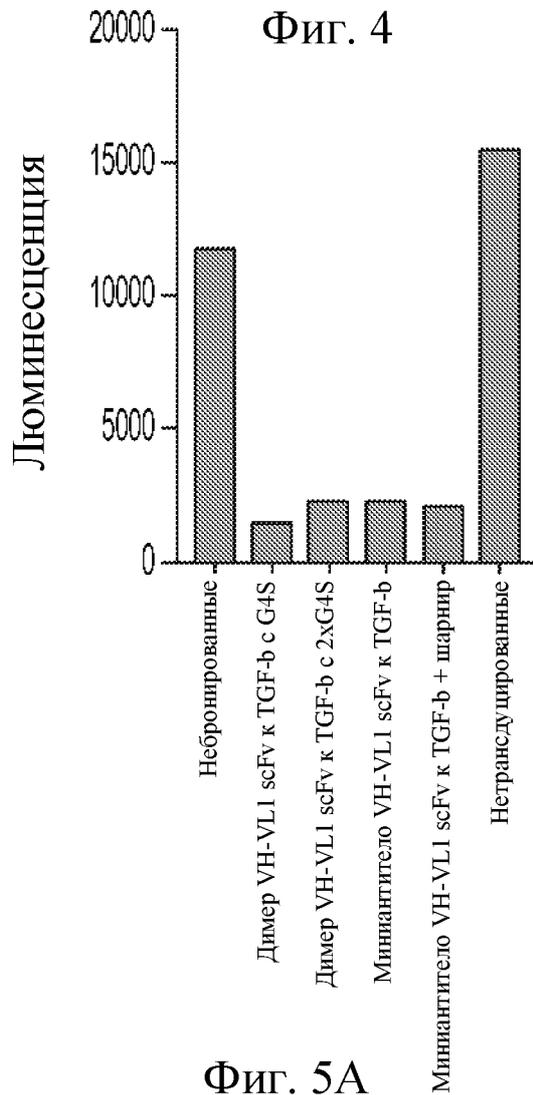
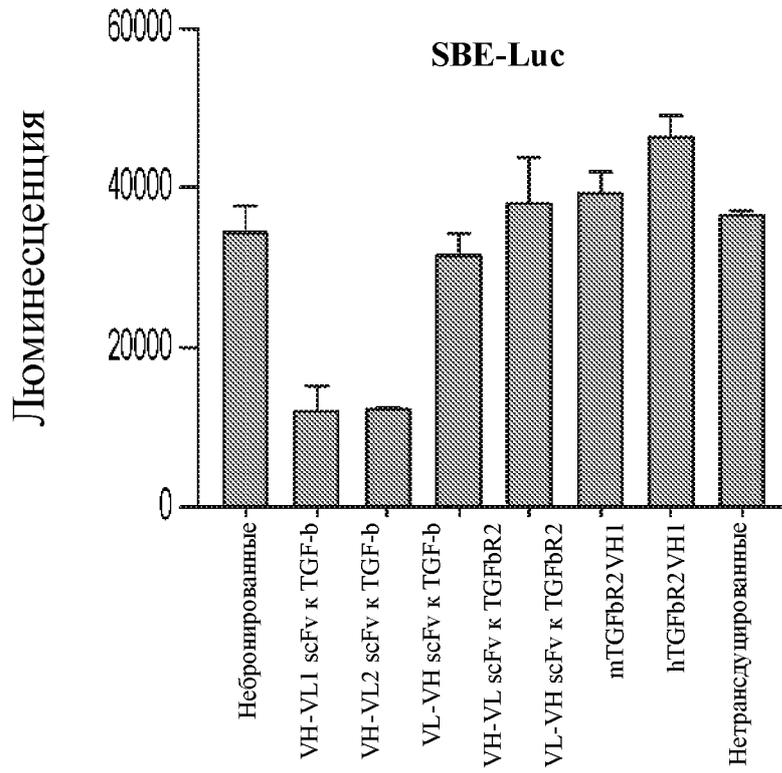
Фиг. 2В



