

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **048058**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|---|--|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.10.23</p> <p>(21) Номер заявки
202292671</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2021.03.19</p> | <p>(51) Int. Cl. C07K 14/47 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)</p> |
|---|--|

(54) НОВЫЕ РЕКОМБИНАТНЫЕ МАРКЕРЫ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ

- | | |
|--|---|
| <p>(31) 62/992,806; 63/137,022</p> <p>(32) 2020.03.20; 2021.01.13</p> <p>(33) US</p> <p>(43) 2022.11.11</p> <p>(86) PCT/US2021/023337</p> <p>(87) WO 2021/189008 2021.09.23</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЛАЙЕЛЬ ИММЬЮНОФАРМА, ИНК.
(US)</p> <p>(72) Изобретатель:
Моффетт Хауэлл Франклин, Лажуа
Марк Джозеф, Бойкен Скотт Эдвард
(US)</p> <p>(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)</p> | <p>(56) US-A1-2017044235
WO-A2-2011056894
SENGUPTA PARIJAT ET AL.: "EGFR Juxtamembrane Domain, Membranes, and Calmodulin: Kinetics of Their Interaction", <i>BIOPHYSICAL JOURNAL</i>, vol. 96, no. 12, 1 June 2009 (2009-06-01), pages 4887-4895, XP055821447, AMSTERDAM, NL ISSN: 0006-3495, DOI: 10.1016/j.bpj.2009.03.027 abstract page 4892, right-hand column, paragraph 4-5</p> <p>MCLAUGHLIN STUART ET AL.: "An Electrostatic Engine Model for Autoinhibition and Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR/ErbB) Family", <i>THE JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY</i>, vol. 126, no. 1, 1 July 2005 (2005-07-01), pages 41-53, XP055821454, NEW YORK, US ISSN: 0022-1295, DOI: 10.1085/jgp.200509274 Retrieved from the Internet: URL:https://rupress.org/jgp/article-pdf/126/1/41/1220830/jgp126141.pdf abstract page 42, right-hand column, last paragraph - page 44, left-hand column, paragraph 2 page 45, left-hand column, paragraph 4 - page 46, left-hand column, paragraph 1 figure 1</p> <p>KOVACS ERIKA ET AL.: "A Structural Perspective on the Regulation of the Epidermal Growth Factor Receptor", <i>ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY</i>, vol. 84, no. 1, 2 June 2015 (2015-06-02), pages 739-764, XP055821460, US ISSN: 0066-4154, DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-034402 Retrieved from the Internet: URL:https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-biochem-060614-034402 page 745, paragraph 2 - page 746, paragraph 2 page 751 - page 752, paragraph 4 figures 3, 5</p> <p>WO-A1-2020070289</p> |
|--|---|
- (57) Изобретение относится к полипептидам, происходящим из EGFR, содержащим короткие околочелювные последовательности, нуклеиновым кислотам, кодирующим их, и способам их применения для повышения экспрессии на клеточной поверхности усеченных маркеров EGFR.

B1**048058****048058 B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящее изобретение заявляет приоритет предварительной заявки на патент США 62/992806, поданной 20 марта 2020 г., и предварительной заявки на патент США 63/137022, поданной 13 января 2021 г. Содержание вышеуказанных предварительных заявок в полном объеме включено в настоящий документ посредством ссылки.

Список последовательностей

Настоящее изобретение содержит список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII. Список последовательностей включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Копия ASCII, созданная 19 марта 2021 г., имеет название 026225_WO012_SL.txt и имеет размер 60198 байт.

Уровень техники

Семейство эпидермального фактора роста рецепторных тирозинкиназ (ErbBs) состоит из четырех членов: EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/HER2/Neu, ErbB3/HER3 и ErbB4/HER4 (Wieduwilt and Moasser, Cell Mol. Life Sci. (2008) 65(10): 1566-84). Эти рецепторы на высоком уровне экспрессируются в эпителиальной, мезенхимальной и нервной ткани и играют решающую роль в пролиферации, дифференцировке и развитии клеток (Yano et al., Anticancer Res. (2003) 23(5A):3639-50). Они активируются лигандами, которые индуцируют гомо- или гетеродимеризацию гомологов рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). EGFR представляет собой мономерный гликопротеин с молекулярной массой 180 кДа, содержащий большую внеклеточную область, один трансмембранный домен, внутриклеточную околосмембранную область, тирозинкиназный домен и С-концевую регуляторную область. Внеклеточная область включает четыре домена: домены I и III представляют собой гомологичные лиганд-связывающие домены, и домены II и IV представляют собой богатые цистеином домены (Ferguson, Annu. Rev. Biophys. (2008) 37:353-3).

На структурированный домен III человеческого EGFR нацелено разрешенное для применения FDA моноклональное антитело цетуксимаб (Erbix®). Отделение цетуксимаб-связывающей способности EGFR от его биологической активности посредством селективного усечения рецептора открывает потенциальную возможность для создания инертного, полностью человеческого маркера клеточной поверхности (Li et al., Cancer Cell (2005) 7(4):301-11; Wang et al., Blood (2011) 118(5): 1255-63). Однако необходимым признаком клинически применимого маркера клеточной поверхности является то, что маркер должен экспрессироваться на стабильно высоких уровнях в сконструированных клетках, чтобы сконструированные клетки можно было в достаточной степени идентифицировать и при необходимости нацеливаться на них.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к рекомбинантному полипептиду, содержащему внеклеточную область, трансмембранную область и внутриклеточную область, где внеклеточная область содержит последовательность домена III рецептора эпидермального фактора роста человека (EGFR), и внутриклеточная область (i) содержит околосмембранный домен, который имеет общий нейтральный или общий положительный заряд в первых, по меньшей мере, трех аминокислотах (ii), но не имеет активного тирозинкиназного домена EGFR. В некоторых вариантах осуществления полипептид не имеет какого-либо активного тирозинкиназного домена.

В некоторых вариантах осуществления более половины аминокислот околосмембранного домена представляют собой глицин, серин, аргинин, лизин, треонин, аспарагин, глутамин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, тирозин, триптофан, гистидин и/или пролин. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в каждом положении околосмембранного домена выбрана в соответствии с табл. 1. Например, околосмембранный домен содержит RRRHIVRKR (SEQ ID NO: 16), RRRHIVRK (SEQ ID NO: 17), RRRHIVR (SEQ ID NO: 16), (SEQ ID NO: 18), RRRHIV (SEQ ID NO: 19), RRRH1 (SEQ ID NO: 20), RRRH (SEQ ID NO: 21), RRR, RKR или RR. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная область не содержит фосфорилированных остатков.

В некоторых вариантах осуществления последовательность домена III EGFR человека может содержать последовательность SEQ ID NO: 2 или ее функциональный вариант, такой как последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичная SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления внеклеточная область дополнительно содержит на С-конце относительно последовательности домена III (i) последовательность, полученную из домена IV EGFR, (ii) искусственную последовательность или (iii) как последовательность (i), так и последовательность (ii). В конкретных вариантах осуществления внеклеточная область содержит аминокислоты 334-504, 334-525 или 334-645 из SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранная область получена из трансмембранного домена EGFR человека, необязательно содержащего SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный полипептид содержит сигнальный пептид, полученный из человеческого EGFR, человеческого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), каппа-цепи человеческого Ig, каппа-цепи мышинового Ig или человеческого CD33. Например, сигнальный пептид может содержать SEQ ID NO: 22, 23, 24 или 25.

В конкретных вариантах осуществления рекомбинантный полипептид содержит SEQ ID NO: 26, 27,

28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40; или аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичную ей.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, такой как экспрессионная конструкция, содержащая кодирующую последовательность рекомбинантного полипептида по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR). CAR может быть нацелен, например, на опухолевый антиген, такой как AFP, BCMA, CD19, CD20, CD22, CD123, EpCAM, GPC2, GPC3, HER2, MUC16, ROR1 или ROR2. В дополнительных вариантах осуществления CAR может быть биспецифическим, нацеленным, например, на CD19 и CD20 или CD19 и CD22. В некоторых вариантах осуществления кодирующие последовательности рекомбинантного полипептида и CAR функционально связаны с одним и тем же промотором (например, конститутивным или индуцибельным промотором; например, MND-промотором), так что две кодирующие последовательности котранскрибируются, и необязательно две кодирующие последовательности разделены (i) внутренним сайтом посадки рибосомы (IRES) или (ii) кодирующей последовательностью саморасщепляющегося пептида (например, 2A-пептида), где кодирующие последовательности рекомбинантного полипептида, CAR, и саморасщепляющегося пептида находятся в рамке считывания друг с другом.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит кодирующую последовательность третьего полипептида, где необязательно третий полипептид представляет собой с-Jun человека или его функциональный аналог. В дополнительных вариантах осуществления кодирующие последовательности рекомбинантного полипептида, CAR и с-Jun человека функционально связаны с одним и тем же промотором (например, конститутивным или индуцибельным промотором; например, MND-промотором), так что три кодирующие последовательности котранскрибируются, и необязательно три кодирующие последовательности отделены друг от друга (i) IRES или (ii) кодирующей последовательностью саморасщепляющегося пептида (например, 2A-пептида), где кодирующие последовательности рекомбинантного полипептида, CAR, с-Jun человека и саморасщепляющийся(е) пептид(ы) находятся в одной рамке считывания друг с другом.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вирусный вектор, необязательно лентивирусный или ретровирусный вектор.

В еще одних аспектах настоящее изобретение относится к клетке (например, аутологичным или аллогенным Т-клеткам человека), содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем документе; рекомбинантному вирусу, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты; и фармацевтической композиции, содержащей клетку, молекулу нуклеиновой кислоты или вирус, и фармацевтически приемлемый носитель.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, нуждающегося в этом, включающему введение пациенту клетки, где необязательно клетка является аутологичной или аллогенной. В некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента имеется злокачественная опухоль, и ему вводят Т-клеточный препарат, описанный в настоящем документе, где Т-клетки экспрессируют CAR, Т-клеточный рецептор (TCR), сконструированный TCR или миметик TCR, специфичный для опухолевого антигена, находящегося в злокачественной опухоли. В дополнительных вариантах осуществления способ включает введение пациенту эффективного количества антитела, специфичного к EGFR человека, после того, как пациент прошел лечение (например, злокачественная опухоль регрессировала), где антитело проявляет цитотоксичность в отношении Т-клеток, экспрессирующих рекомбинантный полипептид, и необязательно антитело представляет собой IgG1 или IgG2 (например, цетуксимаб).

Настоящее изобретение также относится к клетке, молекуле нуклеиновой кислоты, рекомбинантному вирусу, фармацевтической композиции для применения в способах лечения, а также клетке, молекуле нуклеиновой кислоты или вирусу для производства лекарственного средства для лечения пациента, как здесь описано.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения сконструированной человеческой клетки (например, сконструированных Т-клеток), включающему получение выделенной человеческой клетки и введение молекулы нуклеиновой кислоты или рекомбинантного вируса, описанного здесь, в клетку человека.

Другие признаки, цели и преимущества изобретения очевидны в нижеследующем подробном описании. Однако следует понимать, что подробное описание с указанием вариантов осуществления и аспектов изобретения приводится только в качестве иллюстрации, а не ограничения. Различные изменения и модификации в пределах объема изобретения станут очевидными специалистам в данной области техники из подробного описания.

Краткое описание фигур

На фиг. 1А и 1В показано связывание анти-EGFR антитела AY13 с живыми CAR⁺ Т-клетками, трансдуцированными R12CAR-P2A-EGFRt или R12CAR-P2A-EGFRt-DEARKAIAR, или с живыми в целом нетрансдуцированными клетками. На фиг. 1А: представлен график. На фиг. 1В: представлена столбчатая диаграмма, на которой показана количественная оценка данных средней геометрической интен-

сивности флуоресценции (gMFI) из фиг. 1А. "DEARKAIAR": околосмембранная последовательность DEARKAIARVKRESKRIVEDAERLIREAAAASEKISREAERLI (SEQ ID NO: 41). R12CAR: CAR, направленный против ROR1. P2A: саморасщепляющийся пептид. EGFRt: усеченный человеческий EGFR, содержащий внеклеточные домены III и IV EGFR и трансмембранный домен EGFR, но без доменов I и II EGFR и внутриклеточной последовательности EGFR.

На фиг. 2А показана доменная структура EGFR человека из референсной последовательности NCBI: NP_005219.2. Трансмембранный домен представляет собой SEQ ID NO: 5, и околосмембранный домен представляет собой SEQ ID NO: 15 (полноразмерная последовательность показана в SEQ ID NO: 43). В околосмембранном домене основные остатки обозначены красным цветом и "+", и кислотные - синим цветом и "-". Фосфорилированные остатки (зеленым цветом) дополнительно описаны ниже.

На фиг. 2В приведен дизайн некоторых вариантов осуществления полипептидов, происходящих из EGFR, по настоящему изобретению (с трансмембранным доменом SEQ ID NO: 5 без или с околосмембранным доменом RRR, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 13) (полноразмерные последовательности, показанные в SEQ ID NO: 44-47 соответственно, в порядке указания)). S. пептид: сигнальный пептид, полученный из GM-CSF. Звездочки указывают на С-конец полипептида.

На фиг. 3А-3С показана экспрессия ряда бицистронных экспрессионных конструкций для полипептидов, происходящих из EGFR, в первичных Т-клетках, полученных от двух доноров и трансдуцированных экспрессионными конструкциями. На фиг. 3А показана основная структура конструкций, которые включают кодирующие последовательности для R12 CAR. На фиг. 3В и 3С показаны значения gMFI для связанного слитого белка ROR1-Fc и AY13, соответственно, в живых клетках, трансдуцированных R12 CAR+, или в живых клетках в целом без трансдукции. Проточную цитометрию проводили через восемь суток после трансдукции. На фиг. 3В и 3С приведены SEQ ID NO: 16, 12, 13, 16, 12 и 13 соответственно, в порядке указания.

На фиг. 4А приведена столбчатая диаграмма, показывающая процент трансдуцированных Т-клеток, показанных экспрессией R12 CAR. Т-клетки являются клетками, которые представлены на фиг. 3А-3С. Проточную цитометрию проводили через пять суток после трансдукции. На фиг. 4А приведены SEQ ID NO: 16, 12, 13, 16, 12 и 13 соответственно, в порядке указания.

На фиг. 4В представлен график, показывающий сравнение детектирования EGFRt с использованием домен III-специфического цетуксимаба и домен III-специфического AY13. Проточную цитометрию проводили через пять суток после трансдукции. На фиг. 4В приведены SEQ ID NO: 16, 12 и 13 соответственно, в порядке указания.

