

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393407** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.04.24

(22) Дата подачи заявки
2022.07.08

(51) Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 14/74 (2006.01)
C12N 15/24 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР ДЛЯ НАЦЕЛИВАНИЯ НА TROP-2-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РАК**

(31) **63/220,283**

(32) **2021.07.09**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/073566**

(87) **WO 2023/283644 2023.01.12**

(88) **2023.02.23**

(71) Заявитель:

**БОРД ОФ РИДЖЕНТС, ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТЕХАС
СИСТЕМ (US)**

(72) Изобретатель:

**Резвани Кэйти, Ачария Сунил,
Мерик-Бернстам Фонда, Упрети
Надима, Базар Рафет, Марин Коста
Дэвид (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Варианты осуществления изобретения относятся к способам и композициям, относящимся к нацеливанию на клетки, экспрессирующие TROP-2, с использованием конкретных сконструированных рецепторов. В конкретных вариантах осуществления НК-клетки специфически сконструированы для связывания с TROP-2 с использованием конкретных конструкций химерных антигенных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления векторы, которые экспрессируют TROP-2-нацеленные CAR, также экспрессируют конкретный "суицидный" ген и/или один или более конкретных цитокинов.

A1

202393407

202393407

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580176EA/085

ХИМЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР ДЛЯ НАЦЕЛИВАНИЯ НА TROP-2-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ РАК

Область техники

[0001] Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США с серийным номером 63/220283, поданной 9 июля 2021 г., которая в полном объеме включена в настоящий документ посредством ссылки.

Список последовательностей

[0002] Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был представлен в формате XML и включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия XML, созданная 7 июля 2022 г., имеет название MDAC_P1304WO_Sequence_Listing.xml и имеет размер 103067 байт.

Область техники

[0003] Варианты осуществления изобретения включают, по меньшей мере, области клеточной биологии, молекулярной биологии, иммунологии и медицины, включая онкологию.

Уровень техники

[0004] Генетическое перепрограммирование естественных клеток-киллеров (NK) для адаптивной иммунотерапии рака имеет клинически значимые применения и преимущества, такие как 1) врожденный противоопухолевый надзор без предварительной необходимости в сенсбилизации; 2) эффективность аллогенной трансплантации без реакции «трансплантат против хозяина»; и 3) прямая клеточно-опосредованная цитотоксичность и цитолиз опухолей-мишеней. Развитие NK-клеток человека и приобретение аутоотолерантности, аллореактивности и эффекторных функций представляет собой адаптивный процесс приобретения функций, специфичности и вооружения. На молекулярном уровне специфические активирующие и ингибирующие рецепторы регулируют функции NK-клеток посредством агрегации, балансирования и интеграции внеклеточных сигналов в отдельные эффекторные функции. Функциональная активность NK-клеток и восприимчивость к внешним стимулам соответствуют «реостатной» модели непрерывного обучения и, таким образом, эти клетки поддаются перепрограммированию. Генетическая модификация NK-клеток с целью перенаправления их эффекторных функций является эффективным способом использования их цитотоксической способности к киллингу опухолевых клеток.

[0005] TROP-2 представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа. TROP-2 экспрессируется на различных эпителиальных опухолевых клетках человека, включая злокачественные опухоли молочной железы, легких, уротелия, желудка, колоректального рака, поджелудочной железы, предстательной железы, шейки матки, головы и шеи, и яичника. TROP-2 экспрессируется на низких уровнях на поверхности кожи и слизистой оболочки ротовой полости; иначе TROP-2 не экспрессируется в нормальной ткани.

[0006] В области биологии рака существует потребность в способах и композициях, касающихся конструирования клеток, включая НК-клетки человека, для клеточной терапии, нацеленной на рак, включая TROP-2-положительные опухоли.

Сущность изобретения

[0007] Варианты осуществления изобретения относятся к способам и композициям, относящимся к сконструированным клеточным рецепторам, включая химерные антигенные рецепторы (CAR), которые нацелены на TROP-2 (также известный как опухолеассоциированный преобразователь сигнала кальция 2, поверхностный антиген 2 клеток трофобласта или EGP-1, например). В конкретных вариантах осуществления сконструированные рецепторы, нацеленные на TROP-2, находятся в форме полинуклеотидов, полипептидов и/или находятся на поверхности клеток любого типа, включая иммунные клетки. В конкретных случаях клетки представляют собой иммунные клетки, и в некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой НК-клетки, НК-Т-клетки, инвариантные НКТ-клетки, гамма-дельта-Т-клетки, альфа-бета-Т-клетки, регуляторные Т-клетки, В-клетки, макрофаги, мезенхимальные стромальные клетки (MSC), дендритные клетки и т.д. из любого источника. В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки представляют собой НК-клетки. В некоторых вариантах осуществления перепрограммированные НК-клетки из пуповинной крови (CB-NK) предназначены для воздействия на опухоли, экспрессирующие молекулы TROP-2.

[0008] TROP-2 (также «TROP2» или «Trop2») используется в качестве целевого антигена для аспектов раскрытых способов и композиций, по меньшей мере, частично, потому что он экспрессируется на многочисленных злокачественных опухолях, включая карциномы молочной железы, легких, уротелиальную карциному, карциномы желудка, прямой кишки, поджелудочной железы, предстательной железы, шейки матки, головы и шеи, и яичника.

[0009] Настоящее изобретение включает ряд новых молекул CAR, содержащих слитый белок scFv, нацеленный на человеческий TROP-2 (включая, например, scFv из антитела, такого как антитело RS7 (например, mRS7, hRS7), Pr1E11, TrMab-29, датопотамаб, 2G10, 2EF и т. д.), включая в некоторых случаях те, которые включают либо CD3 ξ один, либо в комбинации с костимулирующими или адаптерными сигнальными доменами, например, из NKG2D, OX-40, CD27, 41BB, CD28, DAP10, DAP12 и/или 2B4. В определенных случаях аллогенные CB-NK-клетки подвергаются трансдукции ретровирусом для экспрессии TROP-2 CAR. В конкретных вариантах осуществления иммунные клетки по настоящему изобретению, содержащие молекулы TROP-2 CAR, также экспрессируют один или более белков, которые поддерживают их выживаемость и пролиферацию. В определенных случаях иммунные клетки сконструированы таким образом, чтобы экспрессировать один или более цитокинов, которые способствуют экспансии и сохранности клеток. В конкретных случаях одним или более цитокинами являются интерлейкин 15 (IL-15), IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21 и/или IL-23. В некоторых аспектах вектор, который кодирует CAR, также кодирует цитокин, и каждый из них в конечном итоге

продуцируется в виде отдельных полипептидов. В других аспектах CAR и цитокин кодируются отдельными векторами.

[0010] Конкретные варианты осуществления изобретения позволяют использовать готовые к применению иммунные клетки, включая, по меньшей мере, NK-клетки, которые являются аллогенными по отношению к субъекту-реципиенту и нацелены на TROP-2-положительные клетки любого типа, и которые также могут трансдуцироваться или могут не трансдуцироваться для экспрессии одного или более цитокинов, таких как IL-15, IL-2, IL-21, IL-12, IL-23, IL-7 и/или IL-18.

[0011] В конкретных вариантах осуществления изобретения экспрессия одного или более эндогенных генов в иммунной клетке была модифицирована, например, экспрессия может быть частично или полностью снижена. Несмотря на то, что модификация может обеспечиваться любыми способами, в конкретных вариантах осуществления экспрессия одного или более генов была модифицирована, например, посредством снижения уровней экспрессии, и это может иметь место любыми подходящими способами, включая, по меньшей мере, CRISPR. Просто в качестве примера эндогенный ген может быть выбран из группы, состоящей из NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5, CD7, CTLA-4, TDAG8, CD38 и их комбинации.

[0012] Варианты осуществления настоящего изобретения включают полинуклеотиды, которые кодируют анти-TROP-2 химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок TROP-2-специфического антитела, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления TROP-2-специфическое антитело представляет собой антитело RS7. В некоторых вариантах осуществления антитело RS7 представляет собой мышинное RS7 (mRS7). В некоторых вариантах осуществления антитело RS7 представляет собой гуманизированное RS7 (hRS7). В некоторых вариантах осуществления анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах осуществления анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:9, и последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок содержит SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления анти-

TROP-2 антигенсвязывающий участок содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах осуществления анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:10, и последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или, по меньшей мере, 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах осуществления анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок содержит SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:15. Анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок может быть кодон-оптимизированным.

[0013] В некоторых вариантах осуществления TROP-2-специфическое антитело представляет собой антитело 2G10. В некоторых вариантах осуществления антитело 2G10 представляет собой мышинное 2G10 (m2G10). В некоторых вариантах осуществления антитело 2G10 представляет собой гуманизированное 2G10 (h2G10).

[0014] В некоторых вариантах осуществления TROP-2-специфическое антитело представляет собой антитело 2EF. В некоторых вариантах осуществления антитело 2EF представляет собой мышинное антитело 2EF (m2EF). В некоторых вариантах осуществления антитело 2EF представляет собой гуманизированное антитело 2EF (h2EF).

[0015] Трансмембранный домен может представлять собой трансмембранный домен, например, из CD28, альфа-цепи Т-клеточного рецептора, бета-цепи Т-клеточного рецептора, дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3-дзета, CD3-эпсилон, CD3-гамма, CD3-дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD27, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD154, ICOS/CD278, GITR/CD357, NKG2D, DAP10, DAP12 или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD27. Трансмембранный домен CD27 может содержать SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28. Трансмембранный домен CD28 может содержать SEQ ID NO:23. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8. Трансмембранный домен CD8 может содержать SEQ ID NO:24.