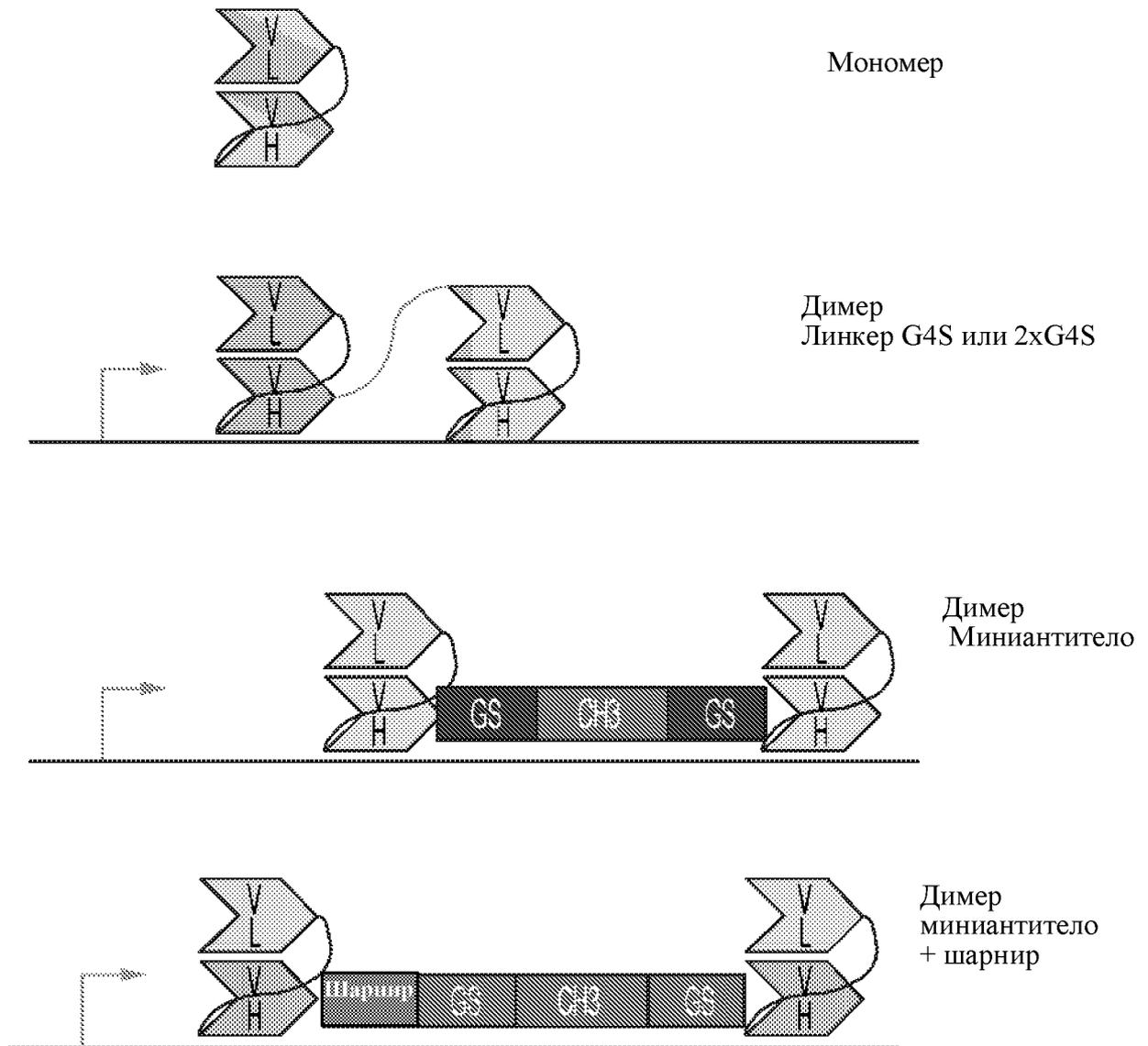
Фиг. 3А



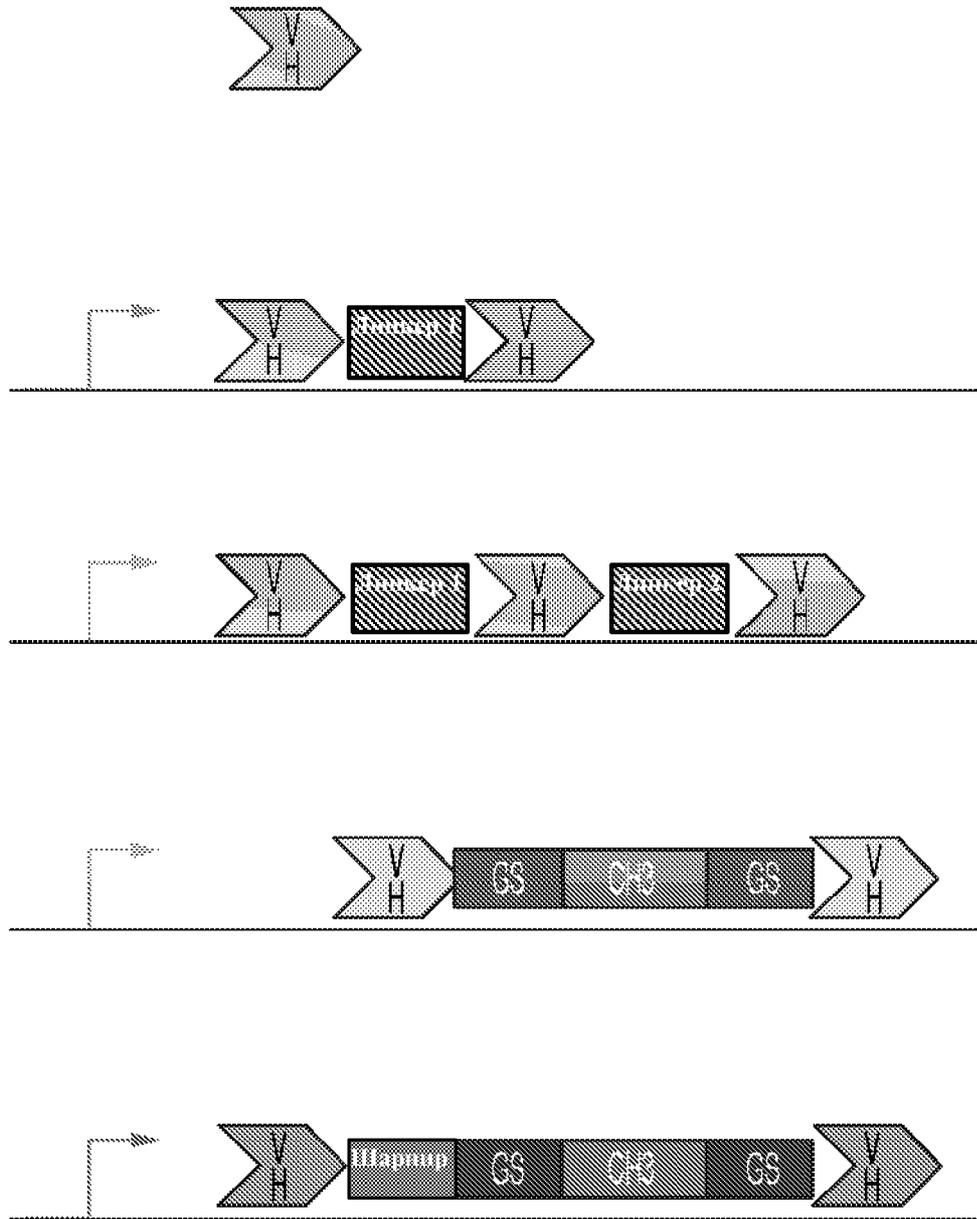
Фиг. 3В



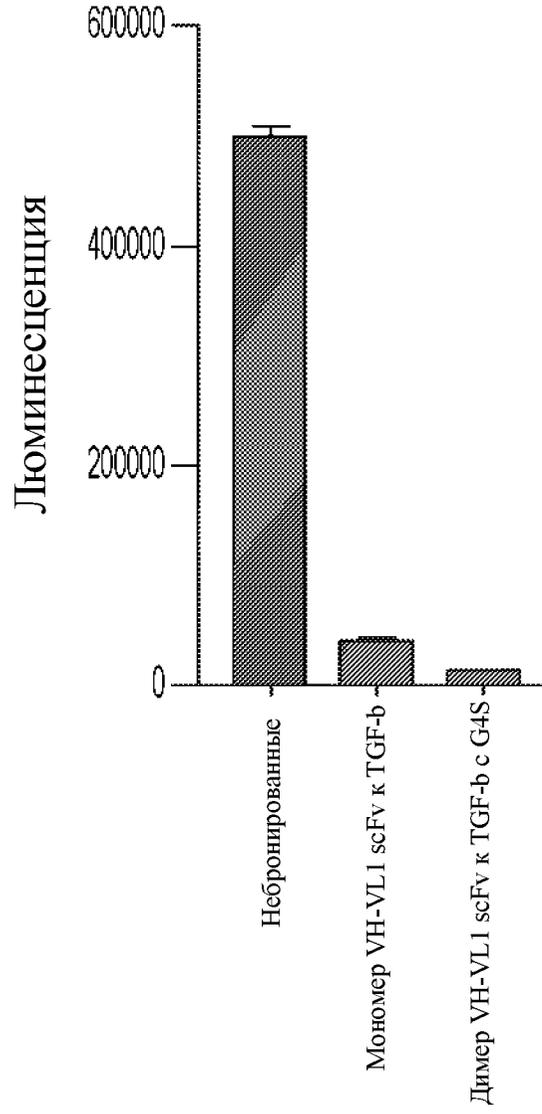
Фиг. 5А



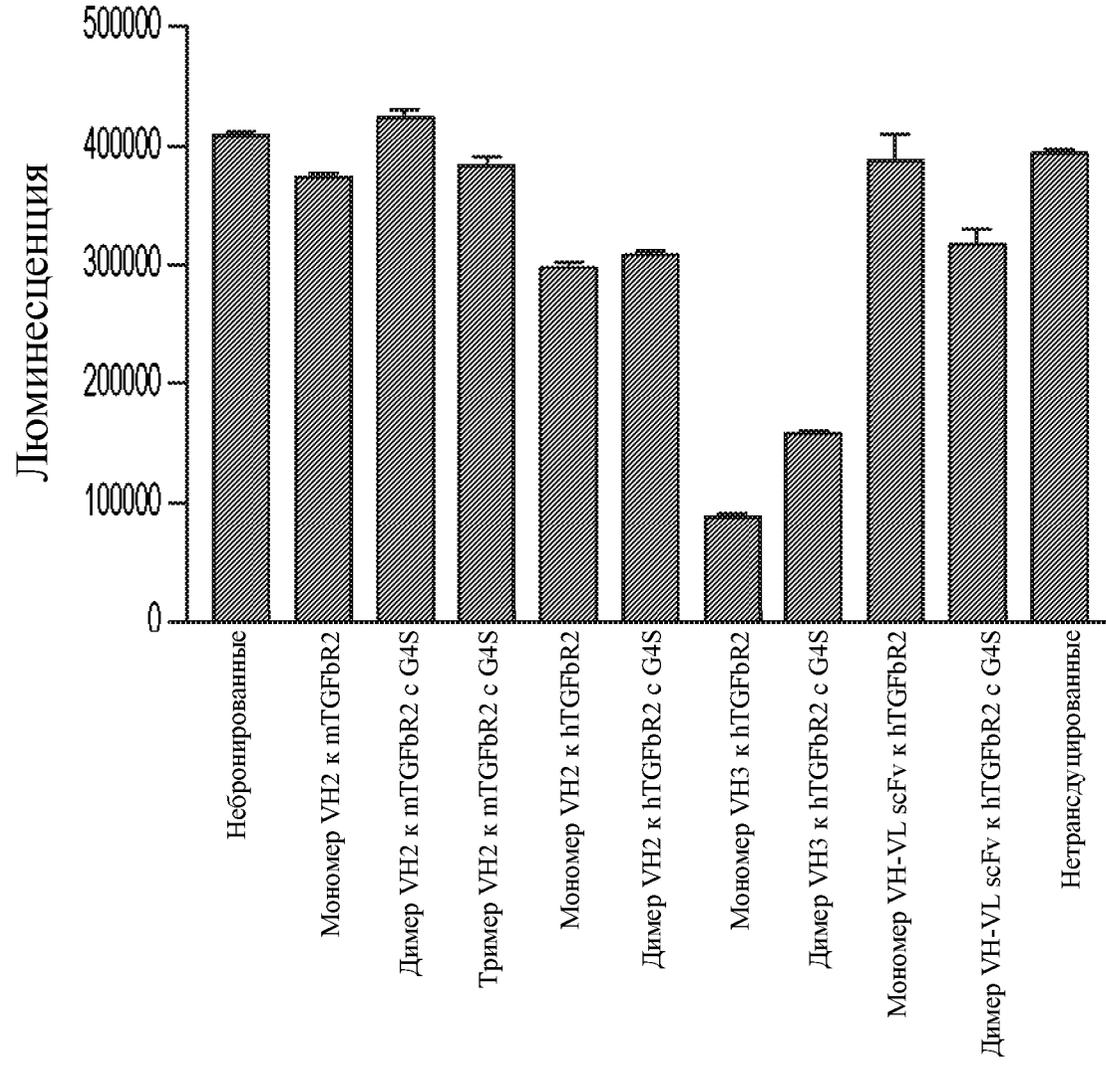
Фиг. 5В



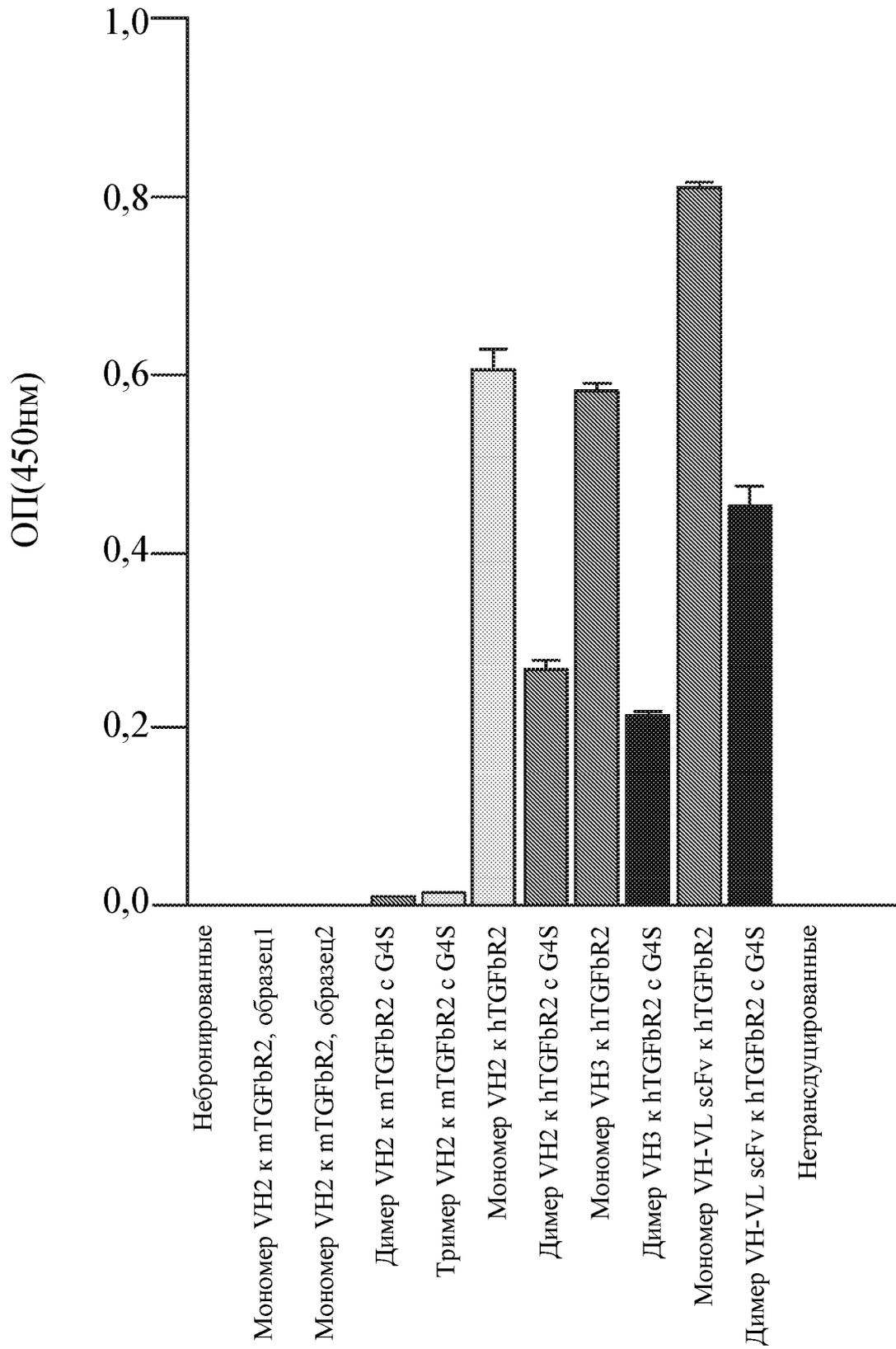
Фиг. 5С



Фиг. 6А

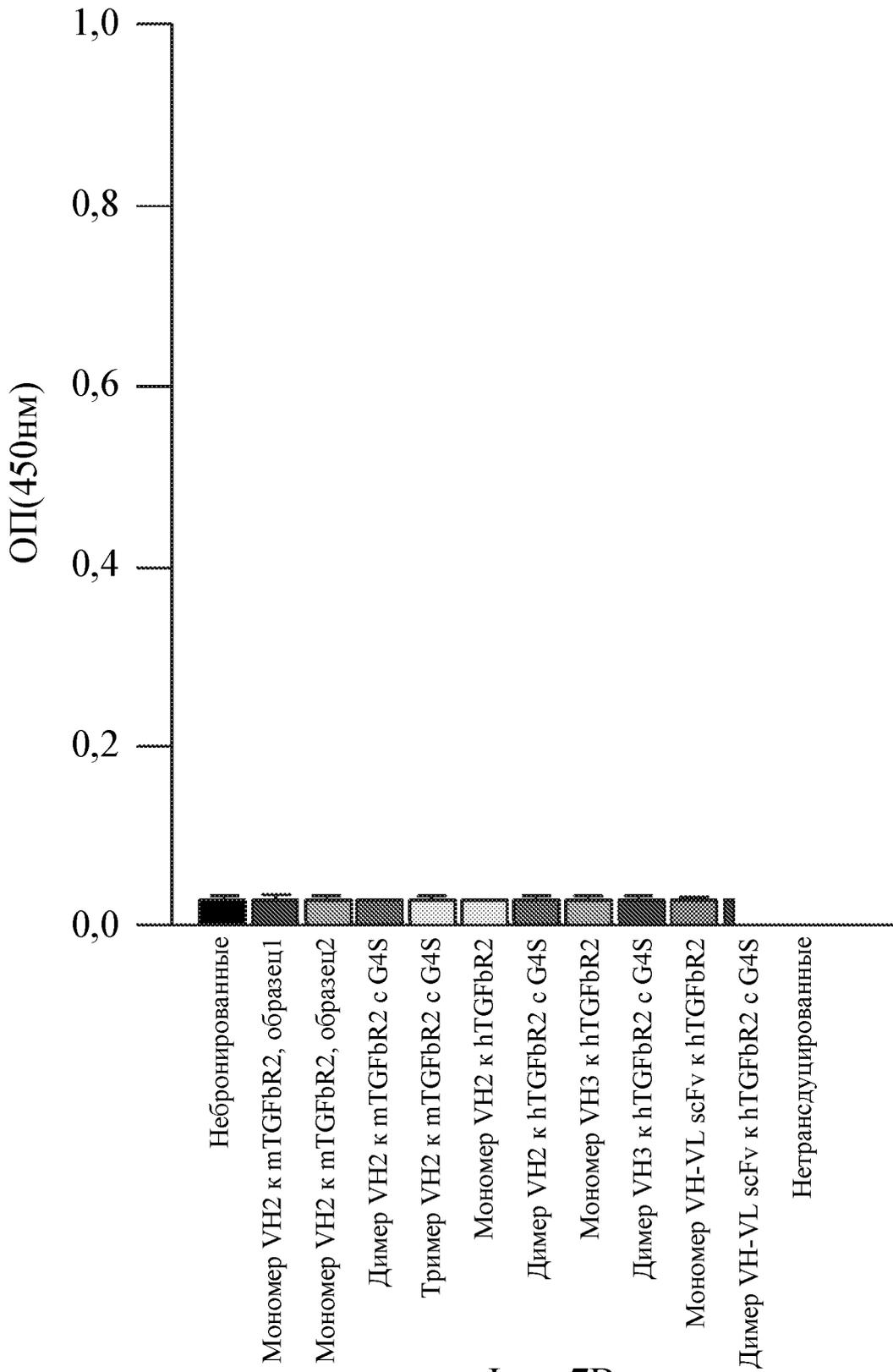


Фиг. 6В

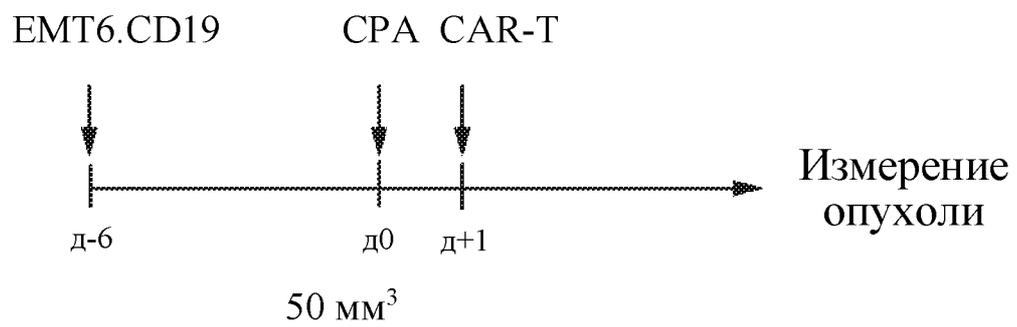


Фиг. 7А

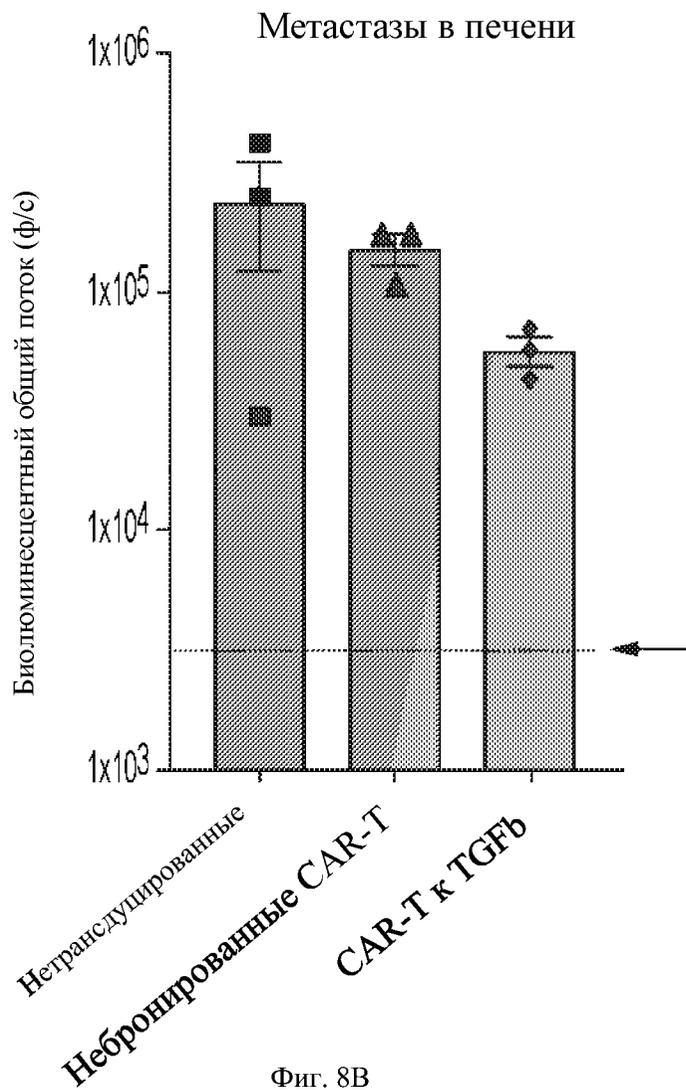
1



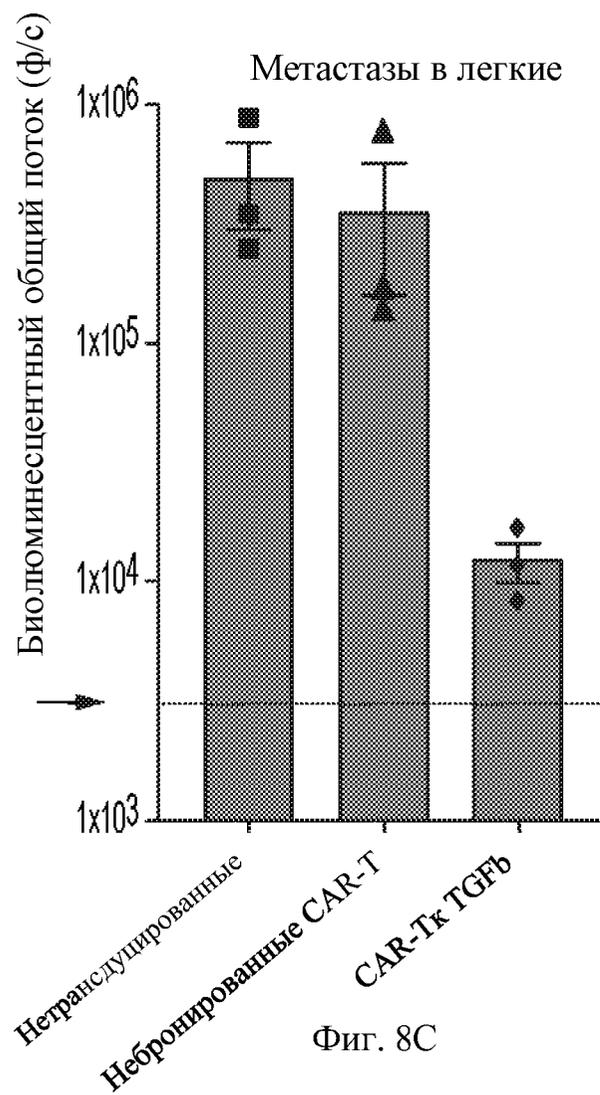
Фиг. 7В



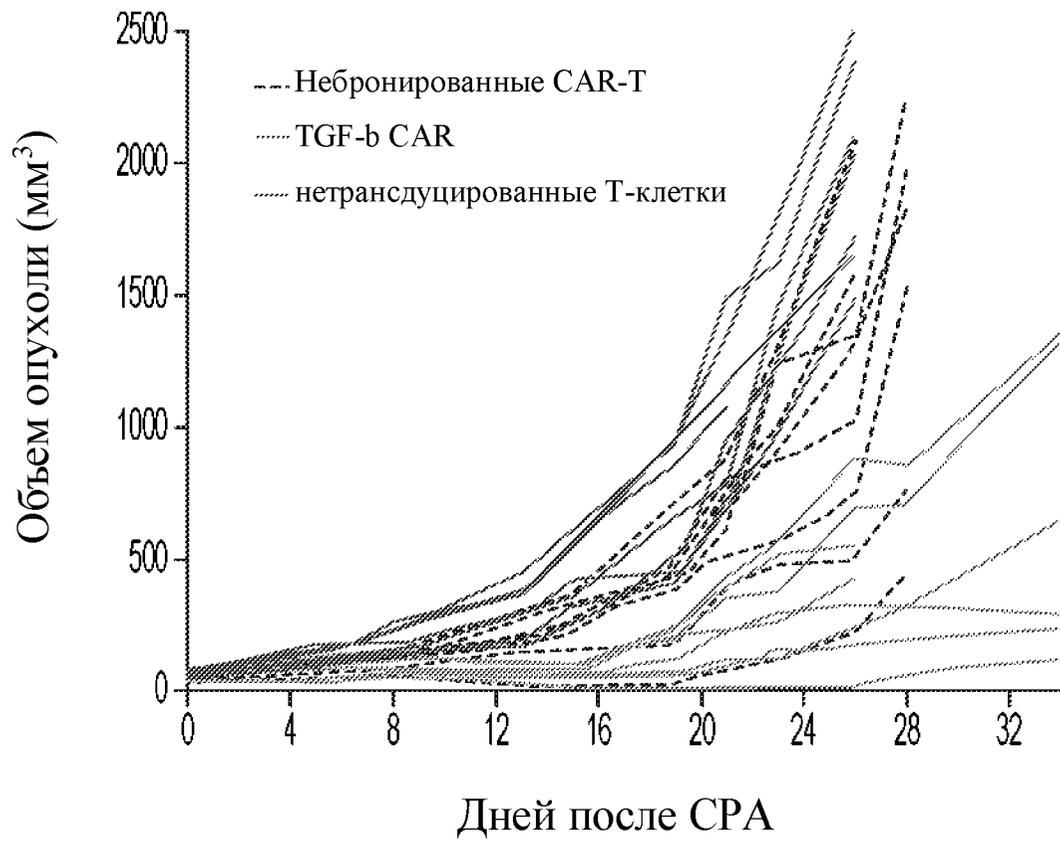