На фиг. 5А и 5В представлены графики, показывающие влияние эффективности трансдукции на поверхностную экспрессию R12 CAR и EGFRt соответственно, в первичных Т-клетках, трансдуцированных бицистронными экспрессионными конструкциями, показанными на фиг. 3А-3С. Проточную цитометрию проводили через 4 суток после трансдукции. На фиг. 5А и 5В показаны SEQ ID NO: 16, 12 и 13 соответственно, в порядке указания.

На фиг. 6А-6С показана экспрессия ряда трицистронных экспрессионных конструкций для полипептидов, происходящих из EGFR, в первичных Т-клетках, полученных от двух доноров и трансдуцированных экспрессионными конструкциями. На фиг. 6А представлена основная структура конструкций. На фиг. 6В и 6С приведены значения gMFI для связанного слитого белка ROR1-Fc и AY13 соответственно, в живых клетках, трансдуцированных R12 CAR+, или в живых клетках в целом без трансдукции. Проточную цитометрию проводили через 8 суток после трансдукции. На фиг. 6В и 6С представлена SEQ ID NO: 16.

На фиг. 7 показана антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), индуцированная цетуксимабом в CAR-Т-клетках, экспрессирующих полипептиды, происходящие из EGFR, из бицистронных конструкций, показанных на фиг. 3А. На фигуре показано относительное количество CAR-Т-клеток, оставшихся после 4 ч обработки цетуксимабом, относительно CAR-Т-клеток, не обработанных антителом. Ritux: ритуксимаб.

На фиг. 8 представлен график, показывающий индуцированную цетуксимабом цитотоксичность в клетках CAR-Т, экспрессирующих полипептиды, происходящие из EGFR, из трицистронных конструкций, показанных на фиг. 6А. На фигуре показано относительное количество CAR-Т-клеток, оставшихся после 4 ч обработки цетуксимабом, относительно CAR-Т-клеток, не обработанных антителом. На фиг. 8 представлена SEQ ID NO: 16.

На фиг. 9 показана цитотоксичность, индуцированная цетуксимабом, в клетках CAR-Т, экспрессирующих полипептиды, происходящие из EGFR, из трицистронных конструкций, показанных на фиг. 6А. На фигуре показано относительное количество CAR-Т-клеток, оставшихся после 24 ч обработки цетуксимабом, относительно CAR-Т-клеток, не обработанных антителом. На фиг. 9 показана SEQ ID NO: 16.

На фиг. 10 представлена столбчатая диаграмма, на которой показана количественная оценка данных gMFI для связывания анти-EGFR антитела в живых клетках ROR1 CAR+, трансдуцированных EGFRt или его вариантами, имеющими дополнительные внутриклеточные околосмембранные последовательности (R, RR, RRR или RKR), или в живых в целом клетках без трансдукции.

На фиг. 11А и 11В показаны уровни поверхностной экспрессии EGFRt (белый цвет) или EGFR-RRR (EGFRt с околосмембранным доменом RRR; серый цвет) в мышинных Т-клетках, трансдуцированных ретровирусными конструкциями MP71, которые были моноцистронными (фиг. 11А) или бицистронными (фиг. 11В). MFI: средняя интенсивность флуоресценции.

На фиг. 12А представлена схема (верхняя панель) исследования *in vivo* указанных CAR-Т-клеточных продуктов для инфузии (средняя панель) и уровней экспрессии EGFR полипептидов EGFRt или EGFR-RRR (нижняя панель).

На фиг. 12В представлена панель графиков, показывающих кинетику циркулирующих EGFRt и EGFR-RRR CAR-Т-клеток после обработки цетуксимабом (Cetx) (белые кружки) по сравнению с ритуксимабом (контроль; Ritx) (черные кружки). Серая линия представляет временную точку истощения.

На фиг. 12С приведены результаты исследования *in vivo* кинетики истощения циркулирующих EGFRt и EGFR-RRR трансдуцированных Т-клеток. Верхняя панель: схема, показывающая адоптивный перенос EGFR+ Т-клеток. Нижняя панель: графики, показывающие кинетику циркулирующих EGFR+ Т-клеток после обработки цетуксимабом (белые кружки). Серая линия представляет временную точку истощения.

На фиг. 13А приведены результаты исследования *in vivo* кинетики истощения циркулирующих EGFRt (слева) и EGFR-RRR (справа) CAR-Т-клеток после обработки цетуксимабом (белые кружки) или носителем (черные кружки). Заштрихованная область представляет окно после истощения.

На фиг. 13В приведена кинетика восстановления циркулирующих В-клеток в исследовании, показанном на фиг. 13А. Как указано, использовали две разные дозы цетуксимаба.

На фиг. 13С показана частота апластических В-клеток у животных (ниже 3% CD19+ от общего количества CD45) после введения высокой (1 мг) или низкой (0,1 мг) дозы цетуксимаба.

Подробное описание изобретения.

Важным компонентом клеточной терапии является компактный, функционально инертный маркер клеточной поверхности, который можно использовать для детектирования, селекции и обогащения сконструированных клеток, а также для абляции клеток *in vivo*. Настоящее изобретение относится к новым белкам, полученным из EGFR, которые можно использовать для этих целей. Данные белки лишены функций связывания лиганда и/или передачи сигнала, присущих EGFR дикого типа, но все же могут распознаваться обычными анти-EGFR антителами.

Благодаря дизайну своих последовательностей белки по настоящему изобретению, полученные из EGFR, могут экспрессироваться на высоких уровнях на клеточной поверхности и, следовательно, особенно пригодны в качестве переключателя безопасности (гена "самоубийства") в клеточной терапии. Когда сконструированные клетки в терапии больше не требуются в организме, то пациенту можно вводить анти-EGFR антитело фармацевтического качества, такое как цетуксимаб, панитумумаб, нимотузумаб или нецитумумаб, тем самым обеспечивая удаление сконструированных клеток посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), комплементзависимой цитотоксичности (CDC) и/или антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

В рамках настоящего изобретения, если не указано иное, то EGFR относится к EGFR человека. Последовательность полипептида EGFR человека можно найти в базе данных UniProt (идентификационный номер P00533-1), и она может иметь следующую последовательность:

```

1      MRPSGTAGAA LLALLAALCP ASRALEEKKV CQGTSNKLTQ LGTFEDHFLS LQRMFNCEV
61     VLGNLEITYV QRNYDLSFLK TIQEVAGYVL IALNTVERIP LENLQIIRGN MYYENSYALA
121    VLSNYDANKT GLKELPMRNL QEILHGAVRF SNNPALCNVE SIQWRDIVSS DFLSNMSMDF
181    QNHLGSCQKC DPSCPNGSCW GAGEENCQKL TKLICAQQCS GRCRGKSPSD CCHNQCAAGC
241    TGPRESDCLV CRKFRDEATC KDTCPPLMLY NPTTYQMDVN PEGKYSFGAT CVKKCPRNYV
301    VTDHGSCVRA CGADSYEMEE DGVRKCKKCE GPCRKVCNGI GIGEFKDSLS INATNIKHFK
361    NCTSIISGLH ILPVAFRGDS FTHTPPLDPQ ELDILKTVKE ITGFLLIQAW PENRTDLHAF
421    ENLEIIRGRT KQHGOFSLAV VSLNITSLGL RSLKEISDGD VIIISGNKNLC YANTINWKKL
481    FGTSGQKTKI ISNRGENSCK ATGQVCHALC SPEGQWGPPEP RDCVSCRNVV RGRECVDKCN
541    LLEGEPREFV ENSECIQCHP ECLPQAMNIT CTGRGPDNCI QCAHYIDGPH CVKTCPAGVM
601    GENNTLVWKY ADAGHVCHLC HPNCTYGGTG FGLBGCPTNG PKIPIIATGM VGALLLLLVV
661    ALGIGLFMRK RHIVRKRTRL RLLQERELVE PLTPSGEAPN QALLRILKET EFKKIKVLGS
721    GAFGTVYKGL WIPEGEKVKI PVAIKELREA TSPKANKEIL DEAYVMASVD NPHVCRLLGI
781    CLTSTVQLIT QLMFPGCLLD YVREHKDNIG SQYLLNWCVQ IAKGMNYLED RRLVHRDLAA
841    RNVLVKTPQH VKITDFGLAK LLGABEKEYH AEGGKVPKIV MALESILHRI YTHQSDVWSY
901    GVTVWELMTF GSKPYDGIPIA SEISSILEKG ERLPQPPICT IDVYMIMVKC WMI DADSRPK
961    FRELIIEFSK MARDEQRYLV IQGDERMHLF SPTDSNFYRA LMD EEDMDDV VDADEYLIPO
1021   QGFFSSPSTS RTPLLSSLSA TSNNSTVACI DRNGLQSCPI KEDSFLQRYV SDPTGALTED
1081   SIDDTFLPVP EYINQSVPKR PAGSVQNPVY HNQLPNEAPS RDPHYQDPHS TAVGNPEYLN
1141   TVQFTCVNST FDSPAHWAQK GSHQISLDNP DYQQDFFPKE AKPNGIFKGS TAENAEYLRV
1201   APOSSSEFIGA (SEQ ID NO:1)

```

В вышеприведенной последовательности различные домены EGFR разграничиваются следующим образом. Сигнальный пептид охватывает аминокислоты 1-24. Внеклеточная последовательность охватывает аминокислоты 25-645, где домен I, домен II, домен III и домен IV охватывают аминокислоты 25-188, 189-333, 334-504 и 505-645 соответственно. Трансмембранный домен охватывает аминокислоты 646-668. Внутриклеточный домен охватывает аминокислоты 669-1210, околосмембранный домен охватывает ами-

нокислоты 669-703, и тирозинкиназный домен охватывает аминокислоты 704-1210. Если не указано иное, то указанное здесь аминокислотное положение EGFR относится к положению в SEQ ID NO: 1 или соответствующему положению в варианте SEQ ID NO: 1 (например, природному полиморфному варианту или сконструированному варианту).

I. Полипептиды, полученные из EGFR.

Рекомбинантные полипептиды по настоящему изобретению происходят из EGFR, но содержат только частичную, а не полноразмерную последовательность EGFR. Эти полипептиды представляют собой белки клеточной поверхности при экспрессии в клетках млекопитающих. Внеклеточная, трансмембранная и внутриклеточная области полипептидов описаны ниже.

A. Внеклеточная область.

Внеклеточная область полипептидов по настоящему изобретению, полученных из EGFR, содержит эпитоп, связанный с анти-EGFR антителом, таким как цетуксимаб. Например, область может содержать домен III EGFR, такой как следующая последовательность домена III или ее функциональный вариант:

RKVCNGIGIG EFKDLSINA TNIKHFKNCT SISGDLHLIP VAFRGDSFTH

TPPLDPQELD ILKTVKEITG FLLIQAWPEN RTDLHAFENL EIIRGRTKQH GQFSLAVVSL

NITSLGLRSL KEISDGDVII SGNKNLCYAN TINWKKLFGT SGQKTKIISN RGENSCKATG

Q (SEQ ID NO:2)

Под "функциональным вариантом" понимается последовательность, имеющая вариации последовательности, такие как делеции, инсерции и/или замены (например, консервативные замены), которые не влияют отрицательно на желаемую биологическую функцию последовательности. Функциональный вариант SEQ ID NO: 2 может по-прежнему связываться с цетуксимабом.

Для поддержания третичной структуры последовательности домена III внеклеточная область может также содержать дополнительные последовательности EGFR, такие как последовательности, которые способствуют стабилизации дисульфидных связей в структуре домена III. Например, внеклеточная область может содержать последовательность домена III, за которой следует последовательность, полученная из домена IV EGFR. Последовательность, полученная из домена IV, может содержать следующую последовательность домена IV:

VCHALCSPEG C^WGPEPRDCV SCRNVSRGRE CVDKCNLLEG EPREFVENSE

CIQCHPECLP QAMNITCTGR GPDNCIQCAH YIDGPHCVKT CPAGVMGENN

TLVWKYADAG HVCHLCHPNC TYGCTGPGLE GCPTNGPKIP S (SEQ ID NO:3)

Альтернативно последовательность, происходящая из домена IV, может содержать функциональный вариант SEQ ID NO: 3. Такой функциональный вариант может способствовать поддержанию третичной структуры домена III, чтобы сделать возможным связывание полипептида анти-EGFR антителом, таким как цетуксимаб. Функциональный вариант может содержать только часть природного домена IV EGFR с дополнительными последовательностями, гетерологичными для EGFR, или без них (т.е. последовательностями, которые не являются частью природной последовательности EGFR).

В некоторых вариантах осуществления последовательность, полученная из домена IV, включает часть последовательности природного домена IV EGFR, где эта часть включает аминокислотные остатки, участвующие в поддержании структурной укладки домена III. Такие аминокислотные остатки включают остаток W492 зрелого EGFR (соответствующий W516 в SEQ ID NO: 1 и W12 в SEQ ID NO: 3; находящийся в рамке в вышеприведенных последовательностях) и необязательно один или более остатков, смежных с ним. Структурный анализ показывает, что W492 важен для фолдинга домена III EGFR, поскольку этот остаток направлен в ядро домена III и осуществляет важные взаимодействия при упаковке боковых цепей. Примерами последовательностей, происходящих из домена IV, являются последовательности, включающие остатки 492-496 зрелого EGFR (соответствующие остаткам 516-520 SEQ ID NO: 1 и остаткам 12-16 SEQ ID NO: 3).

Одним конкретным примером последовательности, полученной из домена IV, является последовательность V^TIGSG^WWGPEP^GGGG^S (SEQ ID NO: 4), где остатки 482-491 и 497-621 природного домена IV удалены, V481 соединен с W492 через синтетический линкер из четырех остатков (находится в рамке выше), и за R496 следует линкер G/S (подчеркнут выше), связывающий его с трансмембранной областью полипептида по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления во внеклеточной области полипептидов по настоящему изобретению, полученных из EGFR, отсутствует внеклеточная область EGFR, которая связывается с лигандами, такими как EGF и TGF-альфа. Например, внеклеточная область не включает какую-либо последовательность домена I и/или домена II EGFR или включает только частичные последовательности из одного или обоих доменов.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточная область полипептидов по настоящему изобретению включает дополнительные последовательности. Например, внеклеточная область может включать стеблевую область, непосредственно примыкающую к N-концу трансмембранного домена. Стеблевая область может представлять собой, например, гибкий стебель, такой как G/S-богатый пептидный линкер, или структурированный стебель, такой как домены CH2-CH3 из константной области антитела или вне-

клеточный домен из другого белка. Внеклеточная область также может содержать дополнительный функциональный домен, такой как антигенсвязывающие домены (например, scFv или сконструированный белок с анкириновыми повторами (DARPin)).