[0016] Внутриклеточный домен может представлять собой внутриклеточный домен, например, из CD3-дзета, CD27, CD28, 4-1BB, DAP12, NKG2D, OX-40 (CD134), DAP10, CD40L, 2B4, DNAM, CS1, CD48, NKp30, NKp44, NKp46 или NKp80 или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен представляет собой внутриклеточный домен CD3-дзета. Внутриклеточный домен CD3-дзета может содержать SEQ ID NO:29. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен

представляет собой внутриклеточный домен CD28. CAR может содержать два или более или три или более внутриклеточных доменов. В определенном аспекте два или более внутриклеточных домена содержат внутриклеточный домен CD3-дзета и дополнительный внутриклеточный домен, выбранный из внутриклеточного домена CD28, DAP10, DAP12, 4-1BB, NKG2D и 2B4. В конкретном случае два или более внутриклеточных домена содержат внутриклеточный домен CD3-дзета и внутриклеточный домен CD28.

[0017] В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит сигнальный пептид. В некоторых аспектах сигнальный пептид происходит из CD8, CD27, рецептора гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GMSCF-R), тяжелой цепи Ig (IgH), CD3 или CD4. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид IgH. Сигнальный пептид IgH может содержать SEQ ID NO:20. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид GMCSF-R. Сигнальный пептид GMCSF-R может содержать SEQ ID NO:21. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид CD8. В некоторых аспектах CAR не содержит сигнальный пептид.

[0018] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий CAR по настоящему изобретению, также кодирует дополнительный представляющий интерес полипептид. Последовательность, кодирующая дополнительный представляющий интерес полипептид, и последовательность, кодирующая CAR, могут быть разделены на полинуклеотиде элементом 2A, таким как элемент E2A. В некоторых аспектах представляющий интерес полипептид представляет собой терапевтический белок или белок, который повышает активность, экспансию и/или сохранность клеток. В некоторых вариантах осуществления дополнительный представляющий интерес полипептид представляет собой продукт «суицидного» гена, цитокин или человеческий или вирусный белок, который повышает пролиферацию, экспансию и/или метаболическую адаптацию. В некоторых вариантах осуществления дополнительный представляющий интерес полипептид представляет собой цитокин, например, IL-15, IL-2, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23 или IL-7. В конкретном варианте осуществления цитокин представляет собой IL-15. В некоторых вариантах осуществления дополнительный представляющий интерес полипептид представляет собой продукт «суицидного» гена. В некоторых вариантах осуществления продукт «суицидного» гена представляет собой каспазу 9. Продукт «суицидного» гена может представлять собой продукт индуцибельного «суицидного» гена. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует, помимо CAR, цитокин (например, IL-15) и продукт «суицидного» гена (например, каспазу-9, такую как индуцибельная каспаза 9).

[0019] Аспекты изобретения относятся к полипептиду, кодирующему CAR, содержащему последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9%

идентичность последовательности с SEQ ID NO:2, 4, 6 или 8. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит SEQ ID NO:2, 4, 6 или 8. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит SEQ ID NO:8. В некоторых аспектах полинуклеотид содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 7. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит SEQ ID NO: 1, 3, 5, или 7. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит SEQ ID NO:7.

[0020] Настоящее изобретение также относится к векторам, содержащим полинуклеотид по настоящему изобретению. Векторы, описанные в настоящем документе, включают вирусные векторы (например, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, лентивирусные векторы и ретровирусные векторы) и невирусные векторы (например, плазмиды).

[0021] Варианты осуществления настоящего изобретения включают иммунные клетки любого типа, содержащие любой полинуклеотид и/или полипептид, описанный в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой НК-клетку, Т-клетку, гамма-дельта-($\gamma\delta$)-Т-клетку, альфа-бета-($\alpha\beta$)-Т-клетку, инвариантную NKT (iNKT) клетку, В-клетку, макрофаг, MSC, дендритную клетку или их смесь. В случаях, когда иммунная клетка представляет собой НК-клетку, то НК-клетка может быть получена из пуповинной крови (включая объединенные единицы пуповинной крови), периферической крови, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, костного мозга и/или из клеточной линии. В конкретных аспектах линия НК-клеток представляет собой линию клеток НК-92 или другую линию НК-клеток, полученную из опухоли или из здоровой НК-клетки, или клетки-предшественника.

[0022] В конкретных вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой НК-клетку, например, полученную из пуповинной крови, например, из мононуклеарной клетки пуповинной крови. В определенных случаях НК-клетка может представлять собой CD56⁺ НК-клетку. НК-клетки могут экспрессировать один или более экзогенно введенных цитокинов, таких как IL-15, IL-2, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, IL-7 или их комбинацию. Конкретные варианты осуществления включают популяции иммунных клеток любого типа по настоящему изобретению, и клетки могут находиться в подходящей среде или подходящем носителе любого типа.

[0023] Настоящее изобретение относится к способам лечения или профилактики рака любого типа, в том числе введением клеток, экспрессирующих определенные анти-

TROP-2 CAR, в терапевтически эффективном количестве для облегчения или профилактики рака, или снижения риска развития рака, снижения тяжести рака, предотвращения метастазирования или его риска, или замедления начала развития рака.

[0024] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу киллинга TROP-2-положительных клеток у субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества клеток, несущих любой полинуклеотид и/или полипептид по настоящему изобретению (например, TROP-2 CAR по изобретению). В конкретных вариантах осуществления клетки представляют собой НК-клетки, Т-клетки, гамма-дельта-Т-клетки, альфа-бета-Т-клетки, инвариантные НКТ-клетки (iNKT), В-клетки, макрофаги, мезенхимальные стромальные клетки (MSC) или дендритные клетки. НК-клетки могут быть получены из пуповинной крови, периферической крови, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, гемопоэтических стволовых клеток, костного мозга или из клеточной линии. НК-клетки могут быть получены из моноклеарных клеток пуповинной крови. В некоторых случаях TROP-2-положительные клетки представляют собой опухолевые клетки, включая клетки гемопоэтического рака или солидных опухолей. Клетки могут быть аллогенными или аутологичными по отношению к субъекту, который может представлять собой человека или нет. Клетки можно вводить субъекту путем инъекции, внутривенно, внутриартериально, внутрибрюшинно, интратрахеально, интратуморально, внутримышечно, эндоскопически, внутриочаговым введением, интракраниально, чрескожно, подкожно, регионарно, путем перфузии в микроокружение опухоли, или их комбинацией.

[0025] В конкретных вариантах осуществления способов клетки можно вводить субъекту один раз или более одного раза. Продолжительность времени между введениями клеток субъекту может составлять 1-24 ч, 1-7 суток, 1-4 недели, 1-12 месяцев или 1 год или более. Способы могут дополнительно включать стадию обеспечения субъекту эффективного количества дополнительной терапии, такой как хирургическое вмешательство, лучевая терапия, генная терапия, иммунотерапия и/или гормональная терапия. В некоторых случаях дополнительная терапия может включать одно или более антител или агентов на основе антител. В некоторых аспектах способов они могут дополнительно включать стадию идентификации TROP-2-положительных клеток у субъекта.

[0026] Полагается, что любой вариант осуществления, раскрытый в данном описании, может быть реализован в отношении любого способа или композиции по настоящему изобретению, и наоборот. Кроме того, композиции по настоящему изобретению можно использовать для достижения способов по настоящему изобретению.

[0027] Вышеизложенное довольно широко обозначило признаки и технические преимущества настоящего изобретения, чтобы можно было лучше понять последующее подробное описание. Далее будут описаны дополнительные признаки и преимущества, которые составляют предмет формулы изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что раскрытая концепция и конкретные варианты

осуществления можно легко использовать в качестве основы для модификации или конструирования других конструкций для достижения тех же целей, что и настоящие конструкции. Специалистам в данной области также должно быть понятно, что такие эквивалентные конструкции не выходят за рамки сущности и объема изобретения, приведенных в прилагаемой формуле. Новые признаки, которые считаются характерными для раскрытых здесь конструкций, как в отношении организации, так и в отношении способа работы, а также дополнительные цели и преимущества, будут лучше понятны из последующего описания, если рассматривать их в сочетании с прилагаемыми фигурами. Однако следует четко понимать, что каждая из фигур представлена только с целью иллюстрации и описания и не предназначена для определения границ настоящего изобретения.

Краткое описание фигур

[0028] Следующие фигуры составляют часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации некоторых аспектов настоящего изобретения. Изобретение можно лучше понять, обратившись к одному или более из этих фигур в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных здесь.

[0029] На фиг. 1A-1C приведены результаты, показывающие, что Trop2 является привлекательной мишенью для PDAC. (A) Экспрессию Trop2 на уровне мРНК определяли для различных типов рака с использованием набора данных TCGA, который показывает, что PDAC имеет относительно высокую экспрессию Trop2. (B) Кривая выживаемости Каплана-Мейера, показывающая, что у пациентов с высокой экспрессией Trop2 общая выживаемость была достоверно ниже, чем у пациентов с низкой экспрессией Trop2 ($p=0,033$). (C) Поверхностную экспрессию Trop2 определяли с использованием проточной цитометрии. Репрезентативные гистограммы показывают, что клеточные линии PDAC имеют более высокую экспрессию Trop2 на своей поверхности. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) соответствует экспрессии Trop2.