Фиг. 8А



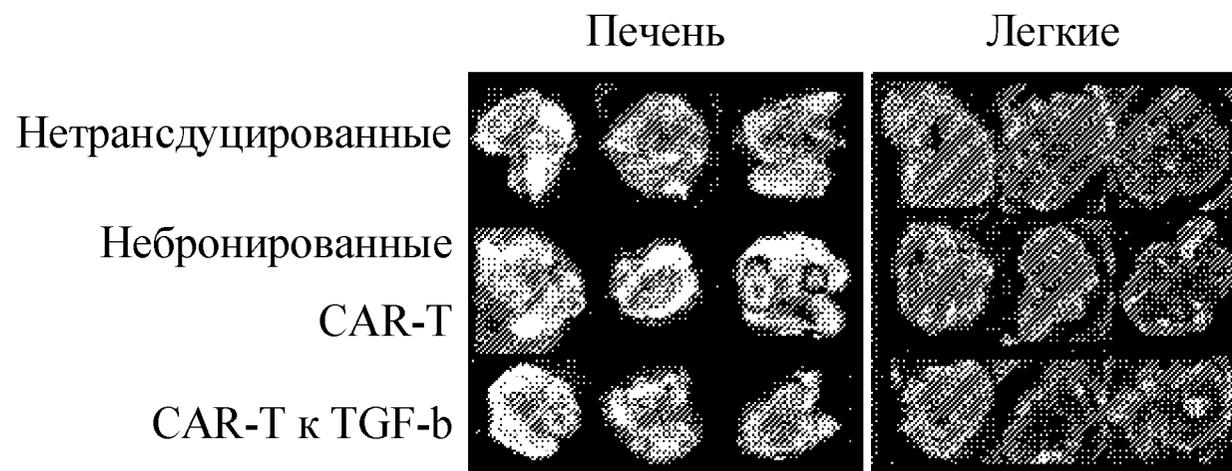
Фиг. 8В



Фиг. 8С

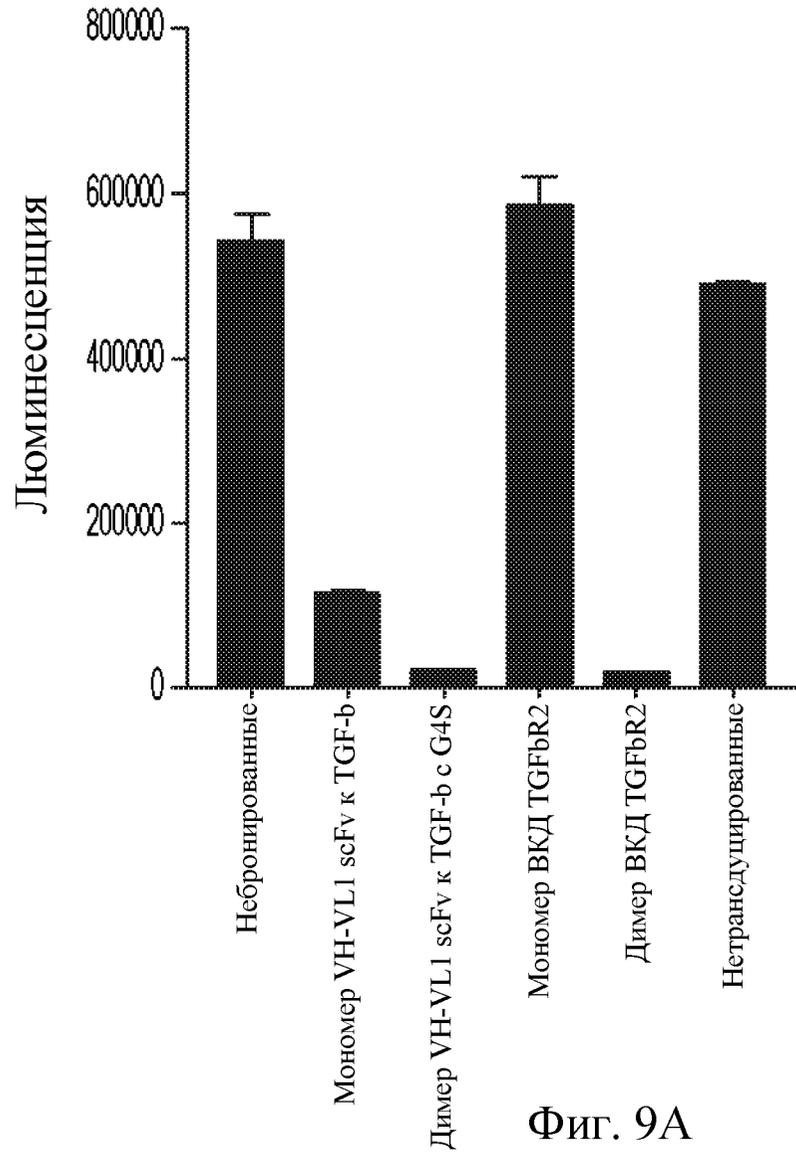


ФИГ. 8D

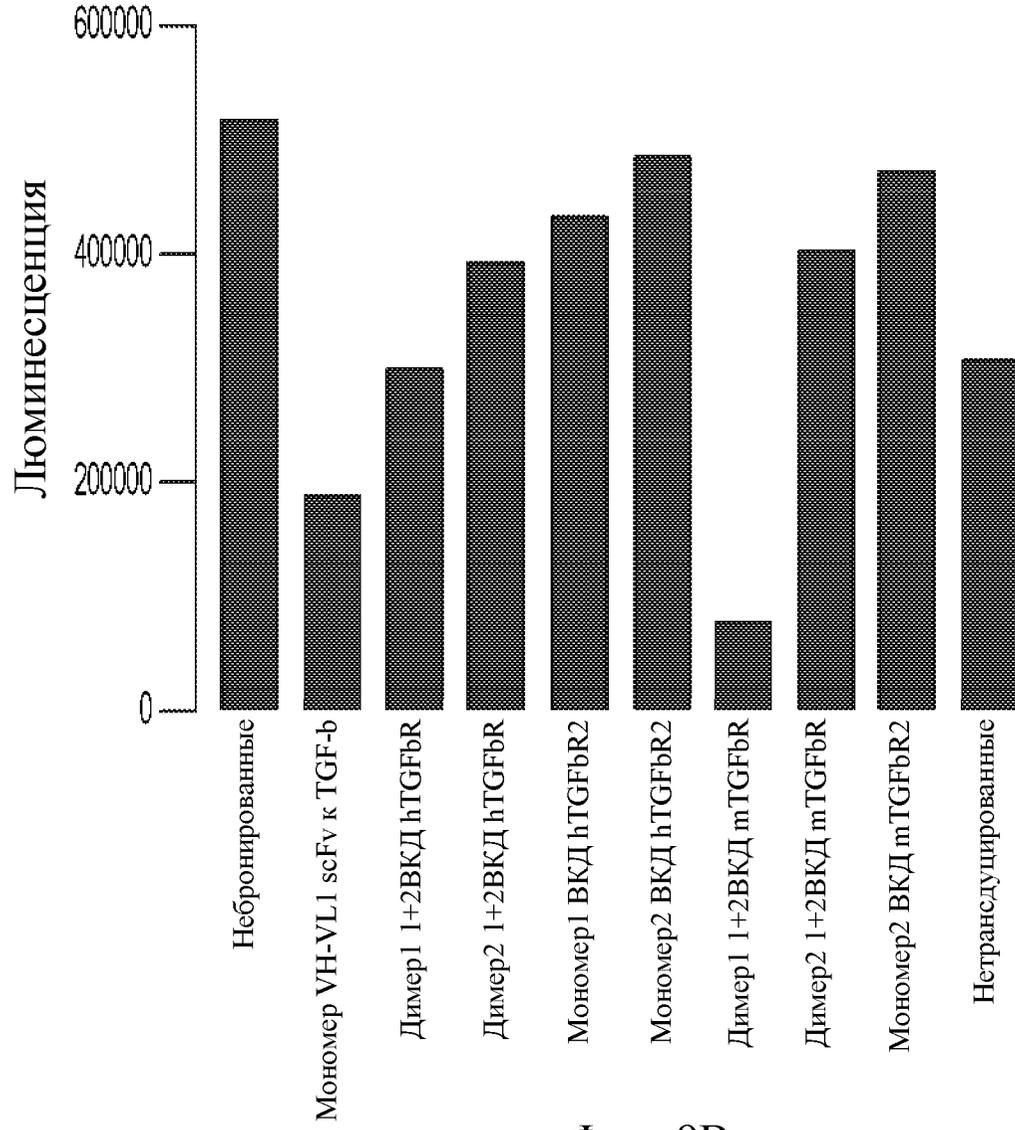


CAR-Tк TGF-b = мышинные CAR-T,  
секретирующие VH-VL1 scFv к TGFb

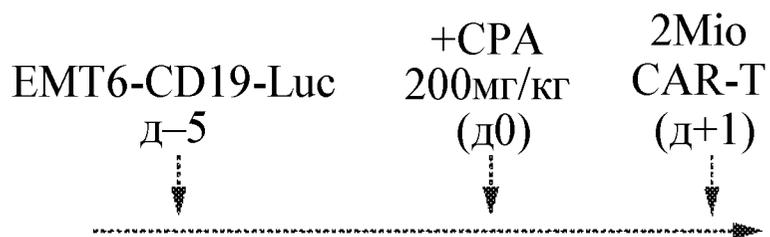
Фиг. 8E



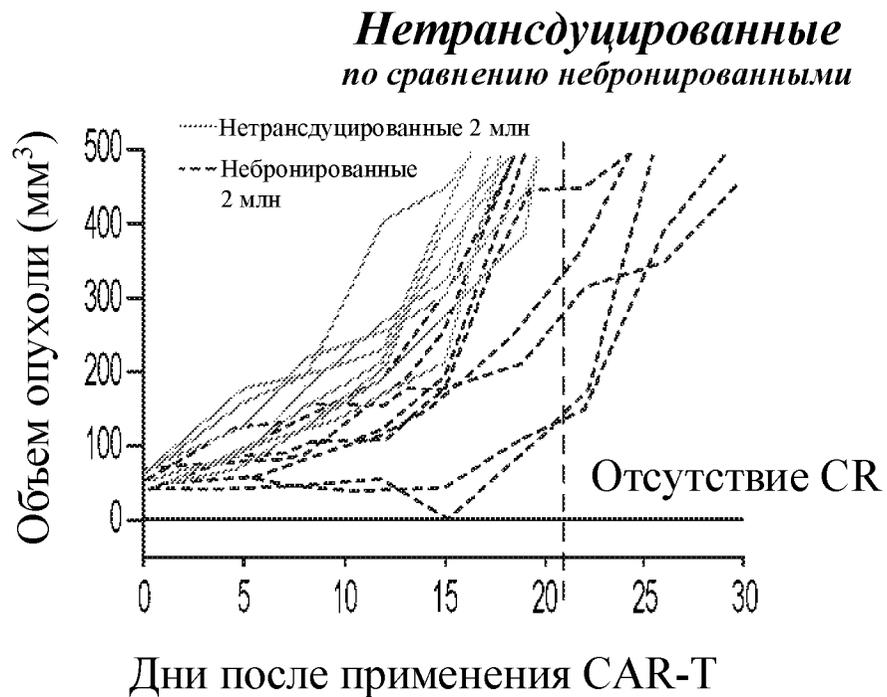
Фиг. 9А



Фиг. 9В

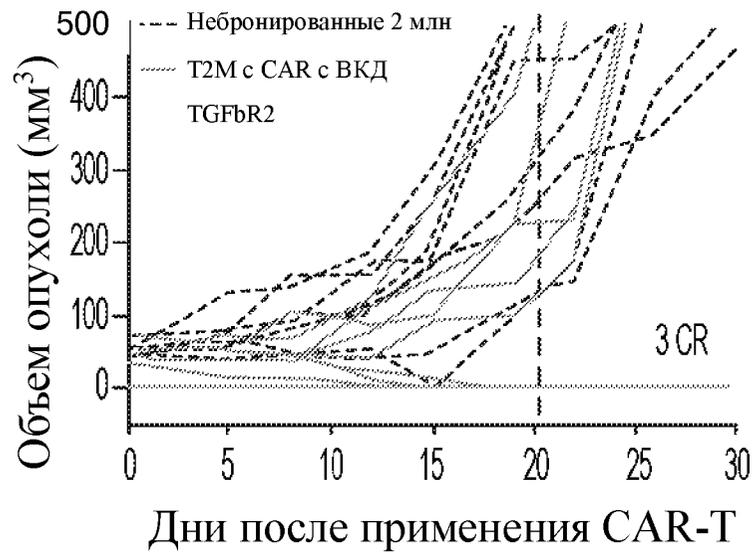


Фиг. 10А



Фиг. 10В

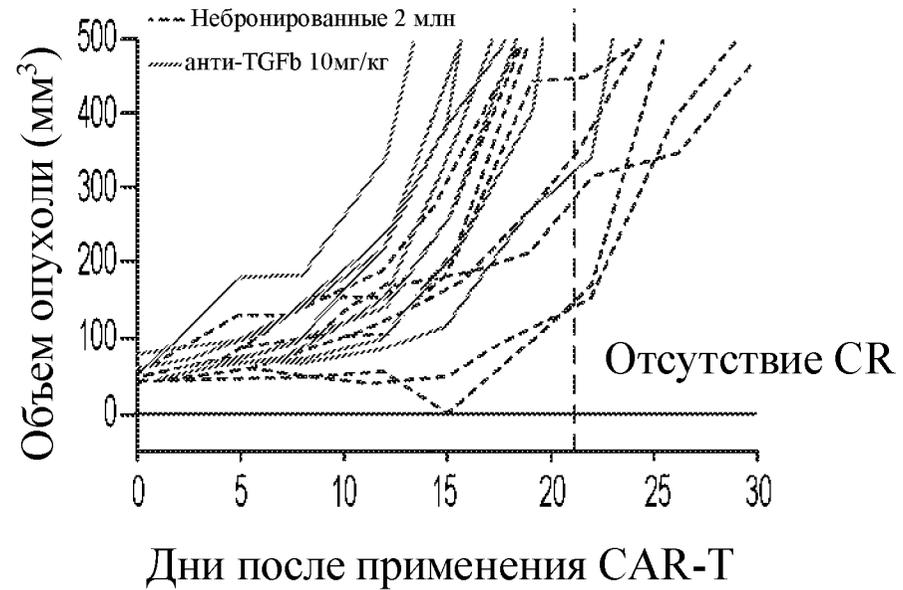
CAR-T с димером 1+2ВКД TGFbR  
по сравнению небронированными