В. Трансмембранная область.

Трансмембранная область полипептидов по настоящему изобретению содержит гидрофобную последовательность. Эта область может содержать искусственную последовательность или может быть получена из любого трансмембранного белка, который может представлять собой, например, ERBB1 (EGFR), ERBB2 (HER2), ERBB3 (HER3), ERBB4 (HER4), INSR, IGF1R, INSR, PGFRA, PGFRB, KIT, CSF1R, FLT3, VGFR1, VGFR2, VGFR3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, PTK7, NTRK1, NTRK2, NTRK3, ROR1, ROR2, MUSK, MET, RON, UFO, TYRO3, MERTK, TIE1, TIE2, ERHA1, ERHA2, ERHA3, ERHA4, ERHA5, ERHA6, ERHA7, ERHA8, ERHAA, ERHB1, ERHB2, ERHB3, ERHB4, ERHB6, RET, RYK, DDR1, DDR2, ROS1, LMTK1, LMTK2, LMTK3, LTK, ALK или STYK1.

Один конкретный пример трансмембранной области получен из EGFR с последовательностью IATGMVGLLLLLVVALGIGLFM (SEQ ID NO: 5) или ее функциональным вариантом.

С. Внутриклеточная область.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что включение соответствующего околосмембранного домена во внутриклеточную область белка, полученного из EGFR, заметно повышает уровень экспрессии белка на клеточной поверхности. Околосмембранный домен относится к внутриклеточной области белка клеточной поверхности, находящейся непосредственно на С-конце относительно трансмембранного домена. Высокий уровень экспрессии на клеточной поверхности гарантирует, что клетка, экспрессирующая белок, распознается анти-EGFR антителом и, таким образом, обеспечивает удаление клетки посредством, например, ADCC, CDC и/или ADCP.

Околосмембранный домен в полипептиде по настоящему изобретению может иметь от 1 до 20 (например, 2-20, 3-20, 4-20, 5-20, 2-18, 3-18, 4-18 или 5-18) аминокислот в длину. Они также могут быть длиннее чем 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления первые 1 или более (например, первые 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20) аминокислот внутриклеточной области полипептида по настоящему изобретению представляют собой последовательность, имеющую общий нейтральный или общий положительный заряд (например, количество остатков аргинина и лизина больше или равно количеству остатков аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты). В дополнительных вариантах осуществления эти первые аминокислоты содержат более 30% (например, более 40, 50, 60, 70, 80 или 90%) гидрофильных аминокислот. Неограничивающие примеры выбора аминокислот в каждом положении последовательности, присоединенной к С-концу трансмембранного домена, приведены в табл. 1 ниже.

Таблица 1

Положение	Возможные аминокислоты
1	R, K, C, L, H, S, N, A, Y, F, M, W, G, T, Q
2	R, K, C, G, L, Q, I, Y, F, M, N, S, T, W, H
3	R, K, L, C, M, W, Y, I, N, V, T, Q, A, F, G, S, D, E, H
4	R, K, H, Q, G, S, C, N, V, W, P, F, T, D, E, Y
5	R, K, Q, C, G, A, I, L, N, P, T, W, S, D, E, Y, H
6	K, R, Q, P, V, D, N, Y, I, E, C, A, H, W, G, F, S, T
7	K, R или другая аминокислота
8	K, R, S, Q, G, L, I, T, P, Y, N, A, F, W, D, H, E
9	K, R, G, L, Y, E, F, Q, S, A, H, P, T, N, D, W
10	G, A, E, R, D, K, T, Y, V, F, S, M, Q, L, N, P, W, H
11	K, R, Q, S, A, E, L, T, P, N, I, D, F, G, V, Y, W, H
12	Любая аминокислота
13	S, E, R, F, K, P, L, Y, D или другая аминокислота
14	T, R, S, E, A, P, Q, K, N, V или другая аминокислота
15	D, E, S, L, P, A, R, V, M, или другая аминокислота
16	E, V, Q, A или другая аминокислота
17	E, L, D, Q, V, A, K или другая аминокислота
18	Любая аминокислота
19	Любая аминокислота
20	E, G, L, R, S, V, Y, K, D или другая аминокислота

Некоторые неограничивающие примеры таких околосмембранных доменов приведены ниже.

Таблица 2

SEQ ID NO	Последовательность	Общий заряд
недоступно	K	+1
недоступно	KR	+2
недоступно	KRK	+3
недоступно	KSR	+2
6	KSGSGS	+1
недоступно	SKR	+2
7	KRSD	+1
8	KRSDK	+2
9	SGGGG	0
10	SGAGG	0
11	KRADK	+2
12	RRRSGGGSGGGGS	+3
13	SGGGSGGGGS	0
14	(GGGS)n, n >1	0

Околосмембранный домен по настоящему изобретению может быть получен из околосмембранной области природного белка клеточной поверхности, такой как околосмембранная область (например, полноразмерная или частичная последовательность из первых 20 околосмембранных аминокислот) рецепторной тирозинкиназы человека, которая взаимодействует с фосфатидилхолином (PC), фосфатидилсеринем (PS) или фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатом (PIP2) (см., например, Hedger et al., Sci. Rep. (2015) 5: 9198). Примерами рецепторных тирозинкиназ являются ERBB1 (EGFR), ERBB2 (HER2), ERBB3 (HER3), ERBB4 (HER4), INSR, IGF1R, INSR, PGFRA, PGFRB, KIT, CSF1R, FLT3, VGFR1, VGFR2, VGFR3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, PTK7, NTRK1, NTRK2, NTRK3, ROR1, ROR2, MUSK, MET, RON, UFO, TYRO3, MERTK, TIE1, TIE2, EPHA1, EPHA2, EPHA3, EPHA4, EPHA5, EPHA6, EPHA7, EPHA8, EPNAA, EPHB1, EPHB2, EPHB3, EPHB4, EPHB6, RET, RYK, DDR1, DDR2, ROS1, LMTK1, LMTK2, LMTK3, LTK, ALK и STYK1. Если желательно, то полученная последовательность может содержать мутации (например, замены или делеции), в результате которых удаляются остатки, о которых известно, что они являются фосфорилированными, чтобы обойти любую непреднамеренную способность данного белка передавать сигнал.

В некоторых вариантах осуществления околосмембранный домен настоящего полипептида содержит околосмембранную область EGFR, такую как: RRRHIVRKR□□LRLLQERELVEPL□□PSGEAPNQAL (SEQ ID NO: 15).

В некоторых вариантах осуществления околосмембранный домен, происходящий из EGFR, получен из первых 19 аминокислот природной околосмембранной области EGFR (например, SEQ ID NO: 15), и не включает полностью оставшуюся часть природной околосмембранной области, для избежания димеризации полипептида по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления известные фосфорилированные остатки (находящиеся в рамке выше, соответствующие T678, T693 и S695 SEQ ID NO: 1) делецированы или заменены. Неограничивающие примеры околосмембранных доменов, происходящих из EGFR, включают одну из следующих последовательностей:

Таблица 3

SEQ ID NO	Последовательность	Общий заряд
16	RRRHIVRKR	+6
17	RRRHIVRK	+5
18	RRRHIVR	+4
19	RRRHIV	+3
20	RRRH	+3
21	RRRH	+3
недоступно	RRR	+3
недоступно	RKR	+3
недоступно	RR	+2
недоступно	R	+1

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная область также включает дополнительную последовательность на С-конце относительно околочембранного домена, например, функциональный домен (например, переключатель рецептора).

В данном белке, полученном из EGFR, отсутствует функциональный тирозинкиназный домен EGFR, так что белок не обладает способностью передавать сигнал. Например, в белке отсутствует полная область, которая соответствует аминокислотам 704-1210 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточная область не содержит какого-либо потенциального мотива фосфорилирования.

D. Сигнальный пептид.

В некоторых вариантах осуществления кодирующая последовательность полипептида по настоящему изобретению включает кодирующую последовательность сигнального пептида. Сигнальный пептид может способствовать экспрессии полипептида на клеточной поверхности, и отщепляется от зрелого полипептида. Сигнальный пептид может быть получен из любого белка клеточной поверхности или секретируемого белка. Например, сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид, показанный ниже.

Таблица 4

SEQ ID NO	Источник	Последовательность
22	EGFR	MRPSGTAGAALLALLAALCPA SRA
23	GM-CSF	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP
24	каппа-цепь человеческого Ig	MVLQTVFISLLLWISGAYG
25	человеческий CD33	MPLLLLPLWAGALA

Различные домены, описанные выше для внеклеточной, трансмембранной и внутриклеточной областей полипептидов по настоящему изобретению, могут быть связаны напрямую или через пептидный линкер.

E. Примеры полипептидов, полученных из EGFR.

В некоторых вариантах осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит, состоит из или по существу состоит из домена III EGFR (выделен курсивом), домена IV (подчеркнут) и трансмембранного домена с околочембранным доменом (не показан), присоединенным к С-концу трансмембранного домена с сигнальным пептидом или без него (не показан):

RKVCNGIGIGEFKDSLINATNIKHFKNCTISISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQEL
DILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD
GDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEP
RDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCI
QCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCP
TNGPKIPSIATGMV GALLLLLVVALGIGLFM (SEQ ID NO:26)

В некоторых вариантах осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит, состоит из или по существу состоит из домена III EGFR (выделен курсивом), модифицированного участка домена IV EGFR (выделен жирным шрифтом и подчеркнут), трансмембранного домена EGFR и околочембранного домена (не показан), присоединенного к С-концу трансмембранного домена с сигнальным пептидом или без него (не показан):

*RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQEL
DILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD
GDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCGWPE
PRDCVSGGSPSIATGMVGALLLLL VVALGIGLFM (SEQ ID NO:27)*

В некоторых вариантах осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит, состоит из или по существу состоит из домена III EGFR (выделен курсивом), синтетической последовательности (выделена жирным шрифтом и подчеркнута), трансмембранного домена EGFR и околосмембранного домена (не показан), присоединенного к С-концу трансмембранного домена с сигнальным пептидом или без него (не показан):

*RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQEL
DILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD
GDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQ**TGSGWGPEPGGGSPSI**
ATGMVGALLLLL VVALGIGLFM (SEQ ID NO:28)*

В некоторых вариантах осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит, состоит из или по существу состоит из сигнального пептида GM-CSF (выделен жирным шрифтом), домена III EGFR (выделен курсивом), домена IV EGFR (подчеркнут), трансмембранного домена EGFR (выделен жирным шрифтом и курсивом) и околосмембранного домена, имеющего последовательность RRR:

***MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP**RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDL
HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRKQH
GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENS
CKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRGREGVDKCNLLEGEPRFVENSECQ
CHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAG
HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPK**PSI**ATGMVGALLLLL VVALGIGLF**MRRR**
(SEQ ID NO:29)*

В некоторых вариантах осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит, состоит из или по существу состоит из сигнального пептида GM-CSF (выделен жирным шрифтом), домена III EGFR (выделен курсивом), домена IV EGFR (подчеркнут), трансмембранного домена EGFR (выделен жирным шрифтом и курсивом) и околосмембранного домена, имеющего последовательность RRRHIVRKR (SEQ ID NO: 16):

***MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP**RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDL
HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRKQH
GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENS
CKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRGREGVDKCNLLEGEPRFVENSECQ
CHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAG
HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPK**PSI**ATGMVGALLLLL VVALGIGLF**MRRRHI**
VRKR (SEQ ID NO:30)*

В некоторых вариантах осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит, состоит из или по существу состоит из сигнального пептида GM-CSF (выделен жирным шрифтом), домена III EGFR (выделен курсивом), домена IV EGFR (подчеркнут), трансмембранного домена EGFR (выделен жирным шрифтом и курсивом) и околосмембранного домена, имеющего последовательность RRRSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 12):

***MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP**RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDL
HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRKQH
GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENS
CKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRGREGVDKCNLLEGEPRFVENSECQ
CHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAG
HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTNGPK**PSI**ATGMVGALLLLL VVALGIGLF**MRRRSG**
GGGSGGGGS (SEQ ID NO:31)*

В некоторых вариантах осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит, состоит из или по существу состоит из сигнального пептида GM-CSF (выделен жирным шрифтом), домена III EGFR (выделен курсивом), домена IV EGFR (подчеркнут), трансмембранного домена EGFR (выделен жирным шрифтом и курсивом) и околосмембранного домена, имеющего последовательность SGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDL
HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH
GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENS
CKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPPREFVENSECIQ
CHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLVWKYADAG
HVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFMSGGGG
SGGGGS (SEQ ID NO:32)

В некоторых вариантах осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит, состоит из или по существу состоит из сигнального пептида GM-CSF (выделен жирным шрифтом), домена III EGFR (выделен курсивом), модифицированного участка домена IV EGFR (подчеркнут), трансмембранного домена EGFR (выделен жирным шрифтом и курсивом), и околосмембранного домена, имеющего последовательность RRR:

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDL
HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH
GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENS
CKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSGGPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFMRRR
RRR (SEQ ID NO:33)

В некоторых вариантах осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит, состоит из или по существу состоит из сигнального пептида GM-CSF (выделен жирным шрифтом), домена III EGFR (выделен курсивом), модифицированного участка домена IV EGFR (подчеркнут), трансмембранного домена EGFR (выделен жирным шрифтом и курсивом), и околосмембранного домена, имеющего последовательность RRRHIVRKR (SEQ ID NO: 16)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDL
HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH
GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENS
CKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSGGPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFMRRRRHI
VRKR (SEQ ID NO:34)

В некоторых вариантах осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит, состоит из или по существу состоит из сигнального пептида GM-CSF (выделен жирным шрифтом), домена III EGFR (выделен курсивом), модифицированного участка домена IV EGFR (подчеркнут), трансмембранного домена EGFR (выделен жирным шрифтом и курсивом), и околосмембранного домена, имеющего последовательность RRRSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 12):

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDL
HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH
GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENS
CKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSGGPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFMRRRSG
GGGSGGGGS (SEQ ID NO:35)

В некоторых вариантах осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит, состоит из или по существу состоит из сигнального пептида GM-CSF (выделен жирным шрифтом), домена III EGFR (выделен курсивом), модифицированного участка домена IV EGFR (подчеркнут), трансмембранного домена EGFR (выделен жирным шрифтом и курсивом), и околосмембранного домена, имеющего последовательность SGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13):

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDL
HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH
GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENS
CKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSGGPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFMSGGG
GSGGGGS (SEQ ID NO:36)