[0030] На фиг. 2A-2B приведены результаты, показывающие, что Trop2 является привлекательной мишенью при раке яичника. (A) Экспрессию Trop2 на уровне мРНК определяли при различных типах рака с использованием набора данных TCGA, который показывает, что рак яичника имеет относительно высокую экспрессию Trop2. (B) Поверхностную экспрессию Trop2 определяли с использованием проточной цитометрии, и репрезентативные гистограммы показывают, что линии клеток рака яичника имеют более высокую экспрессию Trop2 на своей поверхности. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) соответствует экспрессии Trop2.

[0031] На фиг. 3 приведены результаты, показывающие, что Trop2 экспрессируется в различных клеточных линиях колоректального рака (CRC). Поверхностную экспрессию Trop2 определяли с использованием проточной цитометрии, и репрезентативные гистограммы показывают, что несколько клеточных линий CRC (таких как HCT-15, SW403, SW1116, WiDr, Sw480) имеют высокую экспрессию Trop2 на своей поверхности. CMS: консенсусные молекулярные подтипы (CMS1: иммунный MSI; CMS2: канонический;

CMS3: метаболический; и CMS4: мезенхимальный).

[0032] На фиг. 4A-4B показан дизайн и информация, касающаяся конструкции химерного антигенного рецептора против Trop2. (A) Последовательность Trop2 CAR получали с использованием последовательности одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), полученной из последовательности антитела сацитузумаб говитекан-hziy (RS7). На верхней панели приведено схематическое изображение дизайна CAR для различных конструкций, и на нижней панели приведены репрезентативные идентификаторы для этих конструкций CAR, использованные на фиг. 4A-10C. (B) Эффективность трансфекции Т-клеток 293 различными конструкциями Trop2 CAR. Эффективность трансфекции определяли анализом поверхностной экспрессии TROP2 в клетках 293Т после сбора вируса с использованием проточной цитометрии. Антиген Trop2, меченный гистидиновой меткой (His), добавляли к клеткам на 20 мин, и затем использовали анти-His антитело для анализа эффективности трансфекции. Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве контроля.

[0033] На фиг. 5A-5B приведены результаты, показывающие, что NK-клетки из пуповинной крови (CB), трансдуцированные конструкциями Trop2 CAR, демонстрируют высокую эффективность трансдукции. Супернатанты ретровирусов, собранные в ходе экспериментов по трансфекции, использовали для трансдукции клеток CBNK. Через 48 ч после трансдукции эффективность трансдукции определяли с использованием проточной цитометрии. Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве контроля. Клетки CBNK, трансдуцированные всеми конструкциями Trop2, показали высокую экспрессию CAR на своей поверхности. (A) Репрезентативная гистограмма окрашивания CAR. (B) Эффективность трансдукции CAR количественно оценивали у трех разных доноров.

[0034] На фиг. 6 приведены результаты, показывающие, что конструирование Trop2 CAR клеток CBNK усиливает их цитотоксичность против клеточных линий PDAC, экспрессирующих Trop2. NK-клетки получали из пуповинной крови и трансдуцировали различными конструкциями Trop2 CAR. Нетрансдуцированные (NT) клетки CBNK использовали в качестве контроля. Клетки CFPAC1, PATC148 и PANC1, которые имеют высокую, высокую и низкую/отсутствующую экспрессию CD70 соответственно, метили хромом-51 и сокультивировали с различными клетками CAR CBNK при различных соотношениях эффектора к мишени для проведения 4-ч анализа высвобождения хрома. По сравнению с клетками NT CBNK, все NK-клетки с Trop2 CAR показали повышенную цитотоксичность в отношении клеток CFPAC1 (слева) и PATC148 (в центре), которые имеют высокую экспрессию Trop2. С другой стороны, не было различий в цитотоксичности NK-клеток с Trop2 CAR по сравнению с клетками NT-NK в отношении клеток PANC1 (справа), которые имеют низкую экспрессию Trop2 или не имеют ее вообще.

[0035] На фиг. 7 приведены результаты, показывающие, что конструирование Trop2 CAR клеток CBNK усиливает их цитотоксичность в отношении линий клеток рака яичника, экспрессирующих Trop2. NK-клетки получали из пуповинной крови и трансдуцировали различными Trop2 CAR. Нетрансдуцированные (NT) клетки CBNK использовали в

качестве контроля. Линию клеток SKOV3, которая имеет высокую экспрессию CD70, метили хромом-51 и сокультивировали с клетками CAR CBNK при различных соотношениях эффектора к мишени в течение 4 ч и измеряли высвобождение хрома, что соответствует цитотоксичности для опухолевых клеток. По сравнению с клетками NT-NK все клетки Trop2 CAR CBNK показали повышенную цитотоксичность в отношении клеток SKOV3.

[0036] На фиг. 8A-8D приведены результаты, показывающие, что конструирование Trop2 CAR клеток CBNK усиливает их цитотоксичность в отношении клеточных линий CRC, экспрессирующих Trop2. NK-клетки получали из пуповинной крови и трансдуцировали различными Trop2 CAR. Нетрансдуцированные (NT) клетки CBNK использовали в качестве контроля. Клеточные линии с высокой экспрессией Trop2 (SW403 и WiDR) и низкой экспрессией Trop2 или ее отсутствием (RKO и LoVo) подвергали анализу высвобождения хрома. По сравнению с NT-NK клетками, все клетки Trop2 CAR CBNK (особенно Trop2-CAR #2) показали повышенную цитотоксичность для клеток SW403 (вверху слева) и WiDr (вверху справа), которые имеют высокую экспрессию Trop2. С другой стороны, не было различий в цитотоксичности Trop2 CAR NK-клеток по сравнению с клетками NT-NK по отношению к клеткам RKO (внизу слева) и LoVo (внизу справа), которые имеют низкую экспрессию/отсутствие Trop2.

[0037] На фиг. 9A-9B приведены результаты, показывающие, что конструирование Trop2 CAR клеток CBNK усиливает их цитотоксичность в отношении клеточных линий CRC, экспрессирующих Trop2, как показано с использованием анализа цитотоксичности IncuCyte. Для определения цитотоксической активности клеток CBNK в режиме реального времени, трансдуцированных различными конструкциями Trop2 CAR, проводили анализ цитотоксичности IncuCyte. Клетки Trop2 CAR-CBNK сокультивировали в соотношении 1:1 с клетками WiDr (высокая экспрессия Trop2) или RKO (низкая экспрессия Trop2/или ее отсутствие), и цитотоксичность NK-клеток в отношении линий опухолевых клеток измеряли в режиме реального времени каждый час в течение 120 ч. По сравнению с NK-клетками, все NK-клетки Trop2 CAR показали повышенную цитотоксичность для клеток WiDr (A), которые имеют высокую экспрессию Trop2. С другой стороны, не было различий в цитотоксичности Trop2 CAR NK-клеток по сравнению с NT-NK клетками в отношении клеток RKO (B), которые имеют низкую экспрессию/отсутствие экспрессии Trop2.

[0038] На фиг. 10A-10C приведены результаты, показывающие, что клетки CBNK, трансдуцированные Trop2 CAR, проявляют высокую противоопухолевую активность против Trop2-положительных клеток рака яичника *in vivo*. Мышам NSG прививали 0,5M меченных люциферазой светлячка клеток SKOV3 (SKOV3 FFluc) с высокой экспрессией Trop2. (A) Биолюминесцентная визуализация опухоли, показывающая, что клетки CBNK, трансдуцированные Trop2 CAR, смогли снизить опухолевую нагрузку по сравнению с группой только с опухолями или группой NT CBNK. (B) График, показывающий среднее свечение по данным BLI и сравнение различий между группами мышей, приведен на панели 10A. (C) Кривая выживаемости, показывающая достоверное повышение

выживаемости мышей после введения однократной дозы клеток CBNK, трансдуцированных различными Trop2 CAR, по сравнению с контрольными группами только с опухолями или клетками NT CBNK.

[0039] На фиг. 11A-11B показано получение и экспрессия конструкций Trop2 CAR с различным костимулирующим доменом. (A) Схематическая карта, представляющая различные области CAR конструкции и различные костимулирующие молекулы (DAP10 по сравнению с CD28). (B) Репрезентативная гистограмма окрашивания CAR конструкциями TROP2 CAR, включающими различные костимулирующие молекулы.

[0040] На фиг. 12A-12B приведены результаты, показывающие, что клетки Trop2 CAR CBNK обладают высокой цитотоксичностью в отношении клеток PATC148 по сравнению с нетрансдуцированными клетками CBNK. (A) Клетки CBNK получали из пуповинной крови и трансдуцировали Trop2 CAR, включающими различные костимулирующие молекулы. В качестве контроля использовали нетрансдуцированные (NT) клетки CBNK и 20% SDS (который вызывает полный лизис клеток). Клетки PATC148, которые имеют высокую экспрессию Trop2, культивировали в 96-луночных планшетах RTCA E-Plates в течение ночи, и на следующие сутки добавляли различные группы НК при соотношении эффектора к мишени (E:T) 2:1. Рост опухолевых клеток непрерывно оценивали с использованием анализа xCelligence и представляли в виде нормализованного клеточного индекса. По сравнению с клетками NT-NK, Trop2 CAR NK-клетки с совместной стимуляцией CD28 или DAP10 показали повышенную цитотоксичность для клеток PATC148. Стрелка (\downarrow) обозначает время, когда клетки CBNK или SDS добавляли к опухолевым клеткам. (B) Для анализа цитотоксической активности клеток Trop2 CAR CBNK в режиме реального времени для опухолевых клеток проводили анализ цитотоксичности IncuCyte с прижизненной визуализацией. Клетки CBNK, трансдуцированные Trop2 CAR, и клетки PATC148 сокультивировали в соотношении 1:1, и цитотоксичность клеток CBNK в отношении клеток PATC148 в режиме реального времени измеряли каждый час в течение 60-ч периода. По сравнению с NT-NK клетками, Trop2 CAR NK-клетки с костимуляцией CD28 или DAP10 показали повышенную цитотоксичность для клеток PATC148.