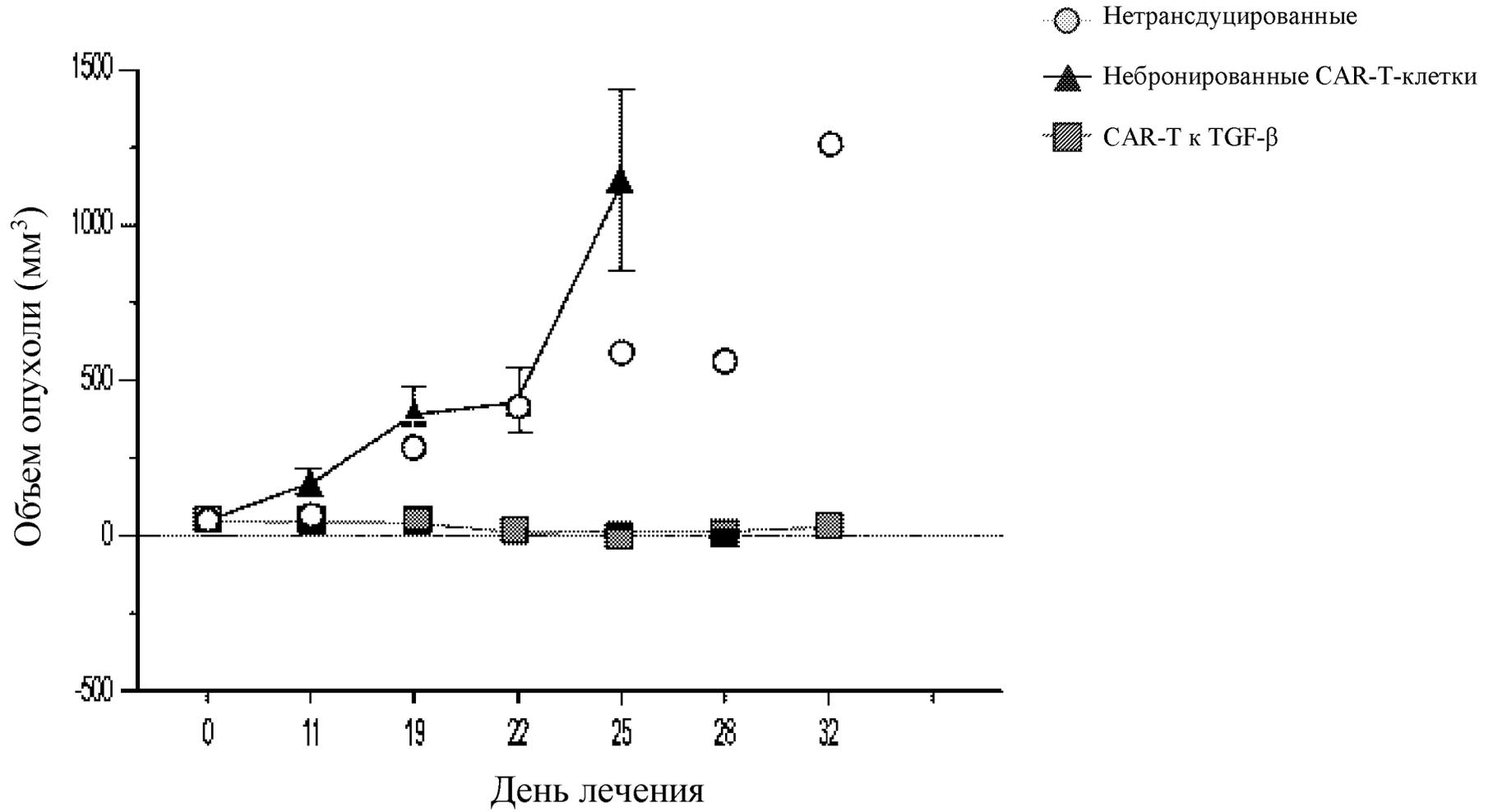
CR = полный ответ

Фиг. 10С

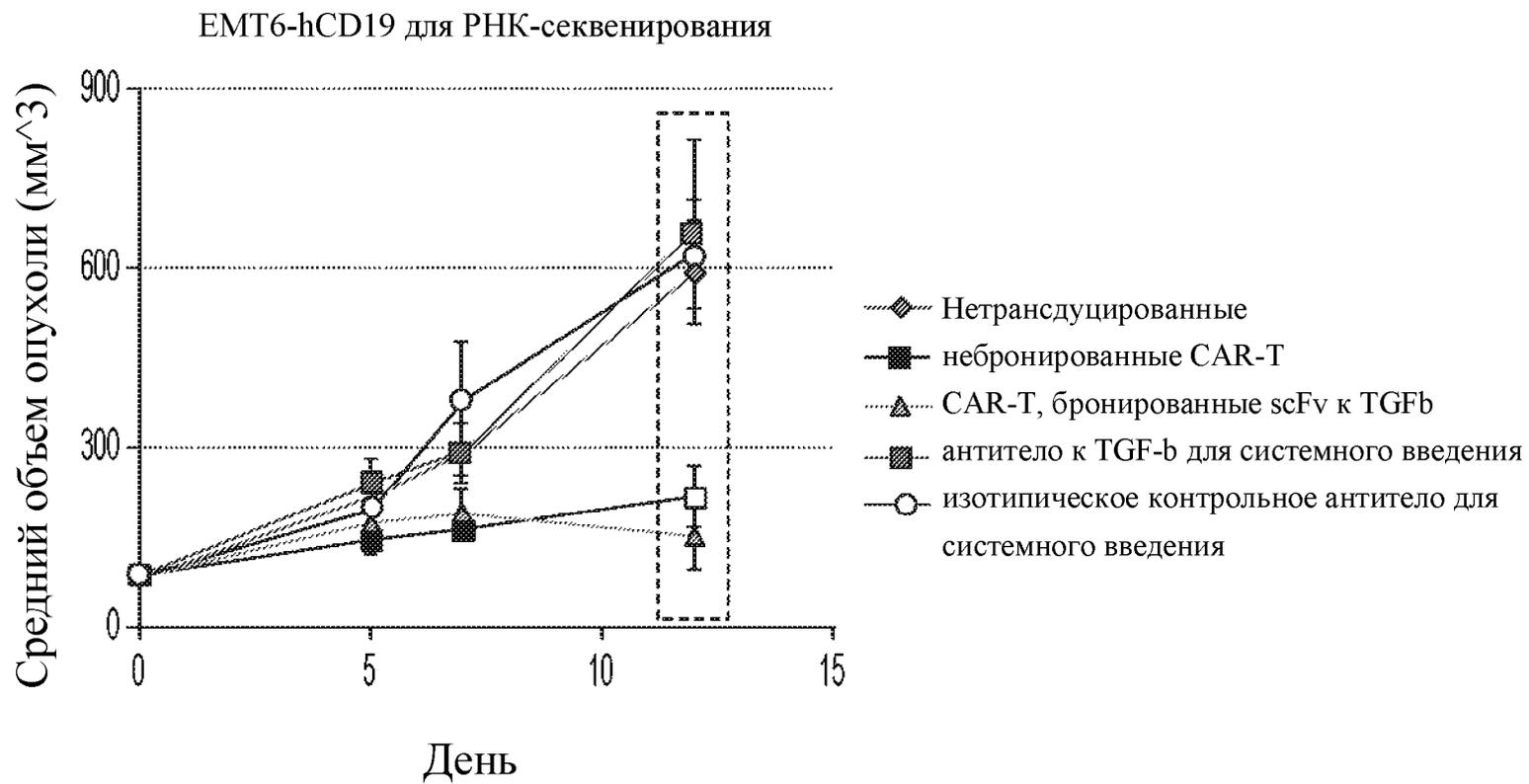
*анти-TGF-b для системного введения*  
по сравнению небронированными



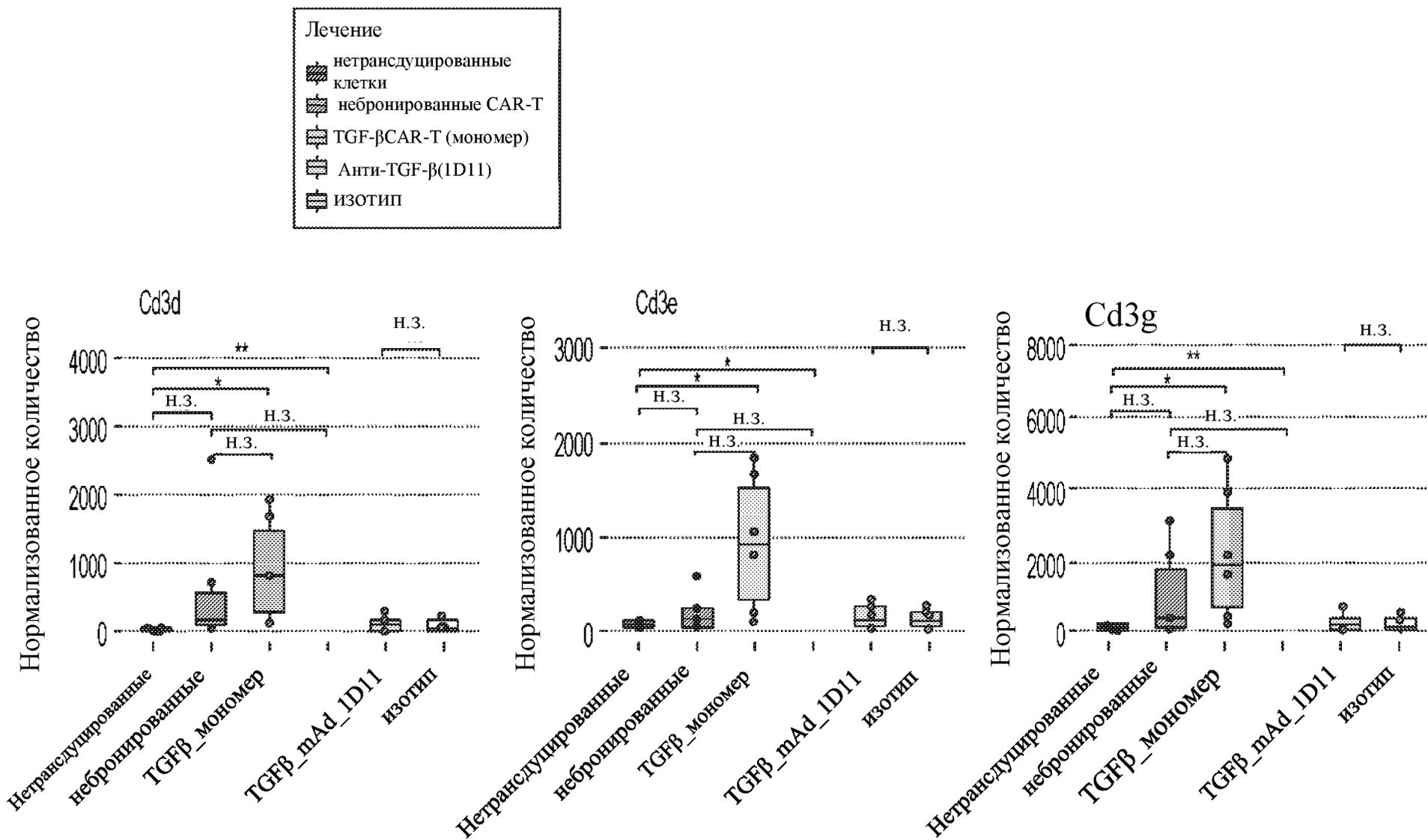
Фиг. 10D



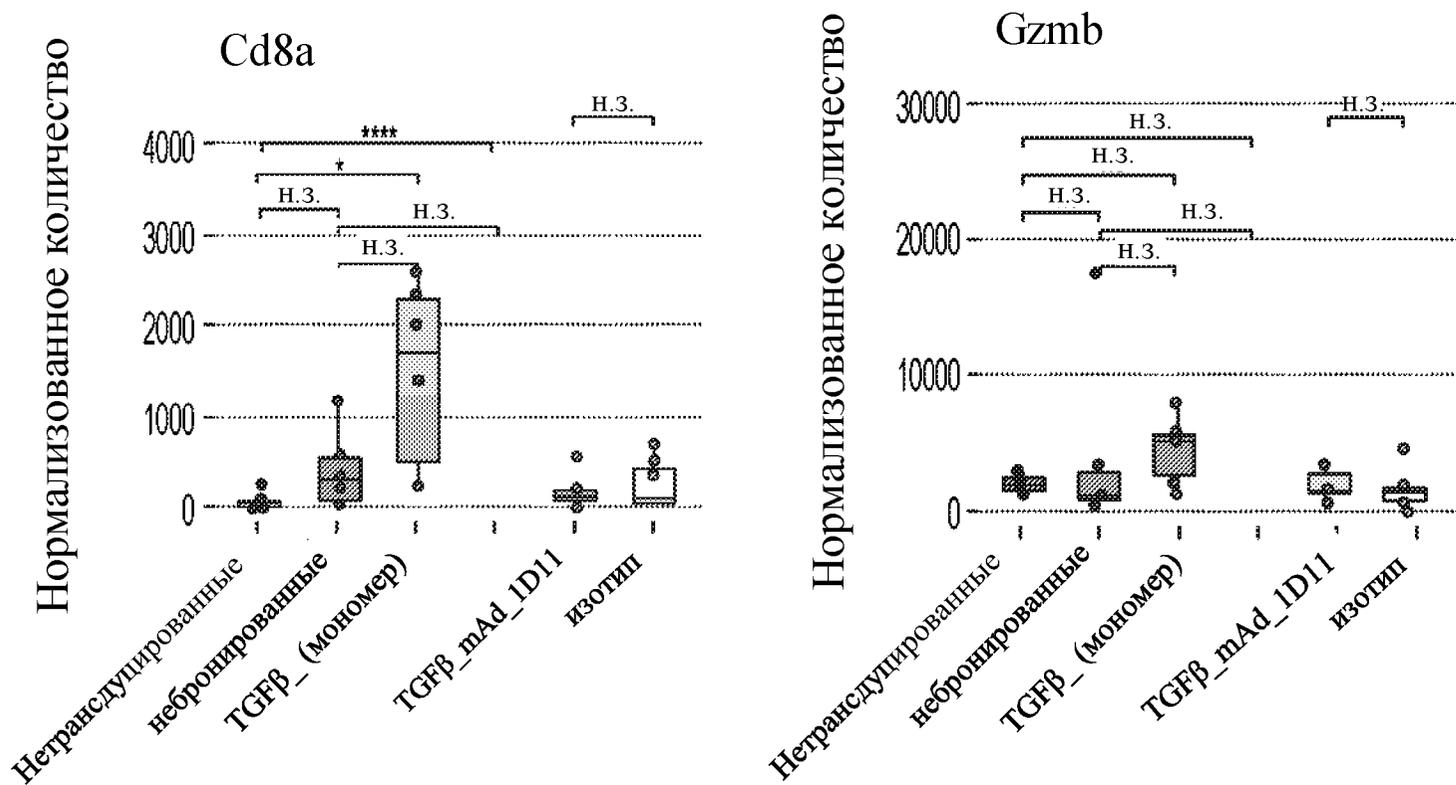
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