В некоторых вариантах осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит, состоит из или по существу состоит из сигнального пептида GM-CSF (выделен жирным шрифтом), домена III EGFR (выделен курсивом), синтетической последовательности (подчеркнута), трансмембранного домена EGFR (выделен жирным шрифтом и курсивом), и околосмембранного домена, имеющего последовательность RRR:

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDL
HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH
GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENS
CKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSGGPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFMRRR (SEQ ID NO:37)

В некоторых вариантах осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит, состоит

из или по существу состоит из сигнального пептида GM-CSF (выделен жирным шрифтом), домена III EGFR (выделен курсивом), синтетической последовательности (подчеркнута), трансмембранного домена EGFR (выделен жирным шрифтом и курсивом) и околосмембранного домена, имеющего последовательность RRRHIVRKR (SEQ ID NO: 16):

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDL
HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH
GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKLCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENS
CKATGQTGSGWGPEPGGGSPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFMRRRHIVRKR (SEQ ID
 NO:38)

В некоторых вариантах осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит, состоит из или по существу состоит из сигнального пептида GM-CSF (выделен жирным шрифтом), домена III EGFR (выделен курсивом), синтетической последовательности (подчеркнута), трансмембранного домена EGFR (выделен жирным шрифтом и курсивом) и околосмембранного домена, имеющего последовательность RRRSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 12):

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDL
HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH
GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKLCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENS
CKATGQTGSGWGPEPGGGSPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFMRRRSGGGSGGGGS
 (SEQ ID NO:39)

В некоторых вариантах осуществления полипептид по настоящему изобретению содержит, состоит из или по существу состоит из сигнального пептида GM-CSF (выделен жирным шрифтом), домена III EGFR (выделен курсивом), синтетической последовательности (подчеркнута), трансмембранного домена EGFR (выделен жирным шрифтом и курсивом) и околосмембранного домена, имеющего последовательность SGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13):

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDL
HILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQH
GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKLCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENS
CKATGQTGSGWGPEPGGGSPSIATGMV GALLLLL VVALGIGLFMSGGGGSGGGGS
 (SEQ ID NO:40)

Также в настоящем описании представлены полипептиды, происходящие из EGFR, которые по меньшей мере на 90% (например, по меньшей мере на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичны вышеприведенным в качестве примера последовательностям.

II. Экспрессионные конструкции для белков, полученных из EGFR.

Настоящее изобретение относится к экспрессионным конструкциям, подходящим для экспрессии белков, полученных из EGFR, в клетках, которые используются в клеточной терапии. Экспрессионная конструкция по настоящему изобретению включает экспрессионную кассету, содержащую кодирующий последовательность полипептида, полученного из EGFR (предпочтительно включающую сигнальный пептид), операбельно связанную с одним или более регуляторными элементами транскрипции. В рамках настоящего изобретения, термин "регуляторные элементы транскрипции" относится к нуклеотидным последовательностям в экспрессионной конструкции, которые контролируют экспрессию кодирующей последовательности, например, посредством регуляции тканеспецифических паттернов экспрессии и эффективности транскрипции кодирующей последовательности полипептида, происходящей из EGFR, стабильности транскриптов РНК и эффективность трансляции транскриптов РНК. Такими элементами могут быть один или более промоторов, последовательность Козака, энхансер, стабилизирующий PFQC элемент (например, последовательность WPRE), сигнал полиаденилирования и любая их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления экспрессионная кассета содержит промотор млекопитающего, который является конститутивно активным или индуцибельным в клетках-мишенях. Примерами пригодных промоторов являются, без ограничения, LTR вируса мышинного лейкоза Молони (MoMuLV), MND (синтетический промотор, содержащий область U3 модифицированного LTR MoMuLV с энхансером вируса миелопротиферативной саркомы), LTR вируса саркомы Рауса (RSV), промотор цитомегаловируса (CMV), немедленный ранний промотор CMV, промотор обезьяньего вируса 40 (SV40), промотор дигидрофолатредуктазы (DHFR), промотор β-актина, промотор фосфолицераткиназы (PGK), промотор EFlα, промотор тимидинкиназы (TK), промотор, чувствительный к тетрациклину (TRE), промотор фактора E2 (E2F), промотор обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT) и промотор, реагирующий RU-486.

В некоторых вариантах осуществления экспрессионная кассета также содержит дополнительные регуляторные последовательности, например, внутренний сайт посадки рибосомы (IRES) или последовательность, кодирующую саморасщепляющийся пептид, для обеспечения коэкспрессии другого полипептида в дополнение к EGFR-происходящему полипептиду. Примерами саморасщепляющихся пептидов

(также известных как пептиды с пропуском рибосомы) являются пептиды 2А, которые представляют собой пептиды вирусного происхождения с типичной длиной 18-22 аминокислот, и они включают Т2А, Р2А, Е2А и F2А (Liu et al., *Sci. Rep.* (2017) 7:2193).

В некоторых вариантах осуществления экспрессионная конструкция по настоящему изобретению также экспрессирует антигенный рецептор и/или другой дополнительный полипептид. Антигенный рецептор может представлять собой, например, антитело, сконструированное антитело, такое как scFv, CAR, сконструированный TCR, миметик TCR (например, антитело-Т-клеточный рецептор (abTCR) или химерное антитело-Т-клеточный рецептор (caTCR)) или химерный сигнальный рецептор (CSR). Например, abTCR может содержать сконструированный TCR, в котором антигенсвязывающий домен TCR (например, альфа/бета TCR или гамма/дельта TCR) заменен доменом антитела (с или без константных доменов антитела); затем сконструированный TCR становится специфичным к антигену антитела, сохраняя при этом сигнальные функции TCR. CSR может содержать (1) внеклеточный связывающий домен (например, внеклеточный домен природного/модифицированного рецептора, внеклеточный домен

природного/модифицированного лиганда, scFv, нанотело, Fab, DARPIn и аффитело), (2) трансмембранный домен и (3) внутриклеточный сигнальный домен (например, домен, который активирует факторы транскрипции или рекрутирует и/или активирует JAK/STAT, киназы, фосфатазы и убиквитин, SH3, SH2 и PDZ). См., например, EP 340793 B1, WO 2017/070608, WO 2018/200582, WO 2018/200583, WO 2018/200585 и Xu et al., *Cell Discovery* (2018)4:62.

Антигенный рецептор может быть нацелен на представляющий интерес антиген (например, опухолевый антиген или антиген патогена). Антигены могут включать, без ограничения, AFP (альфа-фетопротейн), $\alpha\beta 6$ или другой интегрин, BCMA, B7-H3, B7-H6, CA9 (карбоангидразу 9), CCL-1 (хемокин C-C мотив лиганд 1), CD5, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD45, CD47, CD56, CD66e, CD70, CD74, CD79a, CD79b, CD98, CD123, CD138, CD171, CD352, CEA (карциноэмбриональный антиген), клаудин 18.2, клаудин 6, с-MET, DLL3 (дельта-подобный белок 3), DLL4, ENPP3 (член 3 семейства эктонуклеотидов пирофосфатаз/фосфодиэстераз), EpCAM, EPG-2 (эпителиальный гликопротеин 2), EPG-40, эфринB2, EPHa2 (рецептор эфрина A2), димеры ERBB, эстрогеновый рецептор, ETBR (рецептор эндотелина B), FAP- α (белок активации фибробластов α), фетальный AchR (фетальный ацетилхолиновый рецептор), FBP (фолат-связывающий белок), FCRL5, FR- α (рецептор фолата альфа), GCC (гуанилциклаза C), GD2, GD3, GPC2 (глипикан-2), GPC3, gp100 (гликопротеин 100), GPNMB (гликопротеин NMB), GPRC5D (рецептор 5D, сопряженный с G-белком), HER2, HER3, HER4, поверхностный антиген вируса гепатита B, HLA-A1 (человеческий лейкоцитарный антиген A1), HLA-A2 (человеческий лейкоцитарный антиген A2), HMW-MAA (человеческий высокомолекулярный меланома-ассоциированный антиген), IGF1R (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1), Ig каппа, Ig лямбда, IL-22Ra (рецептор IL-22 альфа), IL-13Ra2 (рецептор IL-13 альфа 2), KDR (рецептор домена вставки киназы), молекулу клеточной адгезии LI (LI-CAM), Liv-1, LRRRC8A (член 8, содержащий богатый лейцином повтор, семейства A), антиген Льюиса Y, меланома-ассоциированный антиген (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1 (мелан А), мышинный цитомегаловирус (MCMV), MCSP (меланома-ассоциированный хондроитин сульфат протеогликан), мезотелин, муцин 1 (MUC1), MUC16, комплексы МНС/пептид (например, HLA-A, входящий в комплекс с пептидами, происходящими из AFP, KRAS, NY-ESO, MAGE-A и WT1), NCAM (молекула адгезии нервных клеток), нектин-4, лиганды NKG2D (член D группы 2 естественных киллеров), NY-ESO, онкофетальный антиген, PD-1, PD-L1, PRAME (предпочтительно экспрессируемый антиген меланомы), прогестероновый рецептор, PSA (простатспецифический антиген), PSCA (антиген стволовых клеток предстательной железы), PSMA (простатспецифический мембранный антиген), ROR1, ROR2, SIRP α (сигнальный регуляторный белок альфа), SLIT, SLITRK6 (NTRK-подобный белок 6), STEAP1 (шестой трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы 1), сурвивин, TAG72 (опухоль-ассоциированный гликопротеин 72), TPBG (трофобластический гликопротеин), Троп-2, VEGFR1 (рецептор 1 фактора роста эндотелия сосудов), VEGFR2 и антигены ВИЧ, HBV, HCV, HPV, и других патогенов.

В некоторых вариантах осуществления антигенный рецептор может быть биспецифическим и нацеленным на два разных антигена, таких как два антигена, приведенных выше. Например, антигенный рецептор, такой как CAR, нацелен на CD19 и CD20 или CD19 и CD22.

Дополнительный полипептид может представлять собой, например, цитокин (например, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-23 и их сконструированные варианты), рецептор цитокинов (например, IL-12R, IL-7R и их сконструированные варианты), хемокин, фактор транскрипции (например, c-Jun или c-fos; см., например, WO 2019/118902), их функциональные аналоги, другие сконструированные рецепторы (например, TGF β R) и другие искусственные эффекторы (например, секреторный вторичный эффектор; см., например, WO 2018/200585). Под "функциональным аналогом" понимается молекула, которая имеет такую же или подобную представляющую интерес биологическую активность, что и родственный полипептид или пептид, даже несмотря на различия в последовательности между ним и родственной молекулой.

Кодирующие последовательности этих дополнительных полипептидов могут находиться под контролем различных промоторов из кодирующей последовательности полипептида, полученного из EGFR.

Альтернативно, они могут находиться под контролем того же промотора, что и кодирующая последовательность, полученная из EGFR, но отделены друг от друга посредством IRES или кодирующей последовательности в рамке считывания для пептида 2A, так что кодирующие последовательности могут коэкспрессироваться под контролем одного промотора.

Экспрессионные конструкции по настоящему изобретению могут быть доставлены в клетки-мишени *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo* с помощью подходящих методов, таких как электропорация, сонопорация, вирусная трансдукция, липофекция, микроинъекция, биолистические средства, вирусомы, липосомы, иммунолипосомы и наночастицы (например, полимерные или липидные наночастицы). В некоторых вариантах осуществления экспрессионные конструкции могут представлять собой вирусные векторы и доставляться в клетки-мишени посредством рекомбинантных вирусов, содержащих конструкции. Вирусные векторы содержат экспрессионную кассету полипептида, происходящего из EGFR, и минимальные вирусные последовательности, необходимые для упаковки и последующей интеграции в хозяина (если применимо). Отсутствующие вирусные функции поставляются *in trans* упаковочной клеточной линией, используемой для упаковки рекомбинантного вируса. Вирусный вектор может представлять собой, например, вектор на основе вируса оспавакцины, аденовирусный вектор, лентивирусный вектор, поксивирусный вектор, вектор на основе вируса простого герпеса, вектор на основе аденоассоциированного вируса, ретровирусный вектор и гибридный вирусный вектор. Частично в зависимости от типа вируса экспрессионная кассета полипептида, происходящего из EGFR, может стабильно интегрироваться в геном клеток-мишеней или оставаться в клетках эпизомально. Интеграция в геном хозяина возможна с использованием ретровируса и лентивируса.

III. Фармацевтическое применение клеток, экспрессирующих белки, полученные из EGFR.

Экспрессионные конструкции по настоящему изобретению могут быть введены в клетки, используемые в клеточной терапии. Данные клетки представляют собой, например, мультипотентные клетки, такие как гемопоэтические стволовые клетки, различные клетки-предшественники или клетки-предшественники гемопоэтических линий и различные иммунные клетки (например, человеческие аутологичные или аллогенные Т-клетки, естественные клетки-киллеры (NK), дендритные или В-клетки). Эти клетки также могут представлять собой плюрипотентные стволовые клетки (PSC), такие как эмбриональные стволовые клетки человека и индуцированные PSC, которые можно использовать для генерации популяций терапевтических клеток. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные и мультипотентные клетки дифференцируют в желаемый тип клеток *in vitro* перед имплантацией пациенту.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к сконструированным Т-лимфоцитам, которые экспрессируют белок, полученный из EGFR, из той же конструкции или из отдельной конструкции, и один или более дополнительных полипептидов. Один или более дополнительных полипептидов могут представлять собой антигенный рецептор, такой как антитело, сконструированное антитело, такое как scFv, CAR, сконструированный TCR, миметик TCR (например, abTCR или saTCR) или CSR, как описано выше. Антигенный рецептор может быть нацелен, например, на антигены, описанные выше. Дополнительный полипептид также может представлять собой, например, цитокин, цитокиновый рецептор, хемокин, фактор транскрипции, функциональный аналог вышеперечисленного, другой сконструированный рецептор или сконструированный эффектор, как описано выше. Кодирующие последовательности этих дополнительных полипептидов могут находиться под контролем различных промоторов из кодирующей последовательности полипептида, происходящего из EGFR. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к сконструированным аутологичным или аллогенным NK-клеткам, экспрессирующим сконструированные рецепторы, и сконструированным В-лимфоцитам, экспрессирующим антитело, сконструированному антителу или сконструированной тканеспецифической клетке, экспрессирующей терапевтический белок.