[0041] На фиг. 13A-13B приведены результаты, показывающие, что клетки CBNK, трансдуцированные Trop2 CAR, и Т-клетки, трансдуцированные Trop2 CAR, обладают высокой цитотоксичностью в отношении клеток рака яичника по сравнению с их нетрансдуцированными аналогами. (A) Клетки CBNK получали из пуповинной крови и трансдуцировали Trop2 CAR с костимуляцией CD28 или DAP10. Клетки SKOV3, которые имеют высокую экспрессию Trop2, культивировали в 96-луночных E-планшетах RTCA в течение ночи, и на следующий сутки добавляли клетки CBNK в соотношении эффектора к мишени (E:T) 2:1. Рост опухолевых клеток непрерывно измеряли на приборе Xcelligence и представляли в виде нормализованного клеточного индекса. По сравнению с клетками NT CAR CBNK, Trop2 CAR NK-клетки с костимуляцией CD28 или DAP10 показали повышенную цитотоксичность для клеток SKOV3. Стрелка (\downarrow) обозначает время, когда

клетки CBNK добавляли к клеткам SKOV3. (B) Т-клетки получали из периферической крови здоровых доноров и трансдуцировали различными Trop2 CAR. Клетки HEYA8 (линия клеток рака яичника, экспрессирующих Trop2) культивировали 96-луночных планшетах RTCA E-Plates в течение ночи, и на следующие сутки добавляли CAR Т-клетки, трансдуцированные различными конструкциями CAR, при соотношении эффектора к мишени (E:T) 1:1. Рост опухолевых клеток непрерывно измеряли на приборе Xcelligence и представляли в виде нормализованного клеточного индекса. По сравнению с NT-Т клетками, Trop2 CAR Т-клетки показали повышенную цитотоксичность для клеток HEYA8. Стрелка (↓) обозначает время, когда Т-клетки добавляли к клеткам HEYA8.

[0042] На фиг. 14А-14С приведены результаты, показывающие, что клетки CBNK, трансдуцированные Trop2 CAR, с костимуляцией CD28 или DAP10, проявляли эффективную противоопухолевую активность и повышали выживаемость против Trop2-положительных клеток рака яичника *in vivo*. Мышам NSG прививали 0,5М меченных люциферазой светлячка клеток SKOV3 (SKOV3 FFluc), которые имеют высокую экспрессию Trop2. (А) Биолюминесцентная визуализация опухоли, показывающая, что клетки CBNK, трансдуцированные CAR Trop2 с костимуляцией CD28 или DAP10, были способны снизить опухолевую нагрузку, состоящую из клеток SKOV3, экспрессирующих Trop2, по сравнению с группой только с опухолями, группами CBNK, трансдуцированными NT или IL15. (B) График, показывающий среднее свечение по данным BLI для сравнения различных групп мышей, показанных на панели 14А. (C) Кривая выживаемости, показывающая достоверное повышение выживаемости при однократной инфузии Trop2 CAR NK-клеток с костимуляцией CD28 или DAP10 у мышей NSG, которым прививали SKOV3, по сравнению с группой только с опухолями, группами CBNK, трансдуцированными NT или IL15.

[0043] На фиг. 15 приведены результаты, показывающие, что конструкции TROP2, полученные из клонов антител hRS7 или 2G10, приводили к высокой эффективности трансфекции в клетках 293Т. Клетки 293Т трансфектировали различными конструкциями TROP2, как показано, с использованием Fugene в качестве реагента для трансфекции. Эффективность трансфекции определяли анализом поверхностной экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) в клетках 293Т после сбора вируса с использованием проточной цитометрии. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) соответствует эффективности трансфекции. Нетрансдуцированные (NT) клетки использовали в качестве отрицательного контроля.

[0044] На фиг. 16 приведены результаты, показывающие, что конструкции TROP2, полученные из клонов антител hRS7 или 2G10, приводили к высокой эффективности трансдукции в Т-клетках. Супернатант ретровируса, собранный в ходе экспериментов по трансфекции, использовали для трансдукции Т-клеток, выделенных из периферической крови (PB), и ретронектин использовали для повышения эффективности трансдукции. Через 48 ч после трансдукции эффективность трансдукции измеряли анализом поверхностной экспрессии TROP2 CAR в Т-клетках с использованием проточной

цитометрии. Супернатант из нетрансдуцированных (NT) клеток использовали в качестве отрицательного контроля. PB1 (слева) и PB2 (справа) - периферическая кровь от двух разных доноров.

[0045] На фиг. 17 приведены результаты, показывающие, что TROP2 CAR T-клетки, полученные из 2G10, обладают повышенной цитотоксичностью в отношении клеток рака яичника HEY8 по сравнению с нетрансдуцированными T-клетками, но обладают меньшей цитотоксической активностью по сравнению с hRS7-TROP2 CAR T-клетками. T-клетки получали из периферической крови и трансдуцировали различными конструкциями TROP2 для создания TROP2 CAR клеток. Нетрансдуцированные (NT) T-клетки и T-клетки, трансдуцированные CAR T-клетками hRS7-TROP2 (hRS7-TROP2-DAP10 и hRS7-TROP2-CD28), использовали в качестве контроля. Клетки HEY8 культивировали в 96-луночных планшетах RTCA E-Plates в течение ночи, и на следующие сутки добавляли различные TROP2 CAR T-клетки в соотношении эффектора к мишени 1:1 (E:T). Цитотоксичность непрерывно измеряли на приборе Xcelligence и представляли в виде нормализованного клеточного индекса. По сравнению с NT T-клетками, TROP2 CAR T-клетки, полученные из 2G10, могли обеспечить киллинг клеток рака яичника HEY8, но hRS7-TROP2 CAR T-клетки показали более высокую цитотоксичность, указывая на то, что цитотоксическая активность TROP2 CAR T-клеток, происходящих из 2G10, против HEY8 была ниже, чем у hRS7-TROP2 CAR T-клеток. Эксперименты проводили с CAR T-клетками, полученными от одного донора.

[0046] На фиг. 18A-18B приведены результаты, показывающие, что TROP2 CAR T-клетки, полученные из 2G10, обладают повышенной цитотоксичностью против опухолевых клеток SW480 по сравнению с нетрансдуцированными T-клетками, но являются менее цитотоксичными, чем hRS7-TROP2 CAR T-клетки. T-клетки получали из периферической крови и трансдуцировали различными конструкциями TROP2 для получения TROP2 CAR клеток. Нетрансдуцированные (NT) T-клетки и T-клетки, трансдуцированные CAR T-клетками hRS7-TROP2 (hRS7-TROP2-DAP10 и hRS7-TROP2-CD28), использовали в качестве контроля. Клетки SW480 культивировали в 96-луночных планшетах RTCA E-Plates в течение ночи, и на следующие сутки добавляли различные TROP2 CAR T-клетки в соотношении эффектора к мишени (E:T) 1:1. Цитотоксичность непрерывно измеряли на приборе Xcelligence и представляли в виде нормализованного клеточного индекса. По сравнению с NT T-клетками, производными 2G10 и hRS7-TROP2, CAR T-клетки проявляли повышенную цитотоксичность для опухолевых клеток SW480. Эксперименты проводили с CAR T-клетками, полученными от одного донора.

[0047] На фиг. 19A-19B приведены результаты, показывающие, что TROP2 CAR T-клетки, происходящие из 2G10, и CAR hRS7-TROP2 T-клетки проявляли сравнимую цитотоксичность в отношении опухолевых клеток PATC148 PDAC. T-клетки получали из периферической крови и трансдуцировали различными конструкциями TROP2 для генерации TROP2 CAR клеток. Нетрансдуцированные (NT) T-клетки и T-клетки, трансдуцированные CAR T-клетками hRS7-TROP2 (hRS7-TROP2-DAP10 и hRS7-TROP2-

CD28), использовали в качестве контроля. Клетки PATC148 культивировали в 96-луночных планшетах RTCA E-Plates в течение ночи, и на следующие сутки добавляли различные TROP2 CAR T-клетки в соотношении эффектора к мишени (E:T) 1:1. Цитотоксичность непрерывно измеряли с использованием Xcelligence и представляли в виде нормализованного клеточного индекса. TROP2 CAR T-клетки, полученные из 2G10, обладали цитотоксичностью для клеток рака яичника PATC148, сравнимой с T-клетками CAR hRS7-TROP2, указывая на то, что TROP2 CAR T-клетки, происходящие из 2G10, и T-клетки hRS7-TROP2 CAR обладают высокой цитотоксической активностью против PATC148 по сравнению с NT T-клетками. Эксперименты проводили с CAR T-клетками, полученными от двух доноров (на фиг. 19A приведены результаты для клеток, полученных от первого донора, на фиг. 19B приведены результаты для клеток, полученных от второго донора).