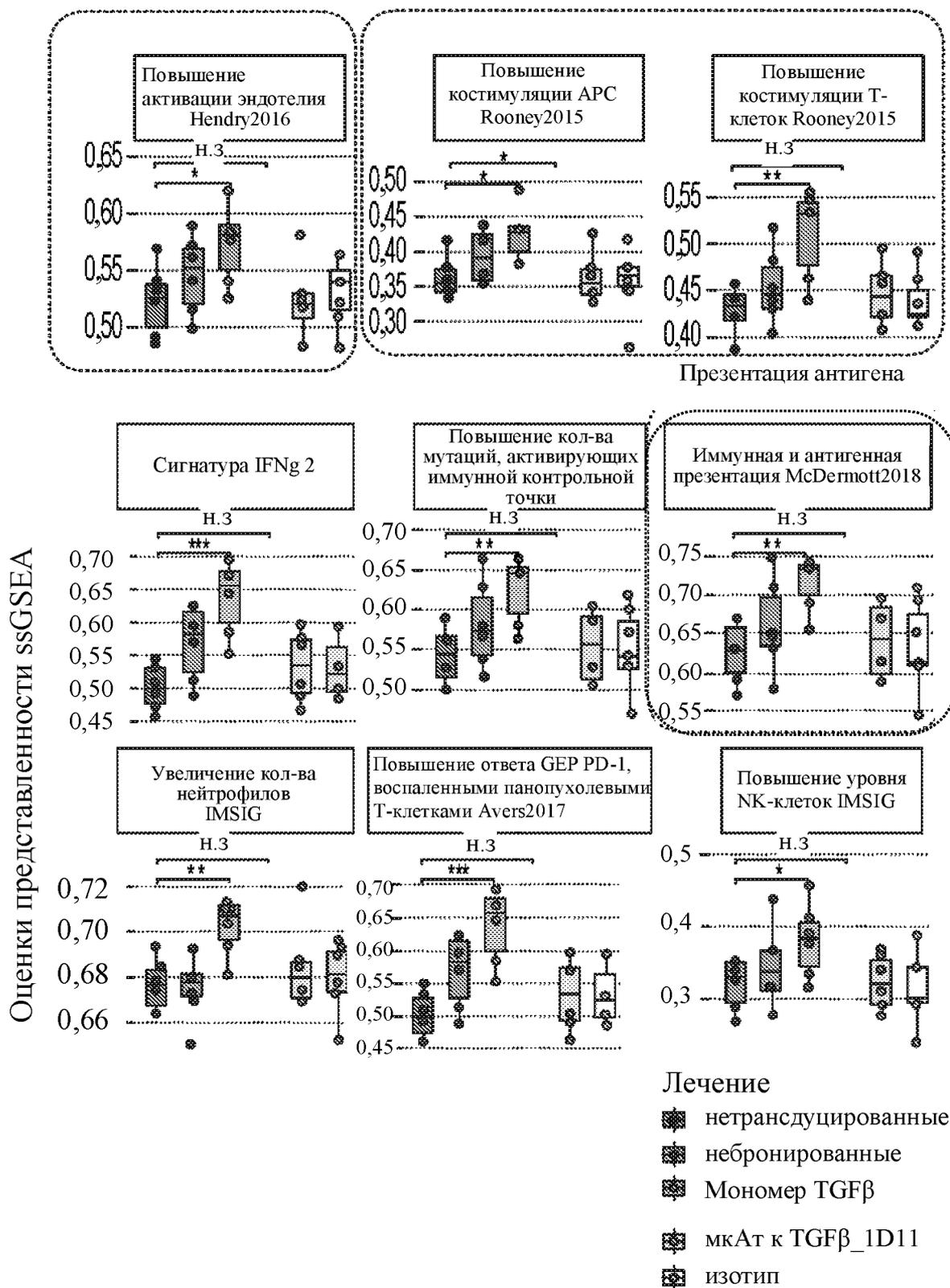


Фиг.13

ПРОДОЛЖЕНИЕ

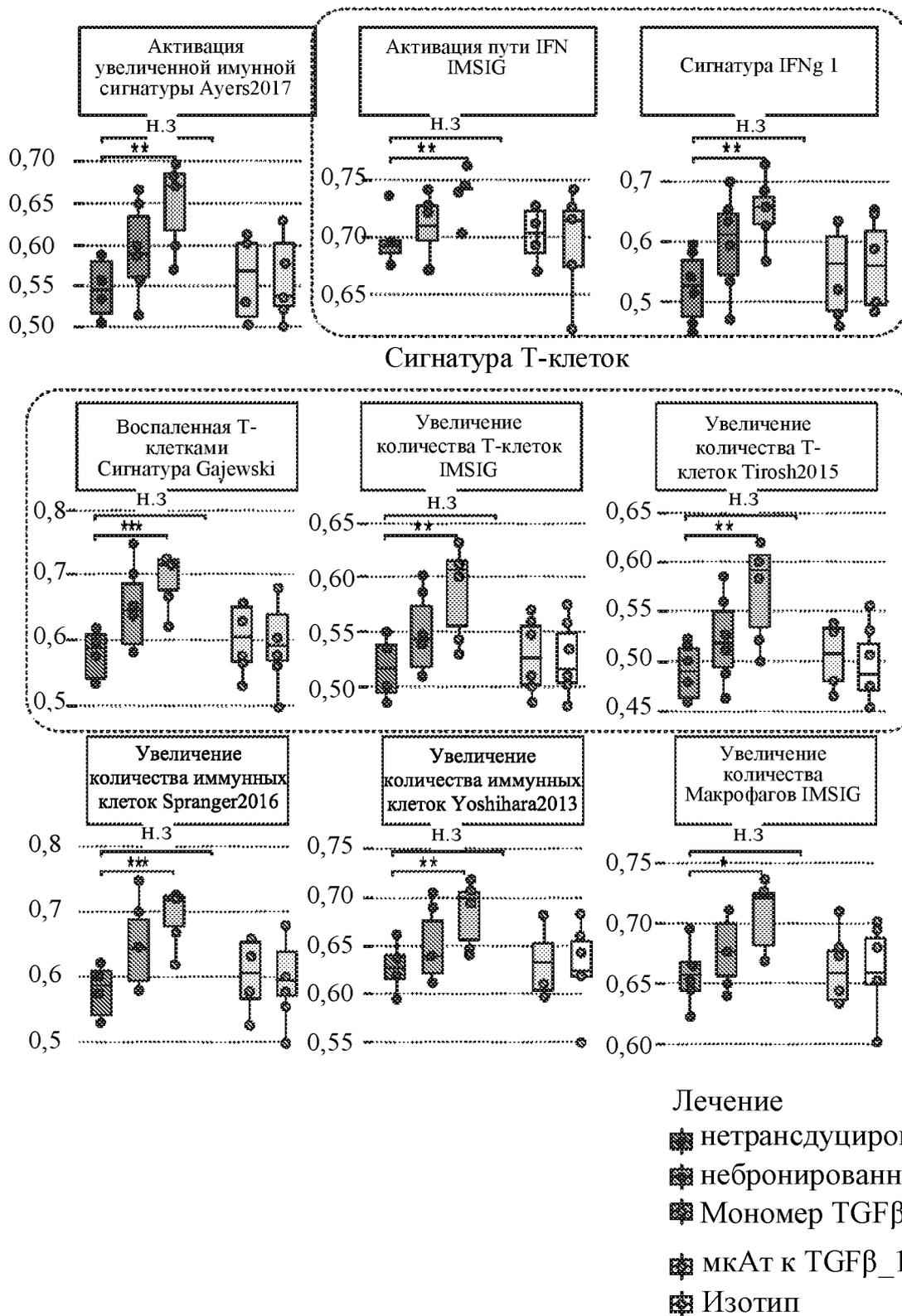
Активированный эндотелий

Костимуляция

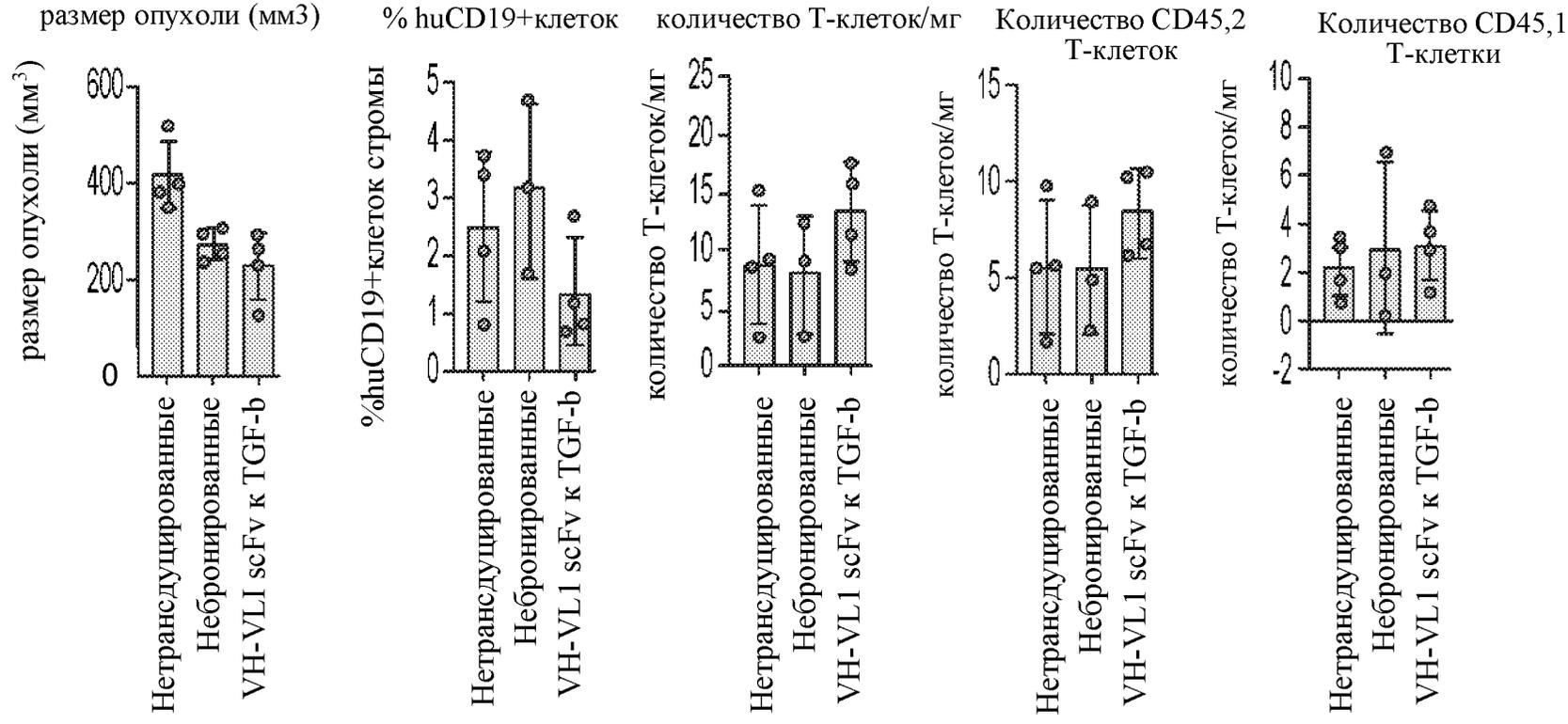


Фиг. 14

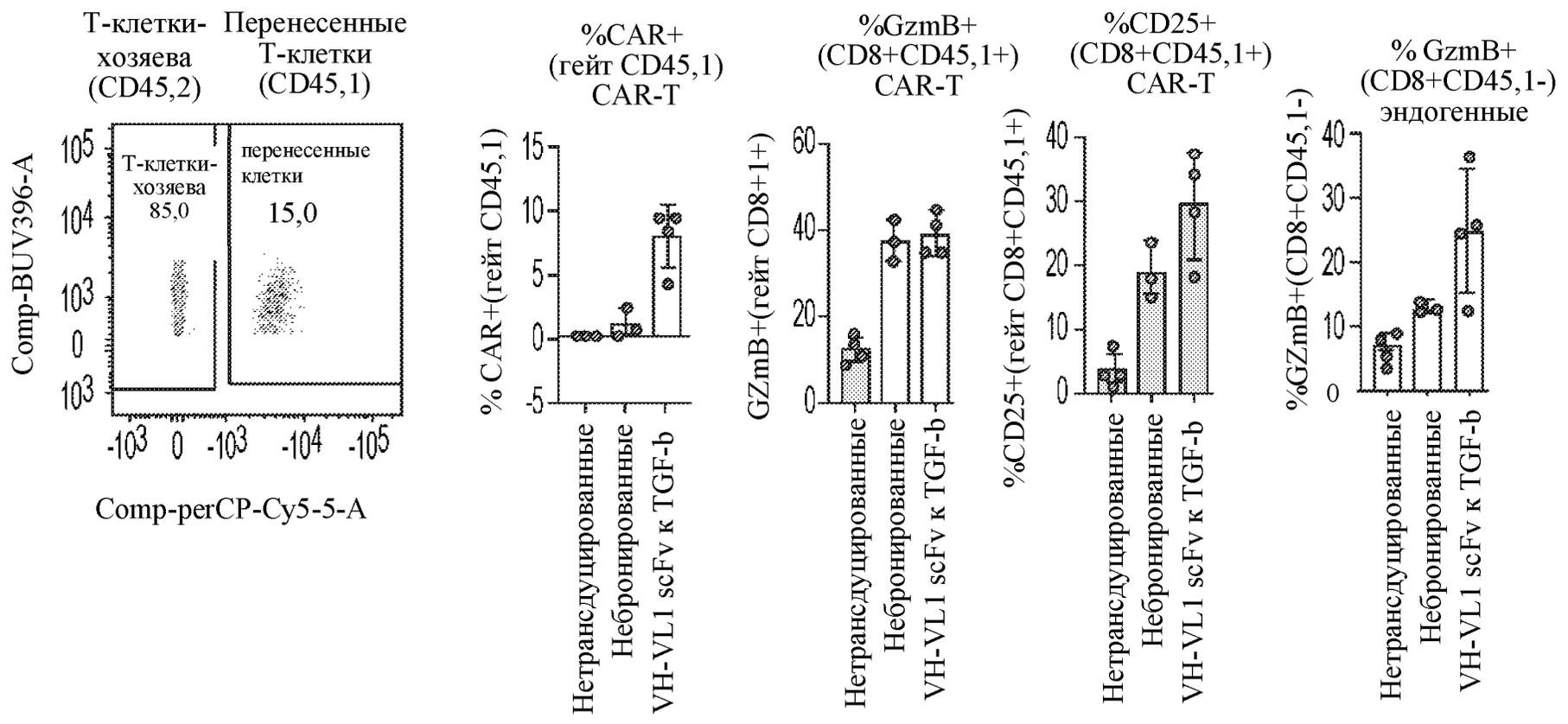
## Активация пути IFN



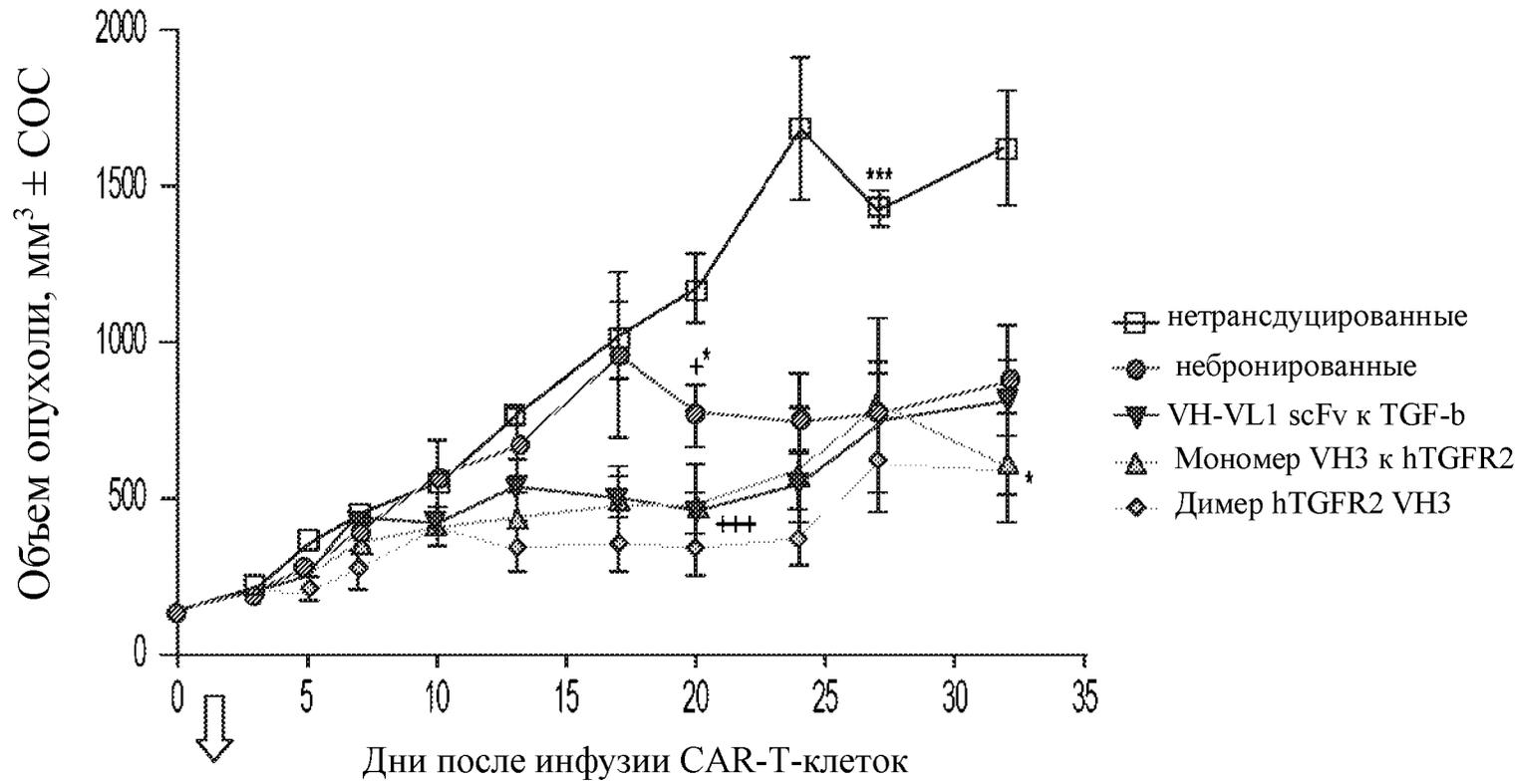
Фиг. 14  
ПРОДОЛЖЕНИЕ



Фиг. 15



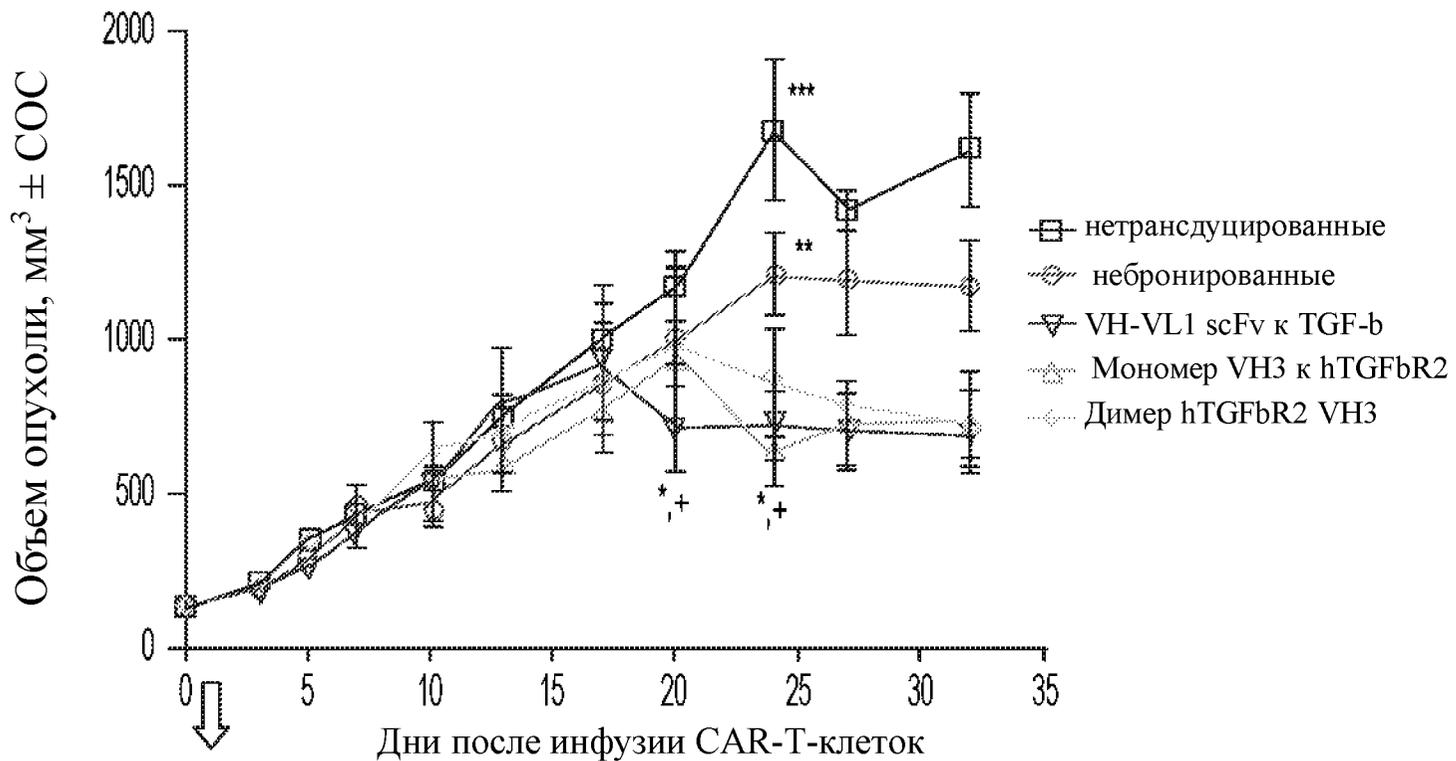
Фиг.15  
ПРОДОЛЖЕНИЕ



*CAR-T-клетки, введенные внутривенно  
 Все CAR-T, нормализованные до 26%; n=6)*

\*: Эвтаназия из-за объема опухоли  
 †: Эвтаназия из-за некротической опухоли