Сконструированные клетки, описанные в настоящем документе, могут быть представлены в виде фармацевтической композиции, содержащей клетки и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой среду для культивирования клеток, которая необязательно не содержит каких-либо компонентов животного происхождения. Для хранения и транспортировки клетки могут быть криоконсервированы. Перед использованием клетки можно разморозить и развести в стерильной клеточной среде. Клетки можно вводить пациенту системно (например, путем внутривенной инъекции или инфузии) или местно (например, путем прямой инъекции в локальную ткань, например, в место нахождения солидной опухоли).

Пациенту вводят терапевтически эффективное количество сконструированных клеток. В рамках настоящего изобретения, термин "терапевтически эффективное" относится к числу клеток или количеству фармацевтической композиции, которое является достаточным при введении субъекту-человеку, страдающему или предрасположенному к развитию заболевания, расстройства и/или патологического состояния, для лечения, профилактики и/или замедления начала или прогрессирования симптома(ов) заболевания, расстройства и/или патологического состояния. Например, терапевтически эффективное количество сконструированных CAR-Т-клеток представляет собой количество, достаточное для купирования роста опухоли, регрессии опухоли, предотвращения метастазирования опухоли или предотвращения рецидива опухоли.

Когда сконструированные клетки больше не требуются в организме пациента, например, когда клетки не функционируют должным образом или когда цель терапии уже достигнута, то пациенту можно ввести анти-EGFR антитело в достаточном количестве, чтобы вызвать опосредованный антителами киллинг клеток. Например, цетуксимаб (например, Эрбитукс®) можно вводить посредством инфузии в одной или более дозах, определяемых в зависимости от количества сконструированных клеток, оставшихся у пациента.

Если в настоящем документе не определено иное, то все научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области. Приведенные в качестве примера способы и материалы описаны ниже, хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, также можно использовать на практике или при тестировании настоящего изобретения. В случае конфликта настоящее изобретение, включая определения, будет иметь преимущественную силу. В общем, номенклатура, используемая по отношению к методам культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетике, аналитической химии, синтетической органической химии, медицинской и фармацевтической химии, а также химии белков и нуклеиновых кислот и гибридизации, описанным здесь, то они хорошо известны и широко используются в данной области техники. Ферментативные реакции и методы очистки осуществляются в соответствии со спецификациями производителя, как это обычно делается в данной области или как описано в настоящем документе. Кроме того, если по контексту не требуется иное, то термины в единственном числе должны включать множественное число, а термины во множественном числе должны включать единственное число. По тексту описания и вариантах осуществления слова "иметь" и "содержать" или их варианты, такие как "имеет", "имеющий", "содержит" или "содержащий", должны пониматься как подразумевающие включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел. Все публикации и другие ссылки, упомянутые здесь, в полном объеме включены посредством ссылки. Несмотря на то, что здесь цитируется ряд документов, это цитирование не является признанием того, что какой-либо из этих документов составляет часть общеизвестных сведений в данной области техники.

Примеры

Для того чтобы лучше понять настоящее изобретение, приведены следующие примеры. Эти примеры приведены только для иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом объем настоящего изобретения.

Пример 1: поверхностная экспрессия полипептидов, полученных из EGFR.

В данном примере описаны исследования, анализирующие эффекты различных околочелюстных доменов на уровне экспрессии на клеточной поверхности полипептидов, полученных из EGFR.

Методы.

Экспрессионные конструкции.

Лентивирусные конструкции получали с бистронными или тристронными экспрессионными кассетами. В конструкциях с бистронными экспрессионными кассетами кодирующие последовательности для (i) ROR1-специфического R12 CAR, (ii) саморасщепляющегося пептида P2A и (iii) EGFRt (усеченный EGFR, имеющий только домены III и IV и трансмембранный домен; SEQ ID NO: 26) или варианта, имеющего дополнительно внутриклеточный околочелюстный домен, соединяли в рамке считывания и помещали под контроль MND-промотора. В конструкциях с тристронными экспрессионными кассетами последовательности, кодирующие (i) c-Jun, (ii) пептид P2A, (iii) ROR1-специфический R12 CAR, (iv) пептид P2A; и (v) EGFRt или его вариант, имеющий дополнительно внутриклеточный околочелюстный домен, соединяли в рамке считывания и помещали под контроль MND-промотора. R12 CAR получали из анти-ROR1 антитела R12 (Yang et al., PLoS One (2011) 6:e21018), и он содержал происходящий из CD28 трансмембранный домен, костимуляторный домен 4-1BB и сигнальный домен CD3-дзета.

Культивирование клеток и лентивирусная трансдукция.

Клетки Jurkat получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC; Manassas VA). Для лентивирусной трансдукции клетки подпитывали свежей средой за 4-16 ч до трансдукции с последующей инкубацией с лентивирусом в полной среде+LentiBOOST™ в рекомендованной производителем концентрации (Sirion Biotech). Через 18 ч после трансдукции лентивирус и LentiBOOST™ разбавляли добавлением 1 объема свежей среды.

Предварительно селектированные, криоконсервированные первичные CD4+ и CD8+ Т-клетки человека от нормальных доноров получали из Bloodworks (Seattle, Вашингтон). Т-клетки человека культивировали в среде OpTmizer (Thermo Fisher) с добавлением Immune Cell Serum Replacement (Thermo Fisher), 2 mM L-глутамин (Gibco), 2 mM глутамат (Gibco), 200 МЕ/мл IL-2 (R&D systems), 120 МЕ/мл IL-7 (R&D systems) и 20 МЕ/мл IL-15 (R&D systems). Для лентивирусной трансдукции Т-клетки стимулировали разведенным 1:100 реагентом Т-cell TransAct (Miltényi) в течение 30 ч. Затем к Т-клеткам добавляли вирус на 18-24 ч. Затем стимуляцию и инфицирование вирусом останавливали добавлением 7 объемов свежей среды без реагента TransAct, и клетки культивировали еще в течение 3-7 суток перед проведением анализа.

Проточная цитометрия.

Проточную цитометрию проводили на цитометре Ze5 (Bio-Rad Laboratories). Для определения экспрессии маркеров клеточной поверхности примерно от 1×10^5 до 2×10^5 клеток переносили в 96-луночный культуральный планшет с V-образным дном (Corning). Клетки дважды промывали буфером для окрашивания для проточной цитометрии (eBioscience), и затем окрашивали соответствующими реагентами в общем объеме 50 мкл буфера для окрашивания в проточной цитометрии в течение 30 мин на льду. После окрашивания клетки дважды промывали буфером для окрашивания для проточной цитометрии, фиксировали в буфере FluoroFix Buffer (BioLegend) и хранили при 4°C в темноте до анализа. Данные проточной цитометрии анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo 10 (Tree Star).

В анализе проточной цитометрией, использовали антитело AY13, меченное флуорохромом BV421 (BioLegend), для детектирования вариантов EGFR. Очищенный рекомбинантный ROR1, слитый с Fc Ig человека, получали в лаборатории и конъюгировали с красителем Alexa 647 для детектирования R12 CAR. Краситель для определения жизнеспособности клеток eFluor 780 Fixable Viability (eBioscience) был включен во время окрашивания первичным антителом в разведении 1:8000.

Результаты.

Для модуляции экспрессии EGFRt на клеточной поверхности, его сливали на C-конце трансмембранного домена с синтетической последовательностью из 43 аминокислот (DEARKAIARVKRE-SKRIVEDAERLIREAAAASEKISREAERLI; SEQ ID NO: 41), которая содержит два кислотных остатка (аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту) проксимальнее к мембране. Было установлено, что детектирование EGFRt на клеточной поверхности резко снижается по сравнению с EGFRt без C-концевого слияния в трансдуцированных первичных Т-клетках (фиг. 1А и 1В). Напротив, когда EGFRt сливали на C-конце трансмембранного домена с $(G_4S)_2$ (SEQ ID NO: 42, где $n=2$), то слитый белок детектировали на заметно повышенных (в пять раз) уровнях на клеточной поверхности по сравнению с EGFRt без слияния ((клетки Jurkat; данные не показаны). Полученные данные позволяют предположить, что включение соответствующего околосмембранного внутриклеточного сегмента может модулировать поверхностную экспрессию вариантов EGFRt.

Было высказано предположение, что определенные аминокислотные композиции в околосмембранной внутриклеточной области могут повышать поверхностную экспрессию маркера EGFRt за счет увеличения инсерции в мембрану во время синтеза белка и/или повышения стабильности трансмембранного белка. Для проверки этой гипотезы, получали модули EGFRt, содержащие домены III-IV EGFR, трансмембранный домен EGFR и короткие внутриклеточные домены, полученные из нативной последовательности EGFR, или синтетические последовательности. Поскольку T678 человеческого EGFR может быть сайтом регуляторного фосфорилирования, то для тестирования выбрали белки, содержащие аминокислоты 669-671 (RRR) или 669-677 (RRRHIVRKR; SEQ ID NO: 16) (фиг. 2А и 2В). Поскольку глицин может нарушать α -спиральную структуру и подвергаться обогащению в околосмембранной области других рецепторных тирозинкиназных белков, то также тестировали внутриклеточные домены, содержащие неструктурированные линкеры, богатые глицином/серином (SGGGSGGGGS; SEQ ID NO: 13), или короткий участок нативного околосмембранного домена, за которым следует богатый глицином/серином линкер (RRRSGGGSGGGGS; SEQ ID NO: 12). Для этого исследования первичные Т-клетки трансдуцировали лентивирусом, экспрессирующим ROR1-специфический R12 CAR, связанный последовательностью пропуска P2A с вариантами EGFRt (фиг. 3А). Экспрессию R12 CAR и коэкспрессированных полипептидов, происходящих из EGFR, измеряли с использованием проточной цитометрии.

Данные показывают, что, за исключением околосмембранной последовательности, включающей проксимальные к мембране кислотные остатки (фиг. 1А и 1В), варианты EGFRt, содержащие околосмембранную последовательность, стабильно демонстрировали более высокую среднюю интенсивность флуоресценции по сравнению с полипептидом EGFRt без околосмембранной последовательности (фиг. 3В). Примечательно, что поверхностная экспрессия трансляционно связанного CAR R12 была стабильной для всех конструкций (фиг. 3В), что указывает на прямое влияние околосмембранной последовательности на стабильность EGFRt, а не на влияние на модуляцию стабильности мРНК или эффективности трансляции, что могло бы также повлиять как на экспрессию CAR и EGFRt.

Для подтверждения того, что связывание моноклонального антитела AY13, специфичного к домену III EGFR, точно отражает связывание с цетуксимабом, сравнили уровни экспрессии EGFRt (значения gMFI), определенные с использованием AY13, по сравнению с биоаналогом цетуксимаба. Данные показали линейную зависимость между значениями gMFI для двух антител и четкое увеличение связывания биоаналога цетуксимаба с вариантами EGFRt, имеющими околосмембранную последовательность (фиг. 4А и 4В). Для исследования роли числа копий вируса в экспрессии EGFRt, первичные Т-клетки трансдуцировали в диапазоне титров лентивируса. Аналогично результатам предыдущих исследований, значение gMFI для поверхностного R12 CAR было одинаковым для всех конструкций при соответствующей частоте трансдукции. Напротив, поверхностное значение gMFI для всех вариантов EGFRt, содержащих внутриклеточную последовательность, было примерно в три-пять раз выше, чем для маркера EGFRt, не содержащего эту последовательность (фиг. 5А и 5В). Полученные данные указывают на то, что присутствие соответствующего внутриклеточного домена повышает экспонирование белка EGFRt на клеточной

поверхности, несмотря на сравнимую эффективность трансляции, измеренную по уровню экспрессии коэкспрессированного R12 CAR. Полученные результаты показывают, что усиленная инсерция в мембрану во время синтеза белка или повышенная стабильность мембранного белка играют роль в повышении поверхностной экспрессии белков, происходящих из EGFR.

По мере увеличения числа цистронных элементов в экспрессионной кассете, содержащей 2A, наблюдается общая тенденция к снижению экспрессии этих элементов от 5' к 3', частично обусловленная пропуском рибосомы и неэффективным расщеплением элементов 2A. По этой причине максимизация эффективной поверхностной экспрессии вариантов EGFRt особенно важна для трицистронных векторов и векторов более высокого порядка. Для исследования влияния околосмембранных последовательностей на экспрессию EGFRt в трицистронной экспрессионной кассете, генерировали лентивирусные векторы, содержащие фактор транскрипции c-Jun, R12 CAR и модуль EGFRt, связанные последовательностями пропуска P2A (фиг. 6A). Модули EGFRt либо не содержали внутриклеточного домена, либо содержали внутриклеточный домен, содержащий аминокислоты 669-671 или 669-677 из последовательности человеческого EGFR. Как и в случае бицистронного вектора, экспрессия CAR R12 была одинаковой для всех конструкций. Напротив, поверхностная экспрессия EGFRt увеличилась примерно в четыре раза при добавлении околосмембранной последовательности (фиг. 6B и 6C).

Пример 2: опосредованная цетуксимабом ADCC CAR-T-клеток, экспрессирующих варианты EGFRt.

В данном примере описаны исследования, анализирующие эффективность белков, происходящих из EGFR, описанных здесь, в качестве переключателя безопасности в клеточной терапии. Измененная поверхностная экспрессия EGFRt может повлиять на применимость данного маркера в качестве маркера селекции и переключателя безопасности *in vivo*. Цетуксимаб индуцирует ADCC опухолевых клеток EGFR-зависимым образом (Kimura et al., *Cancer Sci.* (2007) 98(8): 1275-80). Поскольку все четыре испытанные околосмембранные последовательности индуцировали сходное увеличение поверхностной экспрессии EGFRt, то выбрали конструкции EGFRt, не содержащие околосмембранную последовательность или содержащие последовательности RRR и RRRHIVRKR, полученные из человеческого EGFR (SEQ ID NO: 16), для анализа ADCC.

Методы.

Первичные естественные клетки-киллеры человека (NK) использовали в качестве эффекторных клеток в анализах ADCC. Естественные клетки-киллеры выделяли из криоконсервированных, обедненных T-клетками (CD4-/CD8-) PBMC (AllCells) путем негативной селекции с использованием набора EasySep Human NK Cell (StemCell) в соответствии с протоколом производителя. Для активации их цитолитической функции выделенные NK-клетки культивировали в среде RPMI-10 с добавлением 10 нг/мл человеческого IL-15 в течение ночи перед использованием (Wagner et al., *J. Clin. Invest.* (2017) 127(11):4042-58; Derer 2012, *J. Immunol.* (2012) 189(11):5230-9).