[0048] На фиг. 20A-20B приведены результаты, показывающие, что TROP2 CAR T-клетки, происходящие из 2G10, обладают более низкой цитотоксичностью в отношении клеток рака яичника SKOV3 по сравнению с hRS7-TROP2 CAR T-клетками. T-клетки получали из периферической крови и трансдуцировали различными конструкциями TROP2 CAR для генерации TROP2 CAR T-клеток. Нетрансдуцированные (NT) T-клетки и T-клетки, трансдуцированные hRS7-TROP2 CAR T-клетками (hRS7-TROP2-DAP10 и hRS7-TROP2-CD28), использовали в качестве контроля. Клетки SKOV3 культивировали в 96-луночных планшетах RTCA E-Plates в течение ночи, и на следующие сутки добавляли различные TROP2 CAR T-клетки в соотношении эффектора к мишени 1:1 (E:T). Цитотоксичность непрерывно измеряли с использованием прибора Xcelligence и представляли в виде нормализованного клеточного индекса. TROP2 CAR T-клетки, происходящие из 2G10, и NT-T клетки не обеспечивали киллинг клеток SKOV3, тогда как hRS7-TROP2 CAR T-клетки эффективно обеспечивали киллинг клеток SKOV3. Эксперименты проводили с CAR T-клетками, полученными от двух доноров (на фиг. 20A приведены результаты для клеток, полученных от первого донора, на фиг. 20B приведены результаты для клеток, полученных от второго донора).

[0049] На фиг. 21A-21B приведены результаты, показывающие, что TROP2 CAR T-клетки, происходящие из 2G10, демонстрируют сравнимую цитотоксичность в отношении клеток рака яичника OVCAR5 по сравнению с hRS7-TROP2 CAR T-клетками. T-клетки получали из периферической крови и трансдуцировали различными конструкциями TROP2 CAR для генерации TROP2 CAR T-клеток. Нетрансдуцированные (NT) T-клетки и T-клетки, трансдуцированные hRS7-TROP2 CAR T-клетками (hRS7-TROP2-DAP10 и hRS7-TROP2-CD28), использовали в качестве контроля. Клетки OVCAR5 культивировали в 96-луночных планшетах RTCA E-Plates в течение ночи, и на следующие сутки добавляли различные TROP2 CAR T-клетки в соотношении эффектора к мишени 1:1 (E:T). Цитотоксичность непрерывно измеряли с использованием прибора Xcelligence и представляли в виде нормализованного клеточного индекса. TROP2 CAR T-клетки, происходящие из 2G10, и hRS7-TROP2 CAR T-клетки имели сравнимую цитотоксичность с OVCAR mRS7 или hRS7,

шарнирным и трансмембранным доменом CD28, костимулирующим доменом CD28, внутриклеточным доменом CD3-дзета, против клеток рака яичника OVCAR5, указывая на то, что TROP2 CAR T-клетки, происходящие из 2G10, и hRS7-TROP2 CAR T-клетки могут эффективно обеспечивать киллинг клеток OVCAR5. Эксперименты проводили с CAR T-клетками, полученными от двух доноров.

Подробное описание изобретения

I. Примеры определений

[0050] В соответствии с давней конвенцией о патентном праве артикли «а» и «an», когда они используются в настоящем описании вместе со словом «содержащий», включая формулу изобретения, означают «один или более». Некоторые варианты осуществления изобретения могут состоять или по существу состоять из одного или более элементов, стадий способа и/или способов по изобретению. Полагается, что любой способ или композиция, описанные в настоящем документе, могут быть реализованы относительно любого другого способа или композиции, описанных в настоящем документе, и что различные варианты осуществления могут быть объединены.

[0051] В рамках настоящего описания, если по контексту не требуется иного, то слова «содержат», «содержит» и «содержащий» будут пониматься как подразумевающие включение указанной стадии или элемента, или группы стадий или элементов, но не исключение любой другой стадии или элемента, или группы стадий или элементов. Под выражением «состоящий из» подразумевается включение и ограничение всего того, что следует за выражением «состоящий из». Таким образом, выражение «состоящий из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, и что никакие другие элементы не могут присутствовать. Под выражением «состоящий по существу из» подразумевается включение любых элементов, перечисленных после этого выражения, и ограничение других элементов, которые не оказывают отрицательное влияние и не способствуют активности или действию, указанным в раскрытии для перечисленных элементов. Таким образом, выражение «состоящий по существу из» указывает на то, что перечисленные элементы являются необходимыми или обязательными, но что никакие другие элементы не являются необязательными и могут присутствовать или могут не присутствовать в зависимости от того, насколько они оказывают отрицательное на влияние активность или действие перечисленных элементов.

[0052] Ссылка в данном описании на «один вариант осуществления», «вариант осуществления», «конкретный вариант осуществления», «родственный вариант осуществления», «определенный вариант осуществления», «дополнительный вариант осуществления» или «еще один вариант осуществления» или их комбинацию означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с вариантом осуществления, включены, по меньшей мере, в один вариант осуществления настоящего изобретения. Таким образом, появление вышеуказанных выражений в различных местах данного описания не обязательно относится к одному и тому же варианту осуществления. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть объединены

любым подходящим способом в одном или более вариантах осуществления.

[0053] В настоящем документе термины «или» и «и/или» используются для описания многочисленных компонентов в комбинации или исключении друг друга. Например, «x, y и/или z» могут относиться только к «x», только к «y», только к «z», «x, y и z», «(x и y) или z», «x или (y и z)» или «x или y или z». В частности, полагается, что x, y или z могут быть исключены из варианта осуществления.

[0054] В данной заявке термин «примерно» используется в его простом и обычном значении в области клеточной и молекулярной биологии, для указания того, что значение включает стандартное отклонение ошибки для устройства или метода, используемого для определения значения.

[0055] В рамках настоящего описания, термин «сконструированный» относится к объекту, созданному руками человека, включая клетку, нуклеиновую кислоту, полипептид, вектор и т.д. По меньшей мере, в некоторых случаях сконструированный объект является синтетическим и содержит элементы, которые отсутствуют в природе или не имеют такой конфигурации, в какой он используется в настоящем изобретении.

[0056] В рамках настоящего описания, термин «выделенные» относится к молекулам или биологическим веществам или клеточным материалам, которые по существу не содержат из других веществ. В одном аспекте термин «выделенные» относится к нуклеиновой кислоте, такой как ДНК или РНК, или белку или полипептиду, или клетке, или клеточной органелле, или ткани или органу, отделенной от других ДНК или РНК, или белков, или полипептидов, или клеток или клеточных органелл, или тканей или органов соответственно, таких как те, которые присутствуют в природном источнике. Термин «выделенные» также относится к нуклеиновой кислоте или пептиду, которые по существу не содержат клеточного материала, вирусного материала или культуральной среды при получении методами рекомбинантной ДНК или химических предшественников или других химических реагентов при химическом синтезе. Более того, подразумевается, что «выделенная нуклеиновая кислота» включает фрагменты нуклеиновой кислоты, которые не встречаются в природе в виде фрагментов и не встречаются в естественном состоянии. Термин «выделенные» также используется здесь по отношению к полипептидам, которые выделены из других клеточных белков, и подразумевается, что термин охватывает как очищенные, так и рекомбинантные полипептиды. Термин «выделенные» также используется здесь по отношению к клеткам или тканям, которые выделены из других клеток или тканей, и подразумевается, что он охватывает как культивируемые, так и сконструированные клетки или ткани.

[0057] В рамках настоящего описания, термин «профилактировать» и подобные термины, такие как «профилактированный», «профилактика» и т. д., обозначают подход к предотвращению, подавлению или уменьшению вероятности развития или рецидива заболевания или патологического состояния, например, рака. Термин также относится к замедлению начала развития или рецидива заболевания или патологического состояния или замедлению развития или рецидива симптомов заболевания или патологического

состояния. В рамках настоящего описания, слова «профилактика» и подобные слова также включают снижение тяжести, эффекта, симптомов и/или нагрузки заболевания или патологического состояния до начала развития или рецидива заболевания или патологического состояния.

[0058] В рамках настоящего описания, термин «образец» обычно относится к биологическому образцу. Образец может быть отобран из ткани или клеток субъекта. В некоторых примерах образец может включать или может быть получен из биопсийного материала ткани, крови (например, цельной крови), плазмы крови, внеклеточной жидкости, высушенных пятен крови, культивированных клеток, удаленной ткани. Образец может быть выделен из источника до сбора. Неограничивающие примеры включают кровь, спинномозговую жидкость, плевральную жидкость, околоплодные воды, лимфатическую жидкость, слюну, мочу, кал, слезы, пот или выделения слизистой оболочки и другие жидкости организма, выделенные из первичного источника перед сбором. В некоторых примерах образец выделен из его первичного источника (клеток, тканей, жидкостей организма, таких как кровь, образцов окружающей среды и т. д.) во время подготовки образца. Образец можно очистить или иным образом обогатить из своего первичного источника, и может быть не очищен. В некоторых случаях первичный источник гомогенизируют перед дальнейшей обработкой. Образец можно профильтровать или центрифугировать для удаления лейкоцитной пленки, липидов или твердых частиц. Образец также можно очистить или обогатить в отношении нуклеиновых кислот или обработать РНКазы. Образец может содержать интактные, фрагментированные или частично деградированные ткани или клетки.