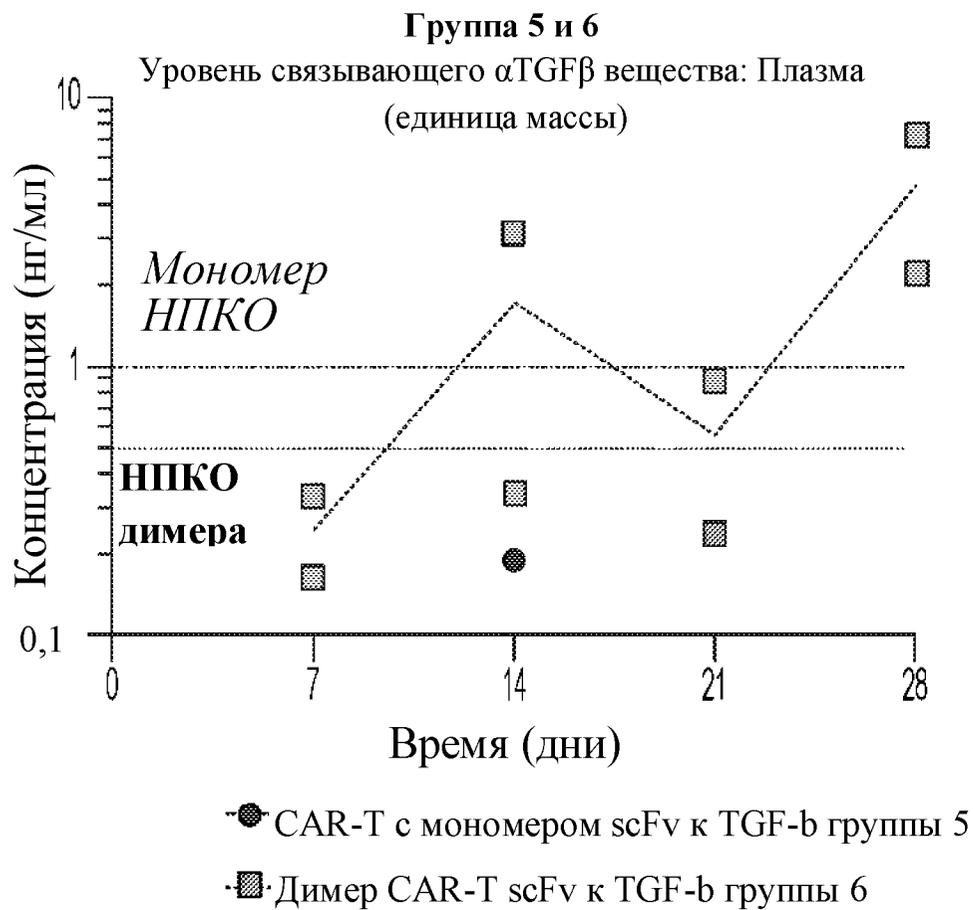
Фиг.16А



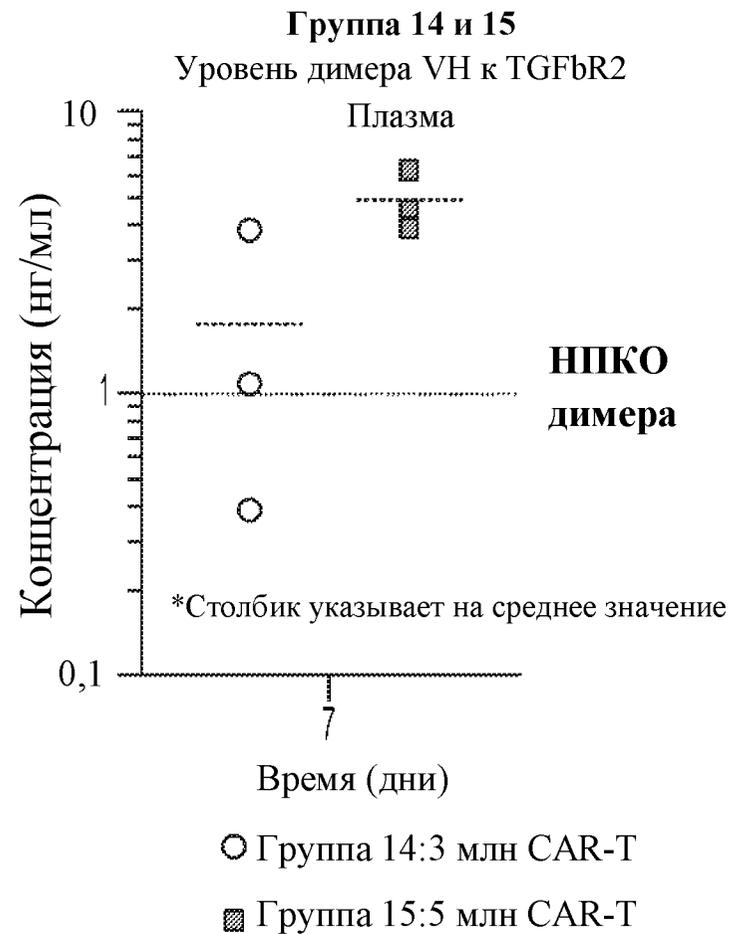
*CAR-T- клетки, введенные внутривенно  
 Все CAR-T, нормализованные до 26%; n=6)*

- \*: Эвтаназия из-за объема опухоли
- + : Эвтаназия из-за некротической опухоли

Фиг. 16В

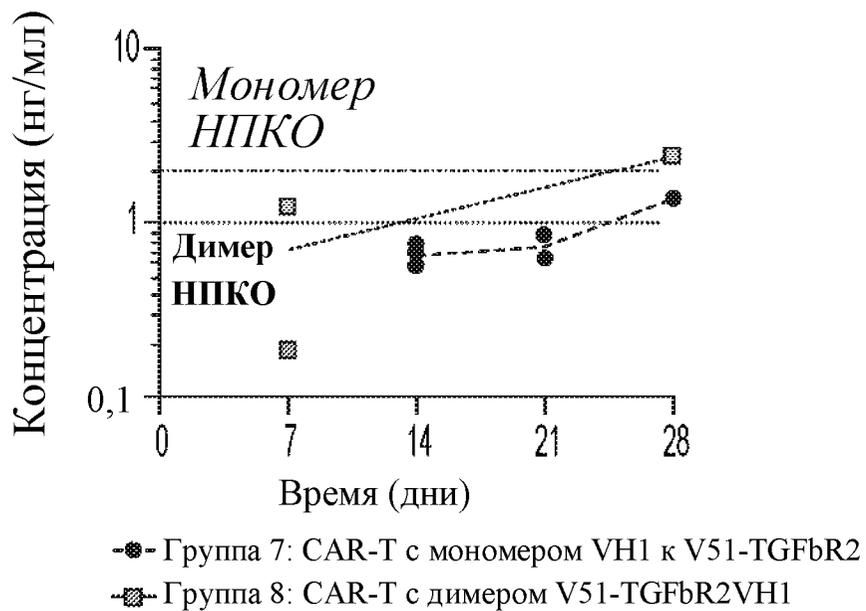


Фиг. 17А



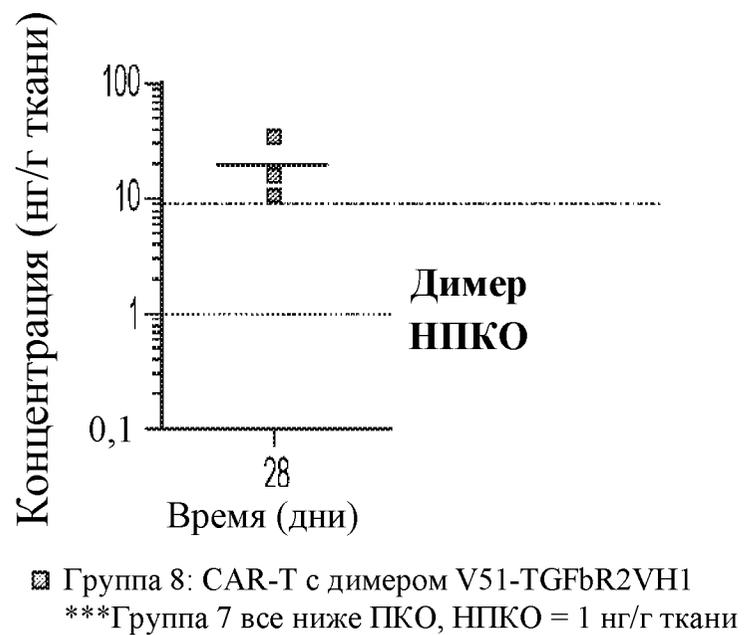
Фиг. 17В

**Группа 7 и 8/  
Уровень связывающего TGFβR2 вещества: Плазма**

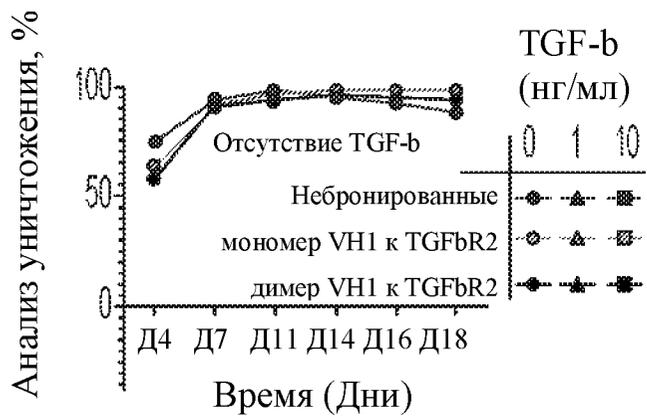


**Фиг. 17C**

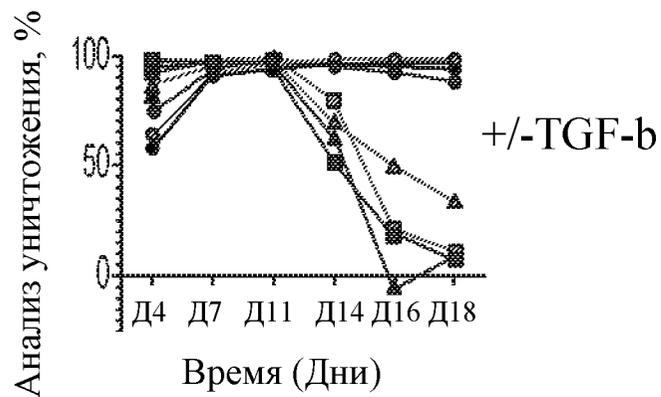
**Группа 7 и 8  
Уровень связывающего TGFβR2 вещества: Опухоль**