Криоконсервированные трансдуцированные первичные T-клетки оттаивали и прекультивировали в течение ночи в среде OpTmizer плюс цитокины, как описано выше. Затем клетки подсчитывали, ресуспендировали в RPMI-10 и добавляли в 96-луночный планшет с V-образным дном в объеме 100 мкл и инкубировали с (i) биоаналогом цетуксимаба в указанной конечной концентрации, (ii) без антитела (0), или (iii) 2000 нг/мл биоаналога ритуксимаба (R&D Systems) в течение 15 мин при 37°C. Затем добавляли NK-клетки, праймированные IL-15, в соотношении 10:1 NK:CAR-T-клетки, и планшет с V-образным дном осторожно центрифугировали (100×g, 30 с), для объединения эффекторных клеток и клеток-мишеней. Через 4 ч сокультивирования оставшиеся CAR+ T-клетки идентифицировали с помощью FACS. Образцы окрашивали анти-CD3, анти-CD56, ROR1-Fc и FVD780, фиксировали и проводили анализ на цитометре Ze5 в режиме волнометрического подсчета. Антителоспецифическую ADCC T-клеток оценивали сравнением всех живых популяций CD56-CD3+ROR1-Fc+, обработанных или не обработанных антителом.

Таблица 5

Мишень	Флуорохром	Антитело	Поставщик
EGFR	Alexa 488	Hu1 (биоаналог цетуксимаба)	R&D systems
EGFR	BV421	AY13	BioLegend
CD3	BUV805	SK7	Thermo Fisher
CD56	PE	HCD56	BioLegend

Результаты.

Данные показывают, что в бицистронных конструкциях (фиг. 3A) EGFRt без околосмембранной последовательности проявил низкую ADCC в присутствии NK-клеток и цетуксимаба, тогда как EGFRt с околосмембранной последовательностью RRR из 3 аминокислот эффективно подвергался киллингу в присутствии NK-клеток даже при таких низких дозах цетуксимаба, как 5 нг/мл (фиг. 7).

Для трицистронных конструкций с последовательностью EGFRt в 3'-положении (фиг. 6A) минимальную ADCC наблюдали для EGFRt без околосмембранной последовательности после 4 ч обработки.

Напротив, EGFRt с околосмембранными доменами RRR или RRRHIVRKR (SEQ ID NO: 16) демонстрировал значительную ADCC, опосредованную цетуксимабом в зависимости от дозы после 4 ч обработки (фиг. 8). После 24 ч обработки цетуксимабом EGFRt без околосмембранной последовательности демонстрировал частичное удаление цетуксимаб- и NK-зависимым образом, тогда как EGFRt с околосмембранными последовательностями RRR или RRRHIVRKR (SEQ ID NO: 16) показал почти полное удаление цетуксимаб- и NK-зависимым образом (фиг. 9).

Пример 3: поверхностная экспрессия дополнительных полипептидов, полученных из EGFR.

В данном примере описаны исследования, анализирующие эффекты различных коротких околосмембранных последовательностей и последовательностей с переставленными остатками на уровне экспрессии на клеточной поверхности полипептидов, происходящих из EGFR.

Для тестирования требований к минимальной последовательности для максимальной экспрессии на клеточной поверхности полипептидов, происходящих из EGFR, трицистронные конструкции, содержащие кодирующие последовательности для (i) c-Jun, (ii) ROR1-специфического CAR и (iii) EGFR-полученного полипептида, конструировали, как описано в примере 1. Эти трицистронные конструкции, кодируемые EGFRt или его вариантами, имели дополнительные короткие околосмембранные последовательности: (i) один остаток аргинина (R), (ii) два остатка аргинина (RR), (iii) три остатка аргинина (RRR) или (iv) один остаток аргинина, переставленный с лизином (RKR).

Первичные Т-клетки от двух разных доноров-людей трансдуцировали указанными трицистронными конструкциями или оставляли нетрансдуцированными. Через 6 суток после трансдукции клетки окрашивали на связывание антигена ROR1-Fc, экспрессию EGFR, и фиксируемым красителем на жизнеспособность.

На фиг. 10 приведены значения gMFI для связывания анти-EGFR антитела в клетках, трансдуцированных ROR1 CAR+, или в живых клетках в целом без трансдукции. Как показано на фигуре, полипептид, полученный из EGFR, содержащий околосмембранную последовательность RKR, сохранял высокую экспрессию на клеточной поверхности. Сравнение уровней экспрессии на клеточной поверхности полипептидов, происходящих из EGFR, содержащих околосмембранные последовательности с одним, двумя или тремя остатками аргинина (R, RR или RRR), показывает, что усечение внутриклеточного околосмембранного домена с RRR до RR снижало поверхностную экспрессию на 2,7%. Напротив, усечение внутриклеточного околосмембранного домена с RRR до R снижало поверхностную экспрессию на 22%.

Пример 4: функция "переключатель киллинга" полипептидов, полученных из EGFR, *in vivo*.

В данном примере описаны исследования, оценивающие влияние околосмембранного домена RRR на функцию "переключателя киллинга" *in vivo* усеченного EGFR после введения цетуксимаба.

Методы.

Экспрессионные конструкции.

Ретровирусный вектор MP71 использовали для генерации конструкций, использованных в настоящих исследованиях. Вектор модифицировали для включения кодирующих последовательностей человеческого EGFRt (MP71-EGFRt), варианта, содержащего околосмембранный домен RRR (MP71-EGFR-RRR), бицистронную экспрессионную кассету CAR, кодирующую mCD19scFv.28z CAR (также обозначенную m19.28z или mCD19.28z) и EGFRt или EGFR-RRR (MP71-mCD19scFv.28z.EGFRt/EGFR-RRR; также обозначенную здесь MP71_m19.28z.P2A.EGFRt/EGFR-RRR), или трицистронную экспрессионную кассету CAR, кодирующую c-Jun, mCD19scFv.28z и EGFRt или EGFR-RRR (MP71-cJun.mCD19scFv.28z.EGFRt/EGFR-RRR; также обозначенную здесь MP71_cJun.T2A.m19.28z.P2A.EGFRt/EGFR-RRR или cJun.m19.28z.EGFRt/EGFR-RRR).

Бицистронные конструкции CAR включали кодирующую последовательность для CAR (mCD19.28z CAR), которая включала мышинный сигнальный пептид CD8a (UniProt P01731, аминокислоты 1-27), мышинный CD19-специфический scFv, полученный из гибридомы ID3 (Davila et al., PLoS One (2013) 8(4):e61338), шарнирную и трансмембранную области мышинового CD8a (UniProt P01731, аминокислоты 151-219), внутриклеточную область мышинового CD28 (UniProt P31041, аминокислоты 177-218) и внутриклеточный домен мышинового CD3z (UniProt P24161, аминокислоты 52-164). Эту CAR-кодирующую последовательность связывали кодирующей последовательностью саморасщепляющегося пептида P2A с кодирующей последовательностью полипептида EGFR человека (UniProt P00533 аминокислоты 334-668 для человеческого EGFRt). Для трицистронной конструкции последовательность, кодирующую мышинный c-Jun (UniProt P05627, аминокислоты 1-334), клонировали апстрим последовательности, кодирующей mCD19.28z CAR, и связывали последовательностью, кодирующей пептид T2A.

Культивирование, трансдукция и адоптивный перенос клеток.

Для продукции ретровируса клетки Plat-E (Cell Biolabs) транзистентно трансфектировали с использованием фосфата кальция (Такага). Супернатанты собирали через 48 ч, фильтровали через фильтры 0,45 мкм и быстро замораживали на сухом льду перед хранением при -80°C. Мышей-доноров C57BL/6J и B6.SJL (CD45.1) получали из питомника Джексона.

Для трансдукции Т-клеток суспензии одиночных клеток получали из селезенки и периферических лимфатических узлов мышей-доноров CD45.1 в возрасте от 6 до 8 недель и фильтровали через фильтр 40 мкм. Мышине CD8+ Т-клетки обогащали с использованием негативной селекции (StemCell) и стимули-

рвали 1 мкг/мл анти-CD3 (145-2C11) и анти-CD28 (37,51), связанными с планшетом, в течение 20 ч при 37°C и 5% CO₂ в течение 20 ч в полной среде RPMI (RPMI 1640, 10% инактивированной нагреванием FBS, 1 mM HEPES, 100 Е/мл пенициллина/стрептомицина, 1 mM пирувата натрия и 50 мкМ β-меркаптоэтанола) с добавлением 50 Е/мл мышинового IL-2 (PeproTech). Предварительно титрованный ретровирус вносили в планшеты, не предназначенные для культивирования тканей, предварительно покрытые 12,5 мкг/мл RetroNectin® (Takara), и захватывали центрифугированием в течение 2 ч при 2560 gcf при 32°C. Стимулированные CD8+ Т-клетки собирали и ресуспендировали с титром 1×10⁶ клеток/мл в полной RPMI с добавлением 50 Е/мл IL-2 и частиц Dynabeads с анти-CD3/28 мышинным Т-активатором (Thermo Fisher) в соотношении 1:1. Покрытые вирусом лунки аспирировали и промывали PBS с последующим добавлением Т-клеток, центрифугированием при 800 gcf в течение 30 мин при 32°C и инкубацией при 37°C в 5% CO₂.

Через 24 ч полную среду RPMI с добавлением IL-2 заменяли, и Т-клетки инкубировали в течение еще 24 ч. Т-клетки собирали, ресуспендировали с титром 1×10⁶ клеток/мл в полной RPMI с добавлением 50 Е/мл мышинового IL-15 (PeproTech) и инкубировали в течение дополнительных 48 ч. Затем магнитные частицы с активатором удаляли, и эффективность трансдукции Т-клеток (40-60% EGFR+) подтверждали с использованием проточной цитометрии. Затем трансдуцированные клетки готовили к адоптивному переносу ресуспендированием CD8+ Т-клеток в концентрации 3×10⁶ EGFR+/100 мкл в бессывороточной среде RPMI 1640 и хранили на льду до проведения адоптивного переноса.

Для адоптивного переноса CAR-Т-клеток мышей C57BL/6J в возрасте от 6 до 8 недель предварительно кондиционировали внутрибрюшинной инъекцией 200 мг/кг циклофосамида и внутривенно в ретробульбарное пространство вводили 3×10⁶ EGFR+ CAR-Т-клеток через 6 ч. Для анализа периферической крови 100 мкл образцов крови собирали отбором из ретроорбитального пространства в пробирки, покрытые ЭДТА, на указанные сутки после переноса CAR-Т-клеток, и образцы крови обрабатывали двумя раундами буфером для лизиса ACK перед поверхностным окрашиванием. Образцы окрашивали с использованием набора для окрашивания LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell (Invitrogen) при 4°C в течение 15 мин. Клетки также окрашивали в темноте при 4°C в течение 30 мин в буфере для проточной цитометрии (PBS, 1 mM ЭДТА и 2% FBS) анти-CD8a FITC (53-6,7, BioLegend, если не указано иное), анти-CD19 PerCP-Cy™ 5.5 (1D3), анти-CD4 PE-Cy™ 7 (RM4-5), анти-CD45.2 APC/Fire™ 750 (104), анти-CD45.1 Brilliant Violet 421™ (A20), hEGFR APC или PE (AY13), и проводили анализ на клеточном анализаторе BD FACSCelesta™.

Для истощения перенесенных EGFR+ CAR-Т-клеток, вводили цетуксимаб в дозе 1 мг или 0,1 мг на мышь на сутки 8. Экспансию и истощение CAR-Т-клеток определяли в образцах крови с помощью проточной цитометрии. Было показано, что у мышей проявляется В-клеточная аплазия, когда уровень CD19+ В-клеток поддерживается ниже 3% от общего числа циркулирующих эндогенных CD45.2+ клеток.

Результаты.

EGFR-RRR демонстрирует высокие уровни поверхностной экспрессии в продукте для инфузии.

Для оценки влияния околосмембранной модификации на поверхностную экспрессию усеченного EGFR *in vitro*, мышинные CD8+ Т-клетки трансдуцировали ретровирусной конструкцией, содержащей кодон-оптимизированную последовательность человеческого EGFRt с околосмембранным доменом RRR или без него, и анализировали с использованием проточной цитометрии, как описано выше. Когда CD8+ Т-клетки трансдуцировали на аналогичных уровнях (50-56%), то EGFR+ Т-клетки демонстрировали более чем 3-кратное увеличение поверхностной экспрессии EGFR-RRR по сравнению с EGFRt (фиг. 11A).

Для определения влияния околосмембранного домена в контексте мультицистронной конструкции, кодирующую последовательность полипептида EGFR связывали кодирующей последовательностью саморасщепляющегося пептида P2A с 3'-концом кодирующей последовательности для CAR, нацеленного на мышинный CD19. При аналогичной эффективности трансдукции CAR-Т-клетки, трансдуцированные конструкцией EGFR-RRR, демонстрировали более высокие уровни окрашивания на EGFR, чем CAR-Т-клетки, трансдуцированные конструкцией EGFRt (фиг. 11B). Таким образом, при измерении поверхностной экспрессии с помощью проточной цитометрии в образцах Т-клеток с аналогичными уровнями трансдукции EGFR-RRR проявлял повышенные уровни поверхностной экспрессии в CAR-Т-клеточном продукте для инфузии.

EGFR-RRR является стабильной мишенью для опосредованного антителами истощения *in vivo*.

Стабильно экспрессированный EGFRt может подвергаться нацеленному истощению с помощью антитела цетуксимаба, нацеленного на EGFR (Paszkiwicz et al., J. Clin. Invest. (2016) 126(11):4262-72). Для оценки того, насколько сохраняется поверхностная экспрессия EGFR-RRR и насколько она может быть нацелена на истощение *in vivo*, EGFRt или EGFR-RRR экспрессировали в бицистронной (ниже mCD19 CAR) или трицистронной конструкции (ниже cJun.mCD19 CAR) в конгенно меченных CD45.1+ донорских CD8+ Т-клетках. Полученные данные показали, что EGFR-RRR демонстрирует более высокие уровни поверхностной экспрессии в продукте для инфузии (фиг. 12A, внизу). Объемные инфузии Т-клеток, содержащие 3×10⁶ EGFR+ CAR-Т-клеток, адоптивно переносили лимфодефицитным мышам.

Уровни циркулирующих CAR-T-клеток определяли в крови, как указано (фиг. 12А, вверху). EGFR+ CAR-T-клетки имели пик экспансии через одну-две недели после инфузии, и затем их количество снижалось.