[0059] В рамках настоящего описания, термин «субъект» обычно относится к субъекту, содержащему биологический образец, который подвергается обработке или анализу и, в конкретных случаях, имеет рак или подозрение на наличие рака. Субъектом может быть любой организм или животное-субъект, которое является объектом способа или материала, включая млекопитающих, например, людей, лабораторных животных (например, приматов, крыс, мышей, кроликов), домашнего скота (например, коров, овец, коз, свиньи, индейки и куры), домашних животных (например, собак, кошек и грызунов), лошадей и трансгенных животных, отличных от человека. Субъектом может быть пациент, например, имеющий заболевание или с подозрением на наличие заболевания (которое может называться патологическим состоянием), такого как доброкачественные или злокачественные новообразования или рак. Субъект может проходить или уже прошел лечение. У субъекта могут отсутствовать симптомы заболевания. Субъектом могут быть здоровые индивидуумы, но желающие профильтровать рак. Термин «индивидуум» может использоваться взаимозаменяемо, по меньшей мере, в некоторых случаях. «Субъект» или «индивидуум», как используется в настоящем документе, может находиться или не находиться в медицинском учреждении и может проходить лечение амбулаторно в медицинском учреждении. Субъект может получать одну или более медицинских композиций через Интернет. Субъект может включать человека любого возраста или

животного, не являющегося человеком, и, следовательно, включает как взрослых, так и несовершеннолетних (т.е. детей) и младенцев, а также включает субъектов, находящихся в утробе матери. Не полагается, что данный термин означает необходимость медицинского лечения, поэтому человек может добровольно или невольно участвовать в экспериментах, будь то клинические испытания или фундаментальные научные исследования.

[0060] В рамках настоящего описания, термин «лечение» или «проводить лечение» включает любое благоприятное или желательное воздействие на симптомы или патологию заболевания или патологического состояния и может включать даже минимальное снижение одного или более измеримых маркеров заболевания или патологического состояния, например, рака. Лечение может включать необязательно либо снижение или облегчение симптомов заболевания или патологического состояния, либо замедление прогрессирования заболевания или патологического состояния. «Лечение» не обязательно означает полную эрадикацию или излечение заболевания или патологического состояния или связанных с ним симптомов.

[0061] Любой способ в контексте терапевтической, диагностической или физиологической цели или эффекта также может быть описан на языке формулы изобретения «применение», например «применение» любого соединения, композиции или агента, раскрытых в настоящем документе, для достижения или осуществления описанной терапевтической, диагностической или физиологической цели или эффекта.

[0062] Настоящее изобретение относится к способам и композициям, предназначенным для лечения TROP-2-положительных злокачественных заболеваний, в частности, с использованием адоптивной клеточной терапии, нацеленной на TROP-2-положительные опухолевые клетки. В конкретных вариантах осуществления сконструированные иммунные клетки млекопитающих любого типа (включая, по меньшей мере, NK-клетки человека) создают для нацеливания на TROP-2-положительный рак. Настоящее изобретение относится к сконструированному рецептору любого типа (включая химерный антигенный рецептор (CAR)), который нацелен на TROP-2. В конкретных вариантах осуществления обеспечивается ряд новых экспрессирующих конструкций, включая ретровирусные конструкции, которые экспрессируют TROP-2-нацеленный внеклеточный домен (включая антигенсвязывающий домен или его участок из анти-TROP-2 антитела, такого как mRS7 или hRS7), используемые в CAR и, в некоторых случаях, которые также экспрессируют один или более цитокинов, таких как IL15, и/или один или более продуктов «суицидного» гена, таких как каспаза 9. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой слитую конструкцию из scFV из антитела RS7 и одного или более дополнительных доменов (например, трансмембранного домена, внутриклеточного домена).

II. Генетически сконструированные рецепторы

[0063] Иммунные клетки по настоящему изобретению могут быть генетически сконструированы для экспрессии одного или более антигенсвязывающих рецепторов, нацеленных на TROP-2, таких как сконструированные CAR или, альтернативно,

сконструированные TCR. Например, иммунные клетки могут представлять собой иммунные клетки, модифицированные для экспрессии CAR и/или TCR, обладающих антигенной специфичностью для TROP-2. Другие CAR и/или TCR могут экспрессироваться теми же клетками, что и клетки, экспрессирующие TROP-2 антигенный рецептор, и они могут быть нацелены на разные антигены. В некоторых аспектах иммунные клетки сконструированы таким образом, чтобы экспрессировать TROP-2-специфический CAR или TROP-2-специфический TCR с использованием технологии «knock-in» CAR или TCR с использованием технологии CRISPR/Cas.

[0064] Подходящие способы модификации клеток известны в данной области. См., например, Sambrook and Ausubel, выше. Например, клетки можно трансдуцировать для экспрессии CAR или TCR, обладающих антигенной специфичностью для опухолевого антигена, с использованием методов трансдукции, описанных Heemskerk et al., 2008 и Johnson et al., 2009.

[0065] В некоторых вариантах осуществления клетки содержат одну или более нуклеиновых кислот, введенных с использованием генной инженерии, которые кодируют один или более рецепторов, нацеленных на антиген (по меньшей мере, один из которых нацелен на TROP-2), и генно-инженерные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, т.е. обычно отсутствуют в клетке или образце, полученном из клетки, например, в образце, полученном из другого организма или клетки, который, например, обычно не обнаруживается в сконструированной клетке и/или организме, из которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты не встречаются в природе, например, нуклеиновые кислоты, не встречающиеся в природе (например, химерные).

[0066] Иллюстративные антигенные рецепторы, включая CAR и рекомбинантные TCR, а также способы конструирования и введения рецепторов в клетки, включают описанные, например, в публикациях международных патентных заявок с номерами WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, в публикациях заявок на патент США с номерами US2002131960, US2013287748, US20130149337, в патентах США с номерами: 6451995, 7446190, 8252592, 8339645, 8398282, 7446179, 6410319, 7070995, 7265209, 7354762, 7446191, 8324353 и 8479118, а также в заявке на европейский патент с номером EP2537416, и/или описанные в публикациях Sadelain et al., 2013; Davila et al., 2013; Turtle et al., 2012; Wu et al., 2012. В некоторых аспектах сконструированные антигенные рецепторы включают CAR, как описано в патенте США № 7446190, и рецепторы, описанные в публикации международной патентной заявки WO/2014055668 A1.

А. Химерные антигенные рецепторы

[0067] В конкретных вариантах осуществления используется TROP-2-специфический CAR, который содержит, по меньшей мере: а) один или более внутриклеточных сигнальных доменов, б) трансмембранный домен и с) внеклеточный

домен, содержащий, по меньшей мере, один антигенсвязывающий участок, который нацелен, в том числе специфически связывает, на TROP-2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок представляет собой антитело или его функциональный фрагмент. В других случаях антигенсвязывающий участок CAR не является антителом или его функциональным фрагментом (например, лигандом TROP-2). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит часть мышинового антитела RS7. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок представляет собой scFv из мышинового антитела RS7. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит часть гуманизированного антитела RS7. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок представляет собой scFv из гуманизированного антитела RS7. В настоящем документе «антитело RS7» включает мышинное антитело RS7 (mRS7) и гуманизированное антитело RS7 (hRS7); такие антитела описаны, например, в публикации Stein et al., *Cancer Res.* 50: 1330 (1990) и патенте США № 8574575, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0068] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит часть мышинового антитела 2G10. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок представляет собой scFv из мышинового антитела 2G10. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит часть гуманизированного антитела 2G10. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок представляет собой scFv из гуманизированного антитела 2G10. В настоящем документе «антитело 2G10» включает мышинное антитело 2G10 (m2G10) и гуманизированное антитело 2G10 (h2G10; также «Hu2G10» или «Hu-2G10»); такие антитела описаны, например, в патенте США № 10501555, включенном в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0069] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит часть мышинового антитела 2EF. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок представляет собой scFv из мышинового антитела 2EF. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок содержит часть гуманизированного антитела 2EF. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий участок представляет собой scFv из гуманизированного антитела 2EF. В настоящем документе «антитело 2EF» включает мышинное антитело 2EF (m2EF) и гуманизированное антитело 2EF (h2EF; также «Hu2EF» или «Hu-2EF»); такие антитела описаны, например, в патенте США № 10501555, включенном в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0070] В некоторых вариантах осуществления TROP-2-специфический CAR связывается только с TROP-2, тогда как в других случаях CAR в виде отдельного полипептида является биспецифическим, поскольку содержит два или более антигенсвязывающих участка, один из которых связывается с TROP-2, и другой связывается с другим, неидентичным антигеном.

[0071] В некоторых вариантах осуществления сконструированные антигенные рецепторы включают CAR, включая активирующие или стимулирующие CAR или костимулирующие CAR (см. WO2014/055668). CAR обычно включают внеклеточный антиген (или лиганд), связывающий домен, связанный с одним или более внутриклеточными сигнальными компонентами, в некоторых аспектах через линкеры и/или трансмембранный домен(ы). Такие молекулы обычно имитируют или аппроксимируют сигнал через природный антигенный рецептор, сигнал через такой рецептор в сочетании с костимулирующим рецептором и/или сигнал через один костимулирующий рецептор.