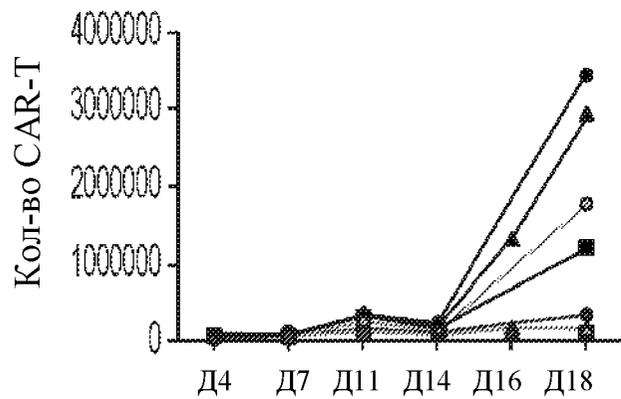
**Фиг. 17D**



Фиг. 18А

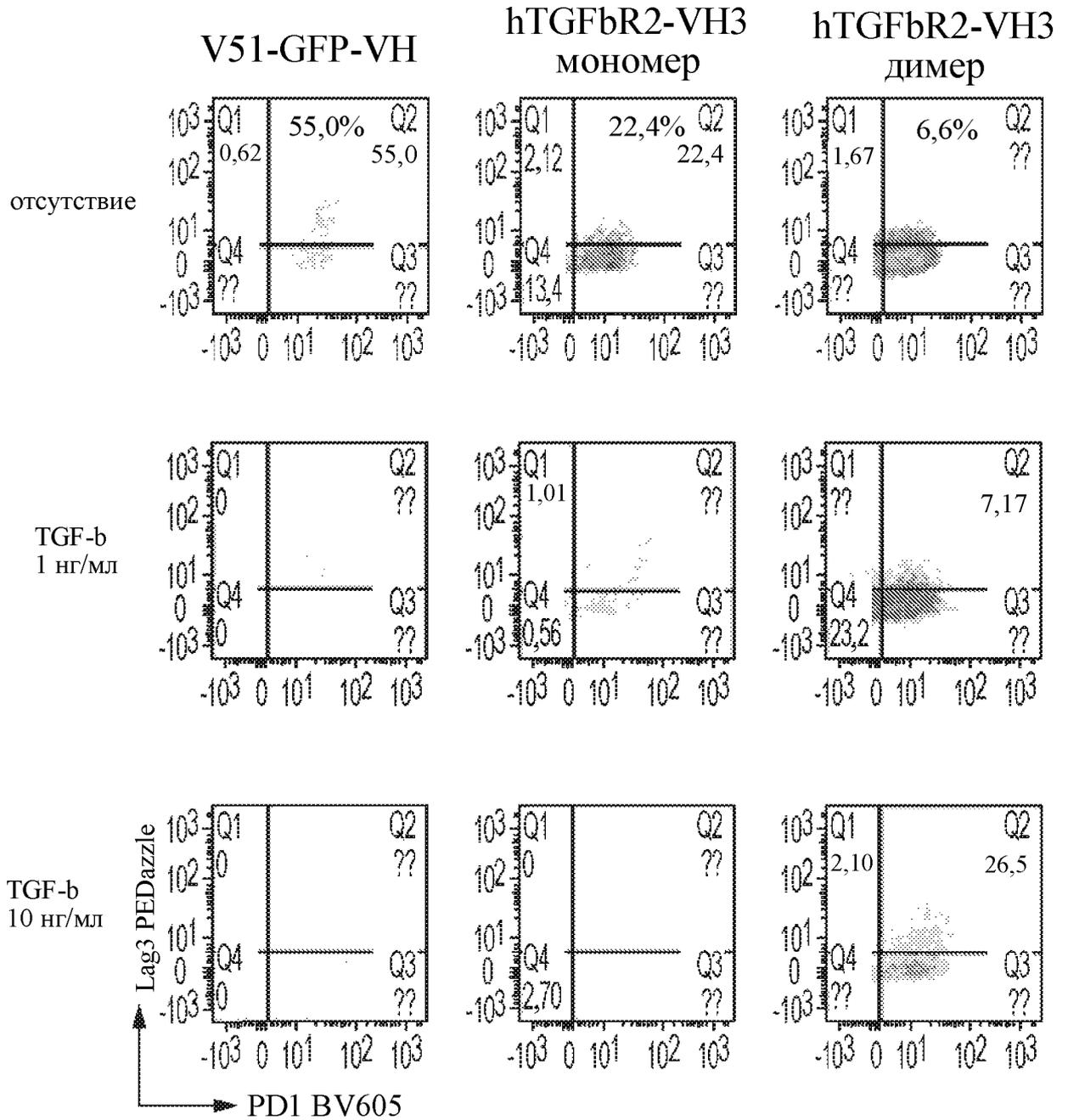


Фиг. 18В



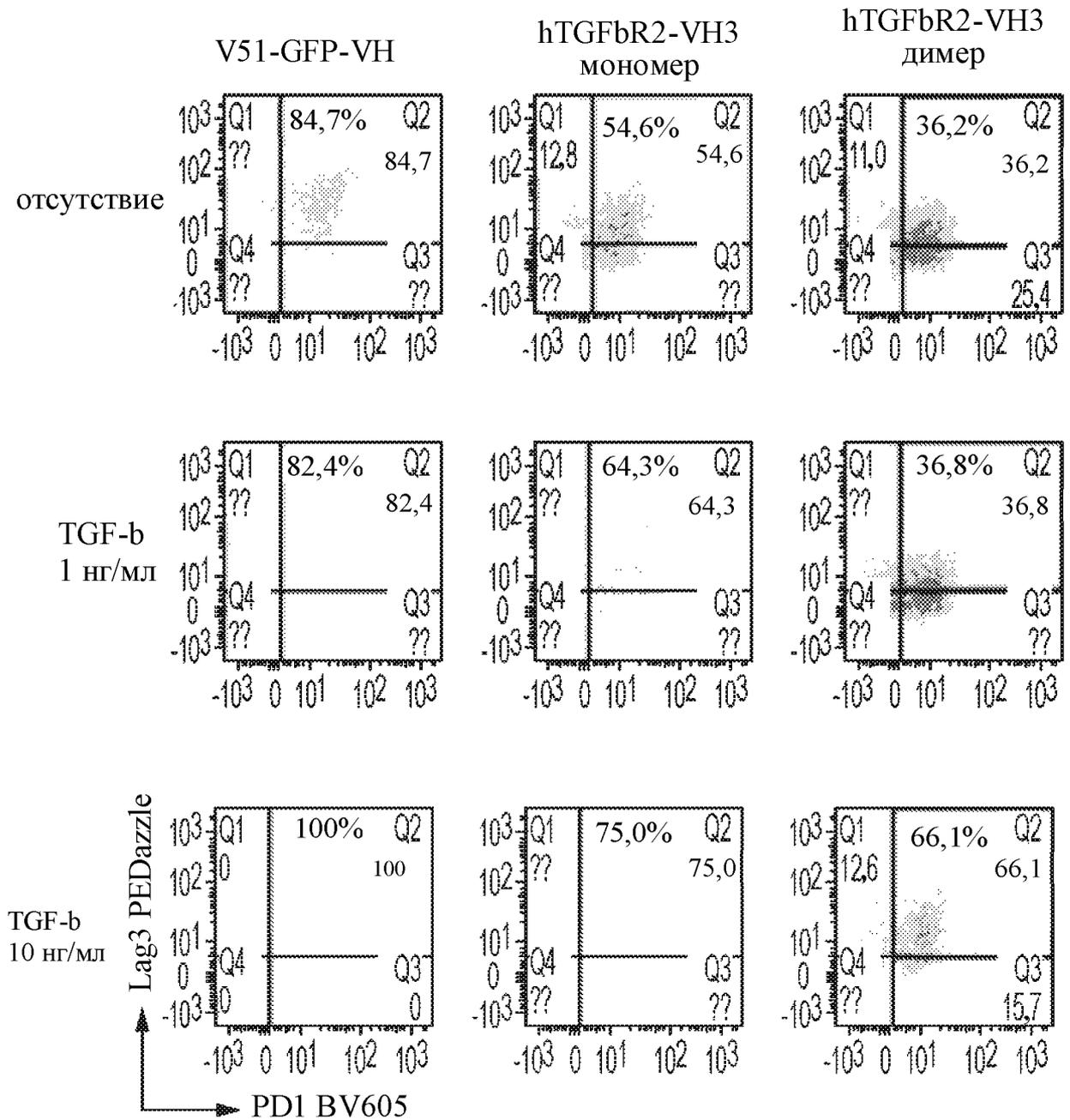
Фиг.18С

CD4



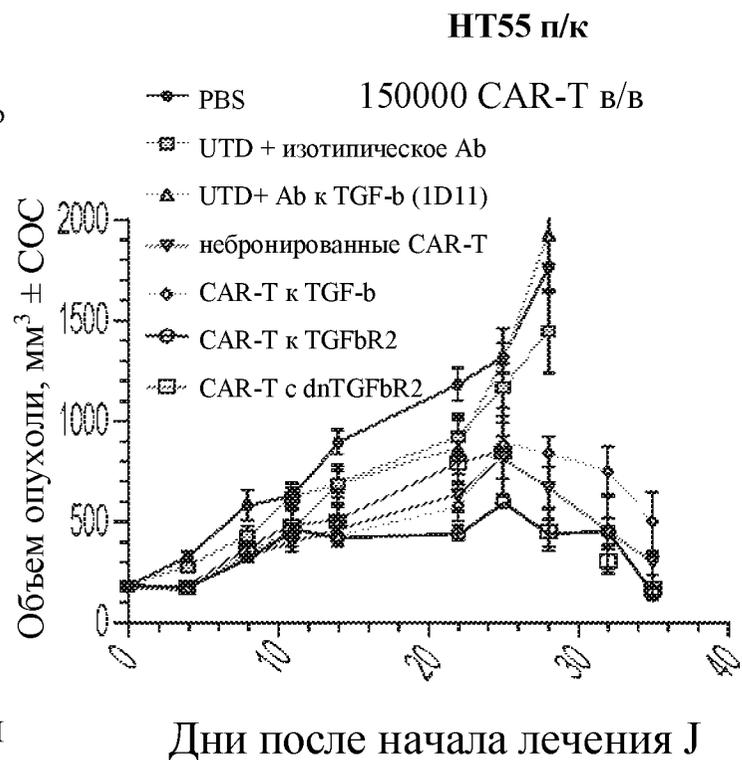
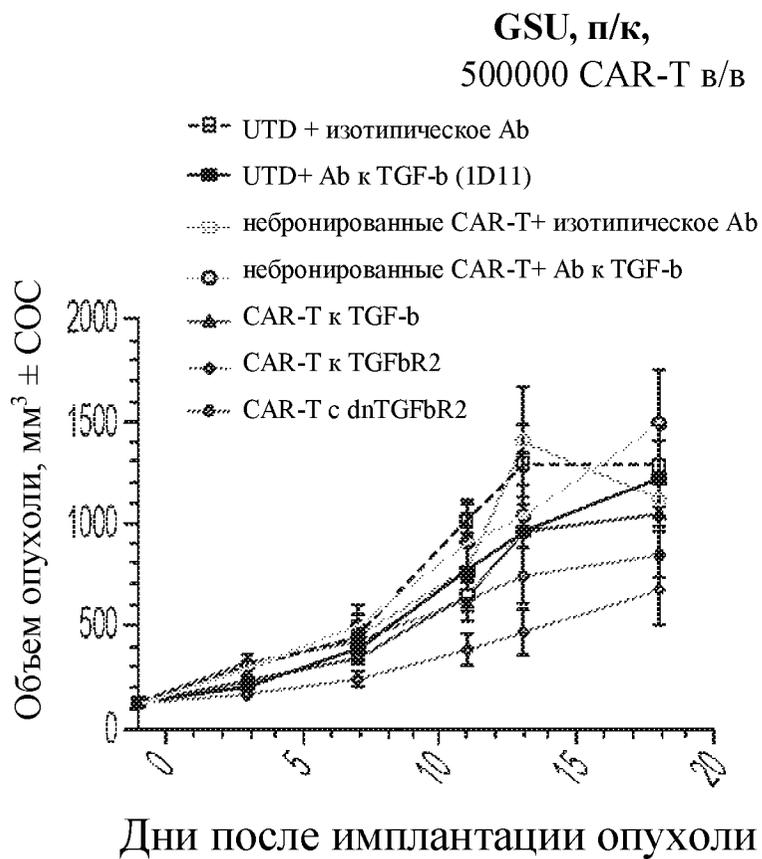
Фиг. 19