Для подтверждения того, что EGFR-RRR может эффективно подвергаться нацеленному истощению, на сутки 14 половине мышей в каждой группе вводили 1 мг цетуксимаба или 1 мг ритуксимаба (контроль). После инъекции цетуксимаба приводил к истощению большей части EGFRt и EGFR-RRR CAR-T-клеток, в то время как CAR-T-клетки сохранялись на более высоких уровнях в группах с введением ритуксимаба в течение периода наблюдения (фиг. 12В). Аналогичные результаты по истощению были получены, когда Т-клетки экспрессировали EGFRt или EGFR-RRR без CAR (фиг. 12С). Полученные данные демонстрируют, что уровни поверхностной экспрессии EGFR-RRR сохранялись *in vivo* и могут эффективно подвергаться нацеленному истощению с помощью цетуксимаба.

EGFR-RRR опосредует более быстрое восстановление В-клеток после истощения Т-клеток цетуксимабом.

Поскольку добавление околочелюстного домена повышало поверхностные уровни EGFR, затем определяли, насколько EGFR-RRR проявляет дифференциальную кинетику истощения CAR-T-клеток и функциональные исходы *in vivo*. С этой целью конгенно меченные mCD19.28z CAR-T-клетки, экспрессирующие EGFRt или EGFR-RRR, адоптивно переносили лимфодефицитным мышам. Приживление Т-клеток и аплазию В-клеток определяли в крови во временной динамике (фиг. 13А). Для выяснения различий в кинетике истощения между EGFRt и EGFR-RRR mCD19.28z CAR-T-клетками проводили титрование дозы цетуксимаба. Нацеливание на истощение EGFR с использованием однократной дозы 0,1 мг цетуксимаба было достаточным для истощения циркулирующих клеток EGFRt и EGFR-RRR CAR-T через 3 суток после инъекции антитела. Ранее было показано, что уровни экспрессии поверхностного EGFR определяют кинетику истощения mCD19.28z CAR-T-клеток *in vivo* (Paszkiwicz et al., 2016). Для определения того, может ли EGFR-RRR опосредовать более быструю кинетику восстановления В-клеток после введения цетуксимаба, циркулирующие В-клетки анализировали у мышей, которым вводили mCD19.28z CAR-T-клетки с последующим истощением или без него. В то время как у мышей, получавших mCD19.28z CAR-T-клетки, наблюдали стойкую В-клеточную аплазию, В-клетки у мышей, получавших цетуксимаб, восстанавливались в течение 3 недель после введения антитела. Введение цетуксимаба мышам, которым ранее вводили EGFR-RRR CAR-T-клетки, приводило к более быстрому восстановлению В-клеток, в том числе при более низкой введенной дозе (фиг. 13В), и более быстрому разрешению В-клеточной аплазии (фиг. 13С). Следовательно, EGFR-RRR опосредует более эффективное истощение CAR-T-клеток, что приводит к более быстрой кинетике "выключения" CAR-T-клеточного ответа после введения цетуксимаба.

Таким образом, mCD19.28z.EGFR-RRR CAR-T-клетки демонстрируют более высокие уровни экспрессии EGFR. Эта экспрессия поддерживалась *in vivo* и эффективно подвергалась нацеленному истощению цетуксимабом. В отличие от EGFRt, нацеливание цетуксимаба на EGFR-RRR приводило к полному истощению mCD19.28z.CAR-T-клеток и более быстрому восстановлению В-клеток *in vivo*.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный полипептид, содержащий внеклеточную область, трансмембранную область и внутриклеточную область, где:

внеклеточная область содержит последовательность домена III рецептора эпидермального фактора роста человека (EGFR),

трансмембранная область содержит гидрофобную последовательность, и

внутриклеточная область (i) содержит околочелюстной домен, содержащий K, KR, RR, KRK, RKR, RRR, KSR, SKR, KRSD (SEQ ID NO: 7), RRRH (SEQ ID NO: 21), KRSDK (SEQ ID NO: 8), SGGGG (SEQ ID NO: 9), SGAGG (SEQ ID NO: 10), KRADK (SEQ ID NO: 11), RRRHI (SEQ ID NO: 20), KSGSGS (SEQ ID NO: 6), RRRHIV (SEQ ID NO: 19), RRRHIVR (SEQ ID NO: 18), RRRHIVRK (SEQ ID NO: 17), RRRHIVRKR (SEQ ID NO: 16), SGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13), RRRSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 12) или (GGGGS)_n, n>1 (SEQ ID NO: 14), (ii) но не содержит активного тирозинкиназного домена EGFR, где указанный рекомбинантный полипептид представляет собой маркер клеточной поверхности.

2. Рекомбинантный полипептид по п.1, где околочелюстной домен содержит RRRHIVRKR (SEQ ID NO: 16), RRRHIVRK (SEQ ID NO: 17), RRRHIVR (SEQ ID NO: 18), RRRHIV (SEQ ID NO: 19), RRRHI (SEQ ID NO: 20), RRRH (SEQ ID NO: 21), RRR, RKR или RR.

3. Рекомбинантный полипептид по п.2, где внутриклеточная область не содержит какого-либо остатка, который является фосфорилированным.

4. Рекомбинантный полипептид по любому из предшествующих пунктов, где последовательность домена III содержит SEQ ID NO: 2.

5. Рекомбинантный полипептид по любому из предшествующих пунктов, где внеклеточная область дополнительно содержит на С-конце относительно последовательности домена III, (i) последовательность, полученную из домена IV EGFR, (ii) искусственную последовательность или (iii) как последова-

тельность (i), так и последовательность (ii).

6. Рекомбинантный полипептид по п.5, где внеклеточная область содержит аминокислоты 334-504, 334-525 или 334-645 из SEQ ID NO: 1.

7. Рекомбинантный полипептид по любому из предшествующих пунктов, где трансмембранная область получена из трансмембранного домена человеческого EGFR, необязательно содержащая SEQ ID NO: 5.

8. Рекомбинантный полипептид по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащий сигнальный пептид, полученный из человеческого EGFR, человеческого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), каппа-цепи человеческого Ig, каппа-цепи мышинного Ig или CD33 человека.

9. Рекомбинантный полипептид по п.1, содержащий SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40; или аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичную ей.

10. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая кодирующую последовательность рекомбинантного полипептида по любому из предшествующих пунктов.

11. Молекула нуклеиновой кислоты по п.10, дополнительно содержащая кодирующую последовательность химерного антигенного рецептора (CAR).

12. Молекула нуклеиновой кислоты по п.10 или 11, где: кодирующие последовательности рекомбинантного полипептида и CAR операбельно связаны с одним и тем же промотором, так что две кодирующие последовательности котранскрибируются вместе, и необязательно две кодирующие последовательности разделены (i) внутренним сайтом посадки рибосомы (IRES) или (ii) кодирующей последовательностью саморасщепляющегося пептида, где кодирующие последовательности для рекомбинантного полипептида, CAR и саморасщепляющегося пептида находятся в рамке считывания друг с другом.

13. Молекула нуклеиновой кислоты по п.10, дополнительно содержащая кодирующую последовательность для третьего полипептида, где необязательно третий полипептид представляет собой с-Jun человека или его функциональный аналог.

14. Молекула нуклеиновой кислоты по п.13, где: кодирующие последовательности рекомбинантного полипептида, CAR и с-Jun человека операбельно связаны с одним и тем же промотором, так что три кодирующие последовательности котранскрибируются вместе, и

необязательно три кодирующие последовательности разделены (i) внутренним сайтом посадки рибосомы (IRES) или (ii) кодирующей последовательностью саморасщепляющегося пептида, где кодирующие последовательности для рекомбинантного полипептида, CAR, человеческого с-Jun и саморасщепляющегося(ихся) пептида(ов) находятся в рамке считывания друг с другом.

15. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.10-14, где: промотор представляет собой конститутивный или индуцибельный промотор, где необязательно промотор представляет собой MND-промотор, саморасщепляющийся пептид представляет собой пептид 2A, и/или CAR является специфичным для опухолевого антигена, необязательно выбранного из AFP, BCMA, CD19, CD20, CD22, CD123, EpCAM, GPC2, GPC3, HER2, MUC16, ROR1 и ROR2.

16. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп.10-15, где молекула нуклеиновой кислоты содержится в вирусном векторе, необязательно лентивирусном или ретровирусном векторе.

17. Клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.10-16.

18. Клетка по п.17, где клетка представляет собой Т-клетку человека.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по п.18, молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.10-16 или рекомбинантный вирион, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.16; и фармацевтически приемлемый носитель.

20. Способ лечения пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту клетки по п.17 или 18.

21. Способ по п.20, где клетка получена от пациента.

22. Способ по пп.20 и 21, включающий введение пациенту Т-клетки по п.18, где у пациента имеется злокачественная опухоль, и Т-клетка экспрессирует CAR, Т-клеточный рецептор (TCR), сконструированный TCR или миметик TCR, который является специфичным для опухолевого антигена, присутствующего в указанной злокачественной опухоли.

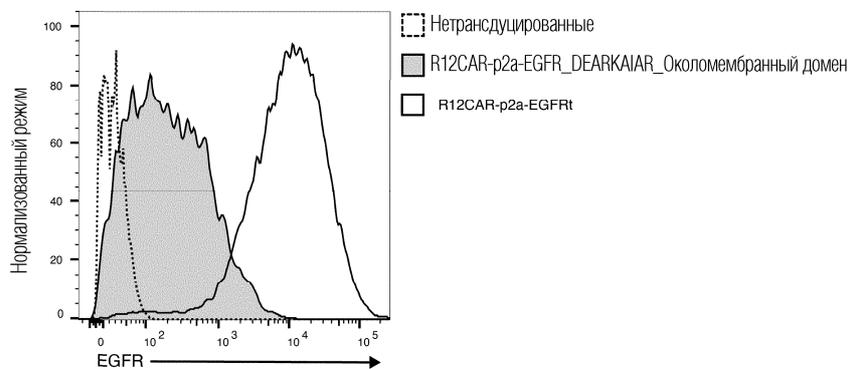
23. Способ по любому из пп.20-22, дополнительно включающий введение пациенту эффективного количества антитела, специфичного к EGFR человека, после того, как пациент прошел лечение, где антитело индуцирует цитотоксичность в отношении клеток, экспрессирующих рекомбинантный полипептид, и, необязательно, антитело представляет собой IgG1 или IgG2, где необязательно антитело представляет собой цетуксимаб.

24. Применение клетки по п.17 или 18 или фармацевтической композиции по п.19 в способе по любому из пп.20-23.

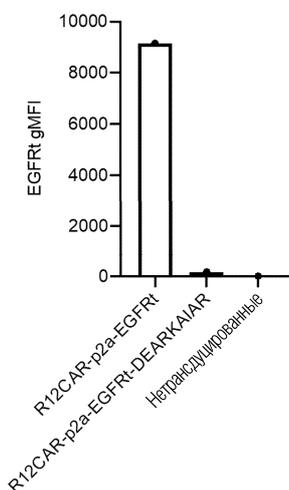
25. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.10-16 или клетки по п.17 или 18 для производства лекарственного средства для лечения пациента, нуждающегося в этом, в способе по любому из пп.20-23.

26. Способ получения сконструированной клетки человека, включающий получение выделенной клетки человека и введение молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.10-16 в клетку человека.

27. Способ по п.26, где клетка человека представляет собой Т-клетку человека.



Фиг. 1А



Фиг. 1В

Нативный EGFR с последовательностями трансмембранного и околомембранного доменов



Фиг. 2А

Усеченные испытуемые конструкции EGFR с околомембранными доменами

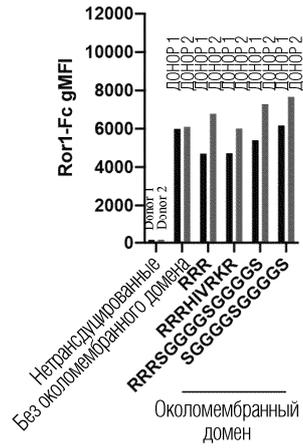
[S.пептид]	[внеклеточный]	[трансмембранный]	[околомембранный]
GMCSF	ДОМЕН III-IV	IATGMVGA	LLLLLVVALGIGLFM *
GMCSF	ДОМЕН III-IV	IATGMVGA	LLLLLVVALGIGLFM RRR*
GMCSF	ДОМЕН III-IV	IATGMVGA	LLLLLVVALGIGLFM RRRHIVRKR*
GMCSF	ДОМЕН III-IV	IATGMVGA	LLLLLVVALGIGLFM RRRSGGGGSGGGGS*
GMCSF	ДОМЕН III-IV	IATGMVGA	LLLLLVVALGIGLFM SGGGGSGGGGS*