[0072] Полагается, что химерную конструкцию можно ввести в иммунные клетки в виде «голой» ДНК или в виде подходящего вектора. В данной области известны способы стабильной трансфекции клеток посредством электропорации с использованием «голой» ДНК. См., например, патент США № 6410319. «Голая» ДНК обычно относится к ДНК, кодирующей химерный рецептор, содержащийся в плазмидном экспрессионном векторе в правильной ориентации для экспрессии.

[0073] Альтернативно, для введения химерной конструкции CAR в иммунные клетки можно использовать вирусный вектор (например, ретровирусный вектор, аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный вектор или лентивирусный вектор). Подходящие векторы для применения в соответствии со способом по настоящему изобретению не реплицируются в иммунных клетках. Известно большое количество векторов, основанных на вирусах, где число копий вируса, сохраняемого в клетке, является достаточно низким для поддержания жизнеспособности клетки, например, таких как векторы на основе ВИЧ, SV40, EBV, HSV или BPV.

[0074] Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к применению нуклеиновых кислот, включая нуклеиновые кислоты, кодирующие TROP-2-специфический полипептид CAR, включая в некоторых случаях CAR, гуманизированный для снижения иммуногенности (hCAR), содержащий, по меньшей мере, один внутриклеточный сигнальный домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен, содержащий один или более сигнальных мотивов. В некоторых вариантах осуществления TROP-2-специфический CAR может распознавать эпитоп, содержащий общее пространство между одним или более антигенами. В некоторых вариантах осуществления связывающая область может содержать определяющие комплементарность участки моноклонального антитела, вариабельные области моноклонального антитела и/или их антигенсвязывающие фрагменты. В другом варианте осуществления такая специфичность обусловлена пептидом (например, цитокином), который связывается с рецептором.

[0075] Полагается, что нуклеиновые кислоты TROP-2 CAR человека могут представлять собой человеческие гены, используемые для повышения эффективности клеточной иммунотерапии у пациентов-людей. В конкретном варианте осуществления изобретение включает полноразмерную кДНК или кодирующую область TROP-2-специфического CAR. Антигенсвязывающие участки или домены могут содержать

фрагмент цепей V_H и V_L одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), полученного из конкретного человеческого моноклонального антитела, например, описанного в патенте США № 7109304, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Фрагмент также может представлять собой любое число различных антигенсвязывающих доменов человеческого антигенспецифического антитела. В более конкретном варианте осуществления фрагмент представляет собой TROP-2-специфический scFv, закодированный последовательностью, оптимизированной для использования кодонов человека для экспрессии в клетках человека.

[0076] Структура может быть мультимерной, такой как диатело или мультимеры. Мультимеры, скорее всего, образуются путем перекрестного спаривания переменных доменов легкой и тяжелой цепей в диатела. Шарнирная область конструкции может иметь множество альтернатив: от полного удаления до сохранения первого цистеина, до замены пролина, а не серина, до усечения до первого цистеина. Часть Fc может быть делецирована. Для этой цели может служить любой стабильный и/или димеризующийся белок. Можно использовать только один из доменов Fc, например, домен CH2 или CH3 иммуноглобулина человека. Можно также использовать шарнир, области CH2 и CH3 человеческого иммуноглобулина, модифицированные для улучшения димеризации. Можно также использовать только шарнирную область иммуноглобулина. Можно также использовать участки CD8-альфа.

[0077] В некоторых вариантах осуществления TROP-2-специфический CAR сконструирован со специфичностью к TROP-2, например, к TROP-2, который экспрессируется на типе больных клеток. Таким образом, CAR обычно включает в своей внеклеточной области одну или более молекул, связывающихся с TROP-2, таких как один или более антигенсвязывающих фрагментов, доменов, переменных областей антитела и/или молекул антител любого типа. Пример нуклеиновой кислоты TROP-2 человека находится в базе данных GenBank® Национального центра биотехнологической информации под идентификационным номером NM_002353. Пример человеческого полипептида TROP-2 находится в GenBank® под идентификационным номером NP_002344. Специалисты в данной области способны генерировать антитела, включая анти-TROP-2 scFv, на основе информации, по меньшей мере, о полипептиде и рутинной практики, хотя в данной области уже имеются многочисленные анти-TROP-2 scFv и моноклональные антитела. В некоторых вариантах осуществления TROP-2-специфический scFv представляет собой scFv из одного или более клонов антител.

[0078] В некоторых вариантах осуществления TROP-2-специфический CAR включает антигенсвязывающий участок или участки молекулы антитела, такие как одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), полученный из переменной области тяжелой цепи (V_H) и переменной области легкой цепи (V_L) моноклонального антитела (mAb). В конкретных вариантах осуществления антитело или его функциональный фрагмент являются или получены из антитела RS7 (например, mRS7, hRS7), Pr1E11, TrMab-29 или датопотамаба. В некоторых вариантах осуществления антитело или его функциональный

фрагмент получены из антитела RS7 (например, mRS7, hRS7). В некоторых вариантах осуществления антитело или его функциональный фрагмент являются или получены из антитела 2G10 (например, m2G10, h2G10). В некоторых вариантах осуществления антитело или его функциональный фрагмент представляют собой антитело 2EF (например, m2EF, h2EF) или получены из него. Антитело также может быть антителом, которое генерируется *de novo* против TROP-2, и последовательность scFv может быть получена или происходить из таких антител *de novo*.

[0079] В некоторых вариантах осуществления анти-TROP-2 CAR содержит внеклеточный домен, который является или содержит лиганд TROP-2. В некоторых вариантах осуществления анти-TROP-2 CAR содержит внеклеточный домен, который представляет собой или содержит VH и/или VL анти-TROP-2 антитела. В конкретных вариантах осуществления анти-TROP-2 CAR содержит VH и VL антитела RS7. В некоторых вариантах осуществления анти-TROP-2 CAR содержит внеклеточный домен, содержащий SEQ ID NO:9. В некоторых вариантах осуществления анти-TROP-2 CAR содержит внеклеточный домен, содержащий SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления анти-TROP-2 CAR содержит внеклеточный домен, содержащий SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:14. В некоторых вариантах осуществления анти-TROP-2 CAR содержит внеклеточный домен, содержащий SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления анти-TROP-2 CAR содержит внеклеточный домен, содержащий SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах осуществления анти-TROP-2 CAR содержит внеклеточный домен, содержащий SEQ ID NO:10 и SEQ ID NO:15. В некоторых вариантах осуществления анти-TROP-2 CAR содержит VH и/или VL антитела 2G10. В некоторых вариантах осуществления анти-TROP-2 CAR содержит VH и/или VL антитела 2EF.

[0080] Последовательность открытой рамки считывания, кодирующей химерный рецептор, может быть получена из источника геномной ДНК, источника кДНК, или может быть синтезирована (например, посредством ПЦР) или их комбинации. В зависимости от размера геномной ДНК и числа интронов может быть желательно использовать кДНК или их комбинацию, поскольку обнаружено, что интроны стабилизируют мРНК. Кроме того, также может быть преимущественно использовать эндогенные или экзогенные некодирующие области для стабилизации мРНК.

[0081] В некоторых аспектах антигенспецифический связывающий компонент или компонент распознавания связан с одним или более трансмембранными и внутриклеточными сигнальными доменами. В некоторых вариантах осуществления CAR включает трансмембранный домен, слитый с внеклеточным доменом CAR. В одном варианте осуществления используется трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен выбирают или модифицируют посредством аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же или других поверхностных мембранных белков, для минимизации взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса. Трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления

получен из природного или из синтетического источника. Если источник является природным, то домен в некоторых аспектах происходит из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают области, полученные из (т.е. содержащие по меньшей мере трансмембранную область(и)) альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, DAP12, DAP10, NKG2D, CD3-дзета, CD3-эпсилон, CD3-гамма, CD3 дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, ICOS/CD278, GITR/CD357 и т.д. Альтернативно, трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления является синтетическим. В некоторых аспектах синтетический трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах на каждом конце синтетического трансмембранного домена обнаруживается триплет из фенилаланина, триптофана и валина.

[0082] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота TROP-2 CAR содержит последовательность, кодирующую другие костимулирующие рецепторы, такие как трансмембранный домен и один или более внутриклеточных сигнальных доменов. В дополнение к первичному сигналу активации Т-клеток, например, который может быть инициирован CD3 ξ и/или Fc ϵ RI γ , может быть использован дополнительный стимулирующий сигнал для пролиферации и эффекторной функции иммунных эффекторных клеток после взаимодействия химерного рецептора с антигеном-мишенью. Например, можно использовать часть или весь костимулирующий рецептор человека для усиленной активации клеток, что может способствовать повышению сохранности *in vivo* и повышению терапевтической эффективности адоптивной иммунотерапии. Примеры включают костимулирующие домены из таких молекул, как DAP12, DAP10, NKG2D, CD2, CD28, CD27, 4-1BB, (CD137), OX40, ICOS, (CD278), CD30, HVEM, CD40, LFA-1 (CD11a/CD18) и/или ICAM-1, хотя в конкретных альтернативных вариантах осуществления любой из них может быть исключен из использования в CAR.

[0083] В некоторых вариантах осуществления платформенные технологии, раскрытые здесь, для генетической модификации иммунных клеток, таких как НК-клетки, включают: (i) невирусный перенос генов с использованием устройства для электропорации (например, нуклеофектора), (ii) CAR, которые передают сигнал через эндодомены (например, CD28/CD3- ξ , CD137/CD3- ξ или другие комбинации), (iii) CAR с варьирующей длиной внеклеточных доменов, соединяющих домен распознавания TROP-2 с поверхностью клетки, и, в некоторых случаях, (iv) искусственные антигенпрезентирующие клетки (aAPC), полученные из K562, способные эффективно и количественно экспандировать CAR⁺ иммунные клетки (Singh et al., 2008; Singh et al., 2011).