## CD8



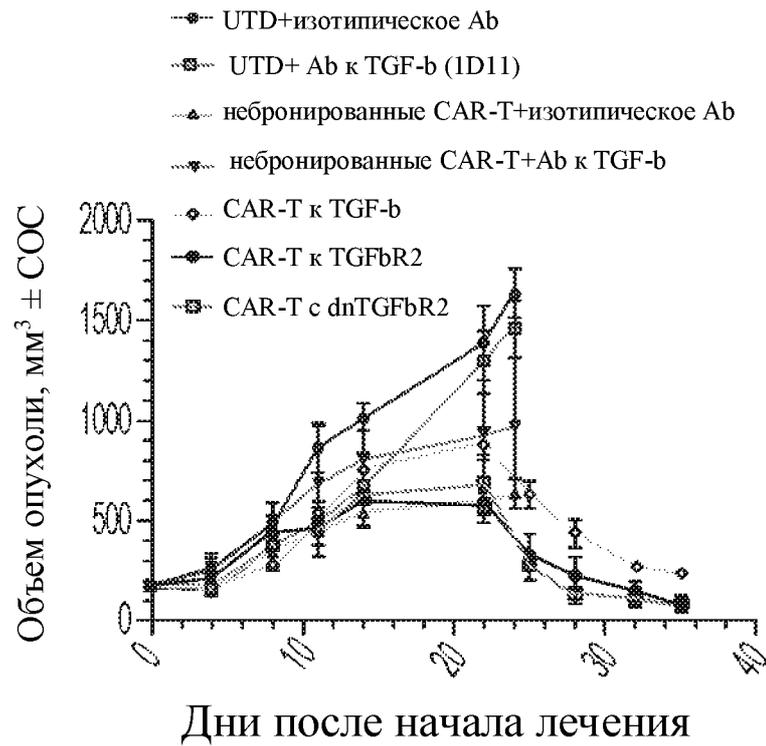
Фиг. 19

ПРОДОЛЖЕНИЕ



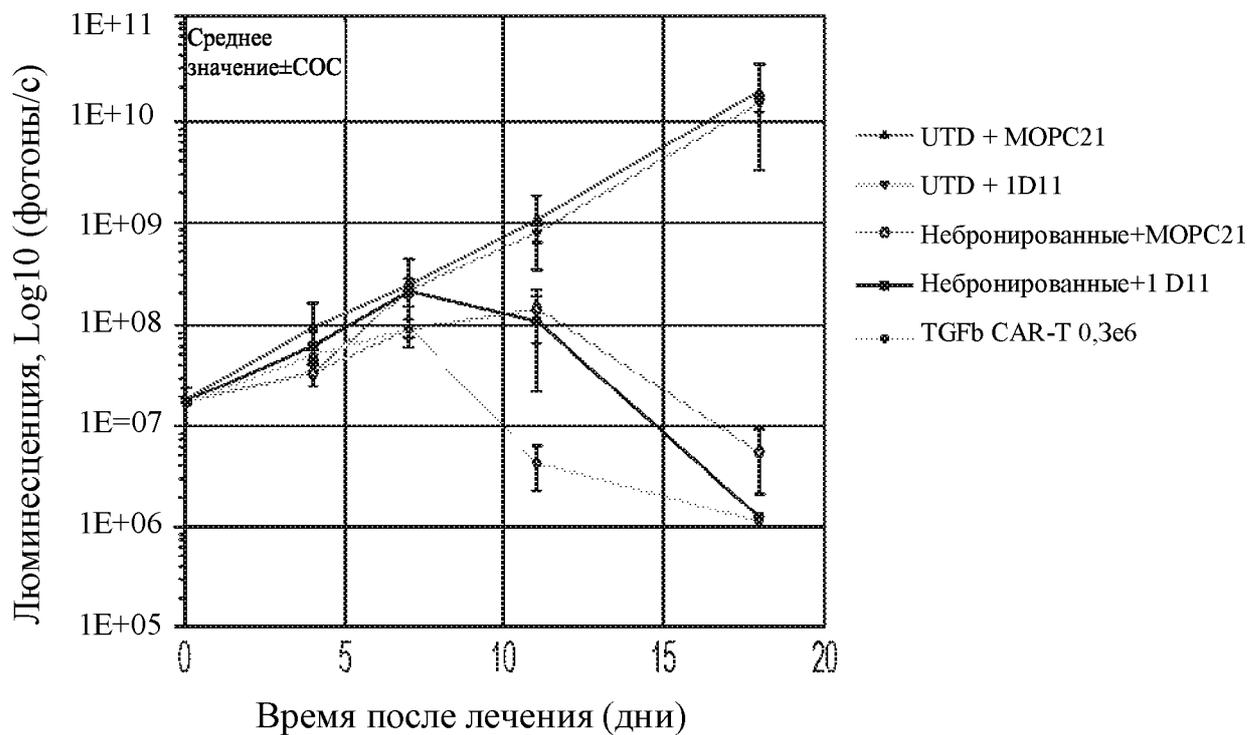
## MDA-MB-231-FP4 Luc

500000 CAR-T в/в



Фиг. 20С

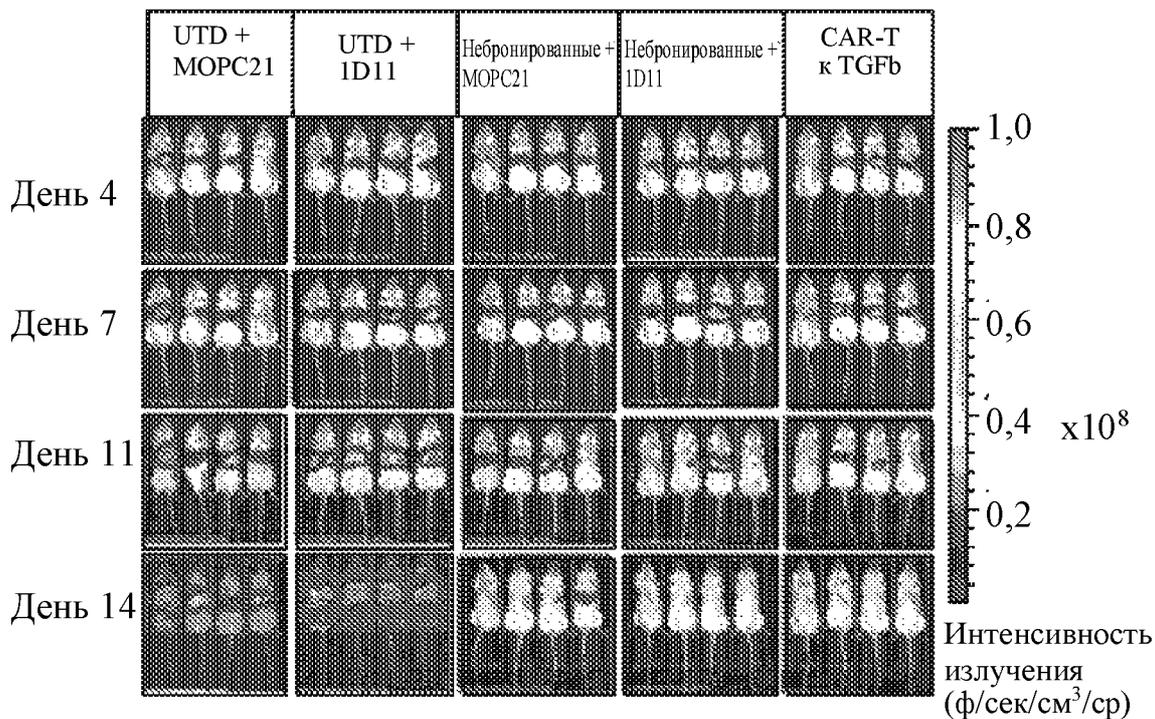
Средняя интенсивность излучения (Log10 фотонов/с) Все группы

1 D11 =  $\alpha$ TGF- $\beta$  (в/б; 10мг/кг; 2 раза в неделю)

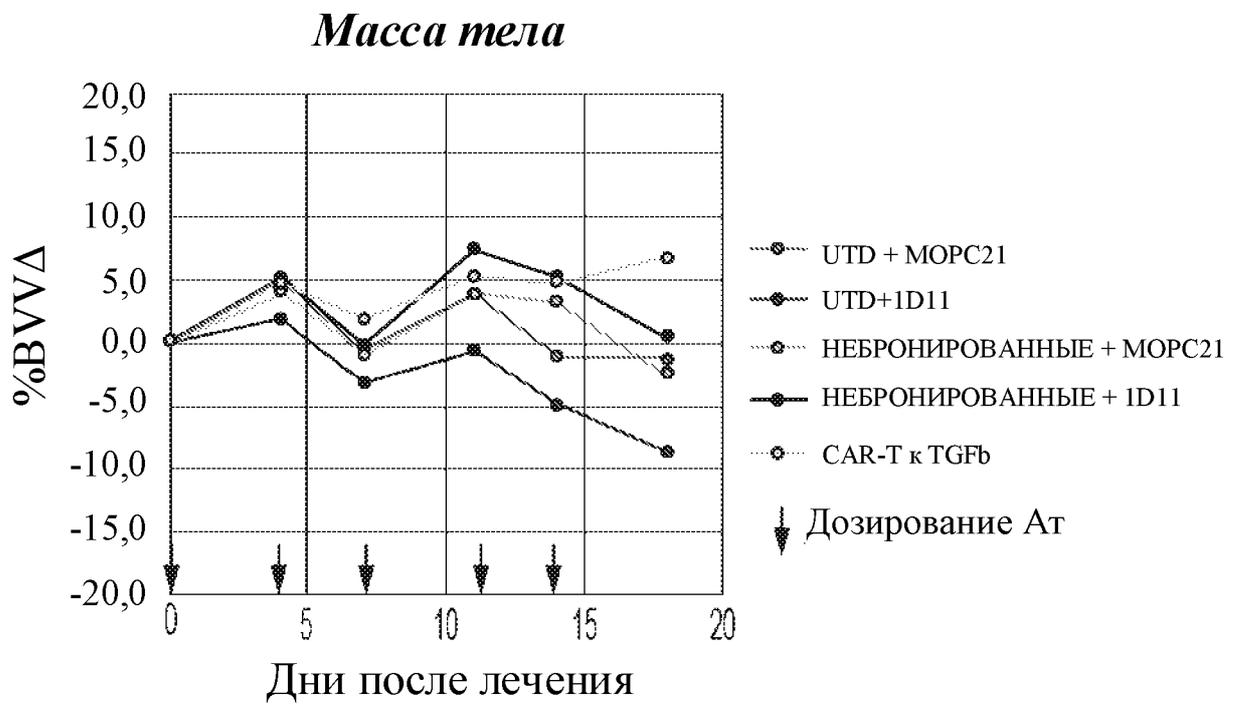
MOPC21 = изотипический контроль

CAR-T к TGF- $\beta$  секретируют мономер scFv к TGF- $\beta$ 

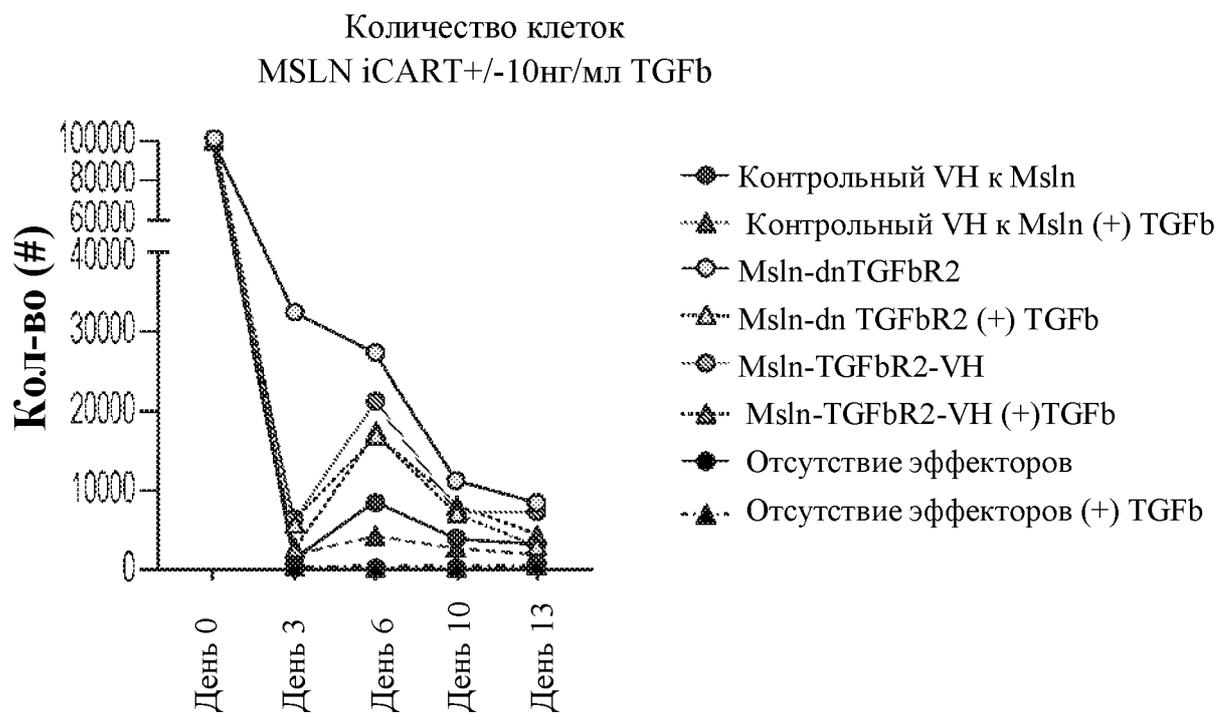
Фиг. 21А



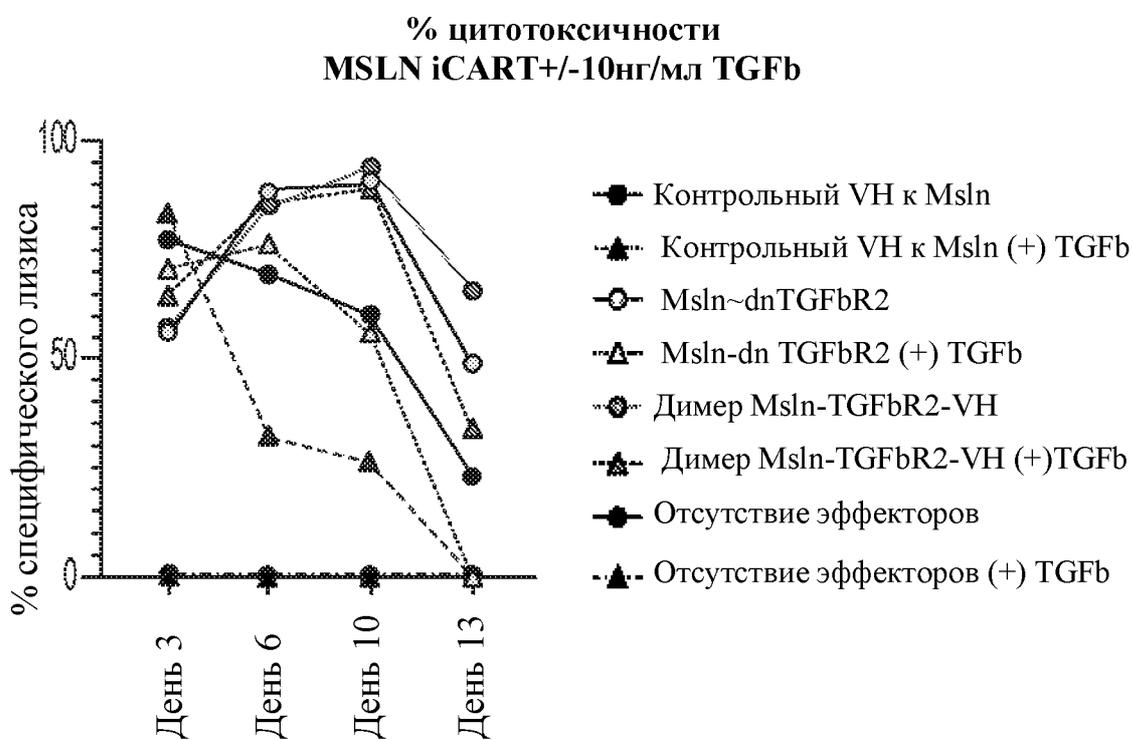
Фиг.21В



Фиг. 21С



Фиг. 22А



Фиг. 22В