Фиг. 2В

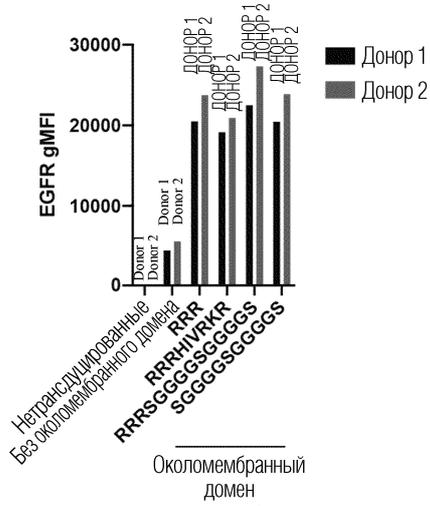


Фиг. 3А

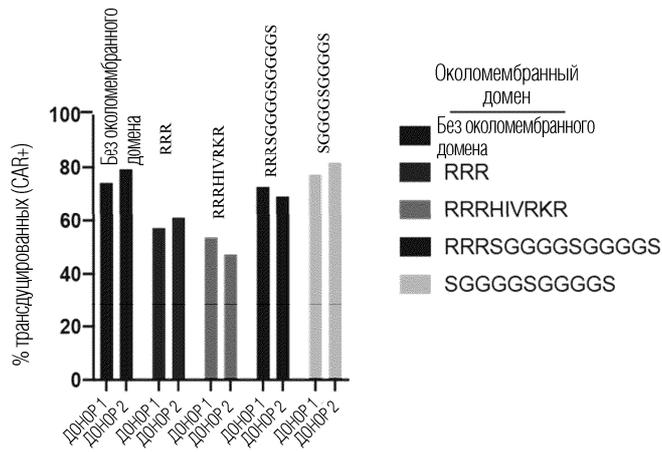
048058



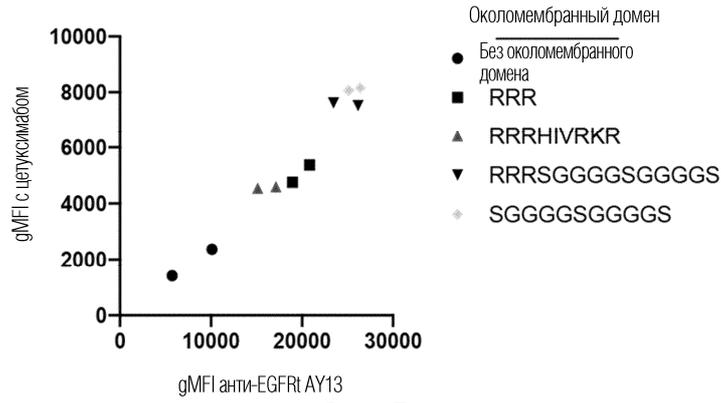
Фиг. 3В



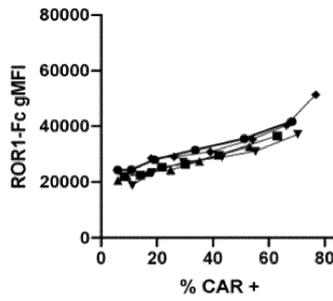
Фиг. 3С



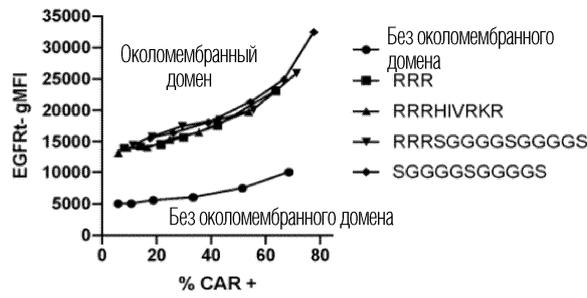
Фиг. 4А



Фиг. 4B



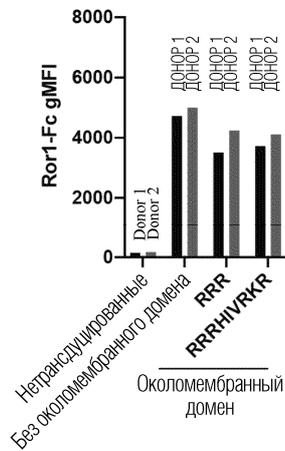
Фиг. 5A



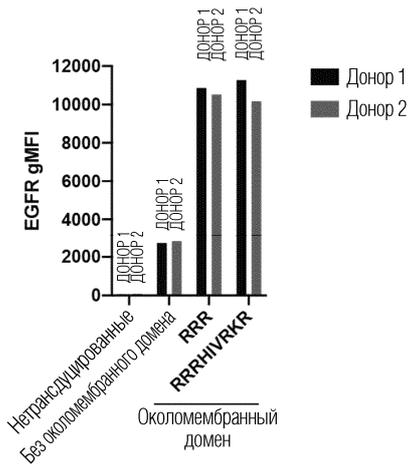
Фиг. 5B

MND-промотор	c-Jun	P2A	R12 CAR	P2A	Усеченный EGFR
--------------	-------	-----	---------	-----	----------------

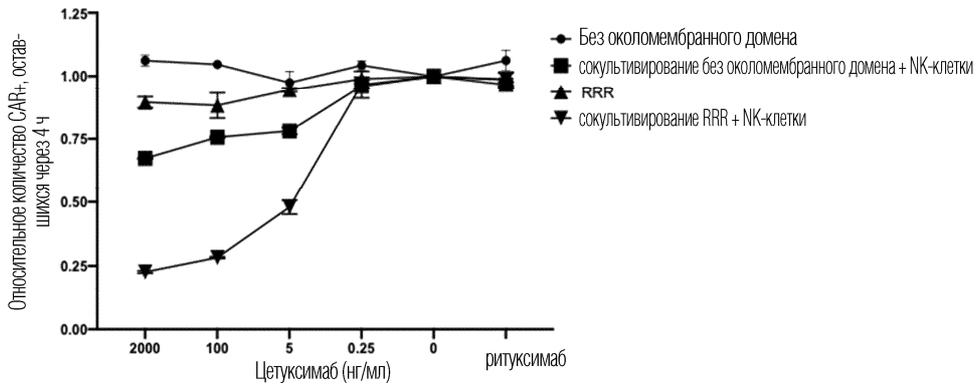
Фиг. 6A



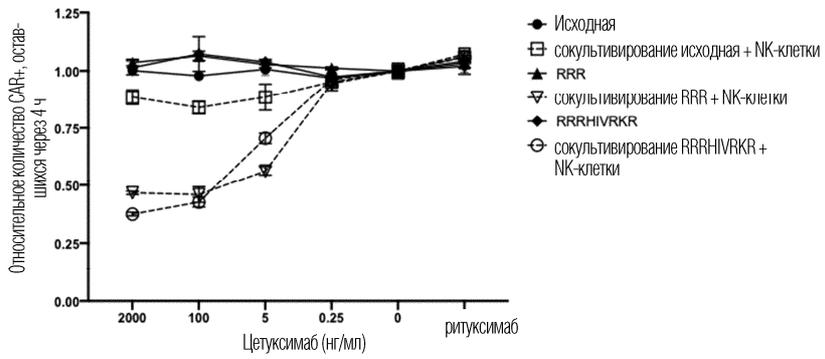
Фиг. 6B



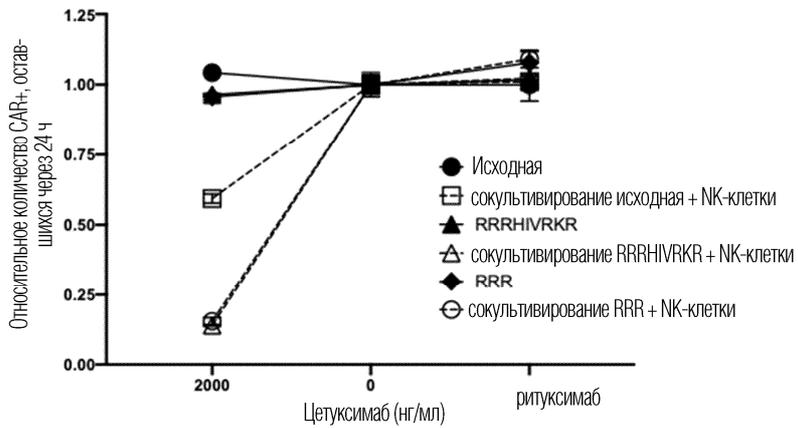
Фиг. 6С



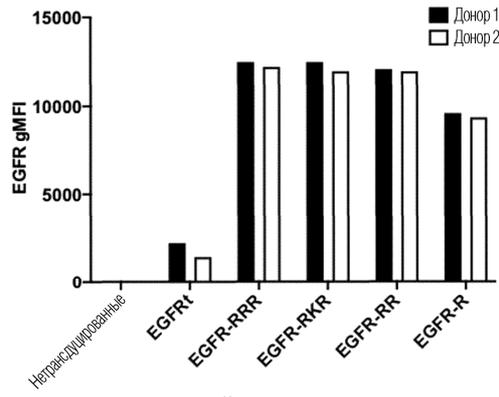
Фиг. 7



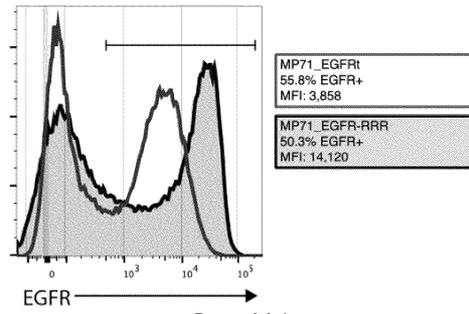
Фиг. 8



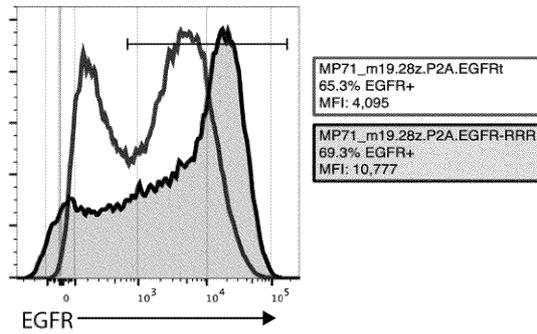
Фиг. 9



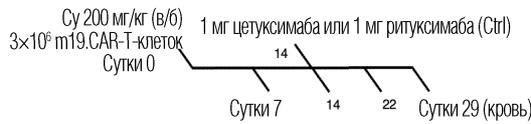
Испытуемая конструкция
Фиг. 10



Фиг. 11А

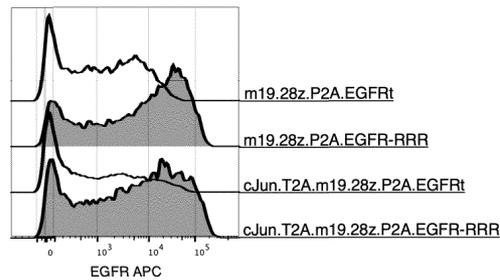


Фиг. 11В

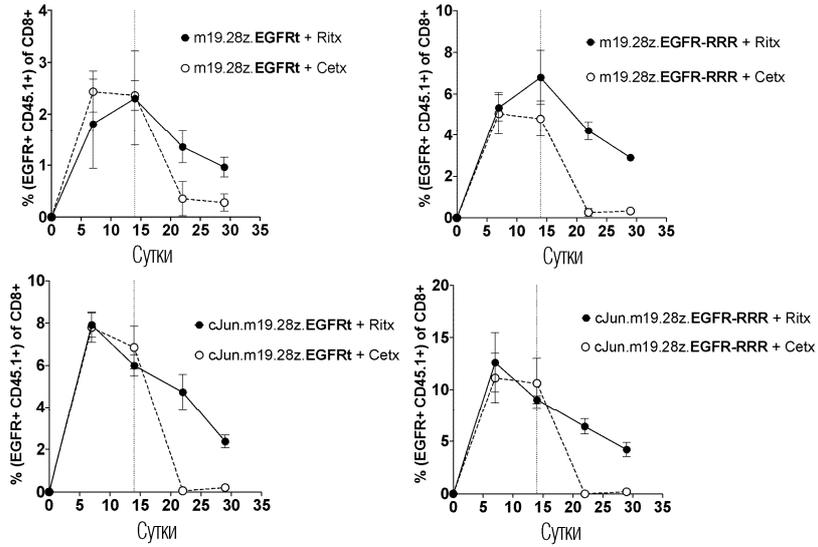


Группа	#	T-клетка	Плазма
A	6F	CD8	MP71_m19.28z.P2A.EGFRt
B	6F	CD8	MP71_m19.28z.P2A.EGFR-RRR
C	8F	CD8	MP71_cJun.T2A.m19.28z.P2A.EGFRt
D	8F	CD8	MP71_cJun.T2A.m19.28z.P2A.EGFR-RRR

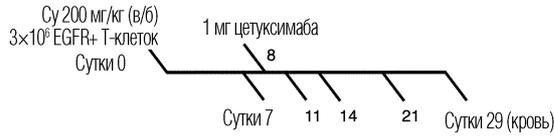
сутки 0 продукт для инфузии



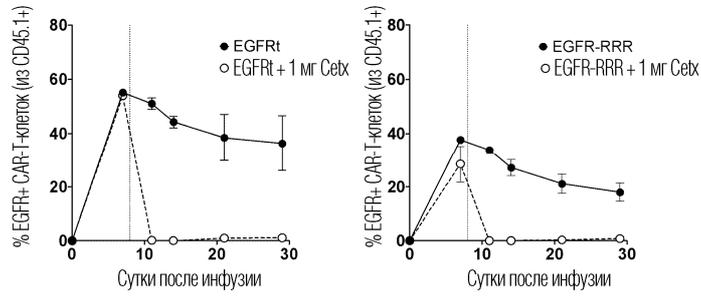
Фиг. 12А



Фиг. 12В



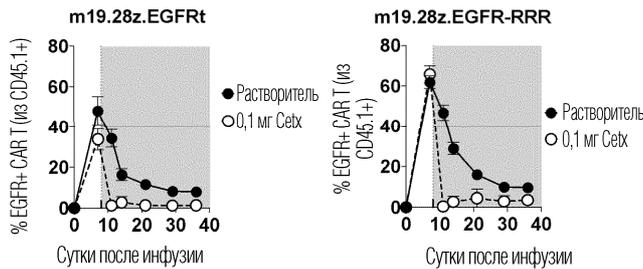
Группа	#	T-клетка	Плазма	
A	EGFRt	8F	CD8	MP71_EGFRt
B	EGFR-RRR	8F	CD8	MP71_EGFR-RRR



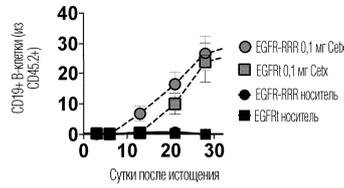
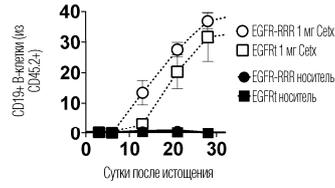
Фиг. 12С



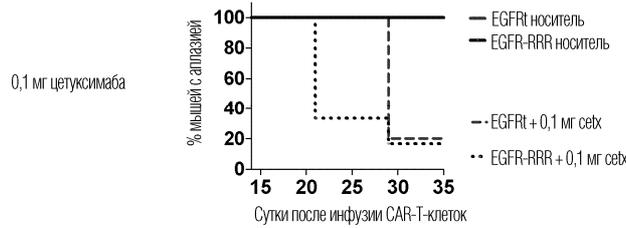
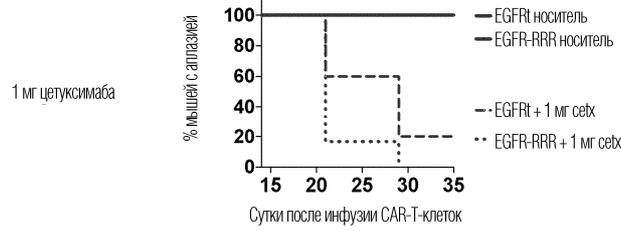
Группа	#	T-клетка	CAR T	Плазма
A	0 мг Cetx	5F	CD8	MP71_m19.28z.P2A.EGFRt
B	0,1 мг Cetx	5F	CD8	MP71_m19.28z.P2A.EGFRt
C	1 мг Cetx	5F	CD8	MP71_m19.28z.P2A.EGFRt
D	0 мг Cetx	6F	CD8	MP71_m19.28z.P2A.EGFR-RRR
E	0,1 мг Cetx	6F	CD8	MP71_m19.28z.P2A.EGFR-RRR
F	1 мг Cetx	6F	CD8	MP71_m19.28z.P2A.EGFR-RRR



Фиг. 13А



Фиг. 13В



Фиг. 13С