В. Примеры конкретных вариантов осуществления CAR

[0084] В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к TROP-2-специфическим молекулам CAR. В некоторых случаях связывающий домен TROP-2 CAR представляет собой scFv, и в данном случае можно использовать любой scFv, который связывается с TROP-2. В некоторых случаях TROP-2-связывающий домен CAR

представляет собой связывающий домен из лиганда TROP-2, и здесь можно использовать любой домен, который связывается с TROP-2. В случаях, когда анти-TROP-2 scFv используется во внеклеточном домене CAR, то переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи scFv могут располагаться в любом порядке в направлении от N-конца к C-концу. Например, переменная область тяжелой цепи может находиться на N-концевой стороне переменной области легкой цепи или наоборот. scFv и/или лиганд, который связывает TROP-2 в CAR, может быть кодон-оптимизированным или нет. В конкретных вариантах осуществления вектор кодирует TROP-2-специфический CAR, и также кодирует одну или более других молекул. Например, вектор может кодировать TROP-2-специфический CAR, и также может кодировать другой представляющий интерес белок, такой как другой сконструированный антигенный рецептор, «суицидный» ген и/или конкретный цитокин.

[0085] В одной и той же молекуле TROP-2-специфического CAR может находиться один или более антигенспецифических внеклеточных доменов, специфический шарнир, специфический трансмембранный домен, один или более специфических костимулирующих доменов и один или более специфических сигналов активации. Когда используется более одного антигенспецифического внеклеточного домена, например, для нацеливания на два разных антигена (один из которых представляет собой TROP-2), то между двумя антигенспецифическими внеклеточными доменами может находиться линкер.

[0086] В конкретных вариантах осуществления конкретных молекул CAR в CAR может использоваться DAP10, DAP12, 4-1BB, NKG2D или другие костимулирующие домены (которые могут называться в настоящем документе интрацитоплазматическим доменом). В некоторых случаях CD3-дзета используется без каких-либо костимулирующих доменов. В конкретных вариантах осуществления конкретных молекул CAR, в CAR может использоваться любой подходящий трансмембранный домен, например, из DAP12, DAP10, 4-1BB, 2B4, OX40, CD27, NKG2D, CD8 или CD28.

[0087] В конкретных вариантах осуществления существует экспрессирующая конструкция, содержащая последовательность, которая кодирует конкретный TROP-2-специфический сконструированный рецептор.

[0088] Примеры конкретных вариантов осуществления последовательностей представлены ниже.

1. Антигенспецифические внеклеточные домены

[0089] Примеры конкретных вариантов осуществления последовательностей представлены ниже.

[0090] В конкретных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность внеклеточного домена анти-TROP-2 представляет собой следующее:

```
GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG
AGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTATTGCTGTAGCCTGGTATCA
GCAGAAACCAGGGAAAGCCSCTAAGCTCCTGATCTACTCGGCATCCTACCGGTACA
CTGGAGTCCCTGATAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA
```

TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAACATTATATTA
 CTCCGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTTTGGAAATAAAG
 GGCTCTACAAGCGGCTCAGGAAAACCTGGATCAGGCGAAGGGTCTACGCAGGTCCA
 ACTGCAGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTG
 CAAGGCTTCTGGATACACCTTCACAACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCC
 CTGGACAAGGGCTTAAATGGATGGGCTGGATAAACACCTACACTGGAGAGCCAACA
 TATACTGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACG
 GCATATCTCCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGACGACACTGCCGTGTATTTCTGTGCA
 AGAGGGGGGTTTCGGTAGTAGCTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAAGGGTCCCT
 GGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:43)

ATGGAGTTCGGCTTGAGTTGGTTGTTTCCTTGTGGCGATACTCAAAGGCGTTCA
 ATGTCAAGTGCAGCTCGTCCAGTCTGGAGCTGAAGTCAAAAAGCCTGGGGCTTCAG
 TGAAAGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTTCACCTTCAGCAGTAGCTATATCAGTTGGT
 TGAGGCAGGCCCTGGACAGAGACTTGAGTGGATTGCATGGATTTATGCTGGA
 ACTGGCGGAACTAGCTATAATCAGAAGTTCACAGGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAC
 ATCCGCCAGCACAGCCTACATGGA
 ACTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCCG
 TCTATTACTGTGCAAGACATAACCCTCGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAG
 GAACCACAGTCACCGTCTCCTCATTGGAAATAAAGGGCTCTACAAGCGGCTCAGGA
 AAACCTGGATCAGGCGAAGGGTCTACGGACACCCAGATGACCCAGTCTCCAAGCTC
 CCTGTCCGCCAGCGTGGGAGATAGAGTCACCATCACATGCATCACCAGCACTGATAT
 TGATGATGATATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGA
 TTTCAGAAGGCAATACTCTGCGCCCTGGAGTCCCATCCCGATTCTCCGGCAGTGGCT
 ATGGAACAGATTTTACCTTTACAATTAGCTCCCTGCAGCCAGAAGATATTGCAACCT
 ACTACTGTTTGCAAAGTGATAACCTGCCCTACACCTTCGGAGGGGGGACCAAAGTC
 GAAATCAAA (SEQ ID NO:45)

ATGGAGTTCGGCTTGAGTTGGTTGTTTCCTTGTGGCGATACTCAAAGGCGTTCA
 ATGTCAAGTGCAGCTCGTCCAGTCTGGAGCTGAAGTCAAAAAGCCTGGGGCTTCAG
 TGAAAGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTTCACCTTCAGCAGTAGCTATATCAGTTGGT
 TGAGGCAGGCCCTGGACAGAGACTTGAGTGGATTGCATGGATTTATGCTGGA
 ACTGGCGGAACTAGCTATAATCAGAAGTTCACAGGCAAGGTCACACTGACTGTAGACAC
 ATCCGCCAGCACAGCCTACATGGA
 ACTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCCG
 TCTATTACTGTGCAAGACATAACCCTCGTTACTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAG
 GAACCACAGTCACCGTCTCCTCATTGGAAATAAAGGGCTCTACAAGCGGCTCAGGA
 AAACCTGGATCAGGCGAAGGGTCTACGGACACCCAGATGACCCAGTCTCCAAGCTC
 CCTGTCCGCCAGCGTGGGAGATAGAGTCACCATCACATGCATCACCAGCACTGATAT
 TGATGATGATATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGA
 TTTCAGAAGGCAATACTCTGCGCCCTGGAGTCCCATCCCGATTCTCCGGCAGTGGCT
 ATGGAACAGATTTTACCTTTACAATTAGCTCCCTGCAGCCAGAAGATATTGCAACCT
 ACTACTGTTTGCAAAGTGATAACCTGCCCTACACCTTCGGAGGGGGGACCAAAGTC
 GAAATCAAA (SEQ ID NO:47)

ATGGAGTTCGGCTTGAGTTGGTTGTTTCCTTGTGGCGATACTCAAAGGCGTTCA
 ATGTCAAGTCCAGCTCGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCTTCAG
 TGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCTACTAATACTACTGGATCGGATGGG
 TCAAACAGGCCCCTGGACAGGGCCTCGAGTGGATTGGAGATATTTACCCTGGAGGA
 GGCTATACTAATACTACAATGAGAAGTTC AAGGGCAGAGCCACACTGACTGCAGACAC
 ATCCGCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCCG
 TGTATTACTGTGCAAGAGGAACTGGAGGGCGGAGACTACTGGGGCCAAGGGACTCTG
 GTCACTGTCTCTTCATTGGAATAAAGGGCTCTACAAGCGGCTCAGGAAAACCTGG
 ATCAGGCGAAGGGTCTACGGACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGACTCCCTGGCTGT
 GTCTCTGGGGGAGAGGGCCACCATCAACTGCAGGGCCAGCCAAAGTGTGAGTACAT
 CTAGCTATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTC
 CTCATCAAGTATGCATCCAACCTGGAATCTGGGGTCCCTGACAGATTCAGTGGCAGT
 GGGTCTGGGACAGACTTCACCCTACCATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGC
 AGTCTATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCCTACACCTTCGGAGGCGGGACCAA
 GCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:49)

[0091] Любой полинуклеотид по настоящему изобретению может содержать SEQ ID NO: 43, 45, 47 или 49, или последовательность, которая, по меньшей мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична SEQ ID NO: 43, 45, 47 или 49.

[0092] Примеры аминокислотных последовательностей внеклеточного домена анти-TROP-2 представляют собой следующие:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
 TGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKRLEIKGSTS
 GSGKPGSGEGSTQVQLQQSGSELKPKGASVKVSKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGL
 KWMGWINTYTGEPYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSS
 YWYFDVWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:19)

MEFGLSWLFLVAILKGVQCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFSSSYIS
 WLRQAPGQRLEWIAWIYAGTGGTSYNQKFTGKATLTVDTSASTAYMELSSLRSEDYAV
 YYCARHNPRYYAMDYWGQGTITVTVSSLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTDTQMTQSPSSLS
 ASVGDRVTITCITSTDIDDDMNWYQQKPGKAPKLLISEGNTLRPGVPSRFSGSGYGTDF
 FTISSLQPEDIATYYCLQSDNLPYTFGGGKVEIKR (SEQ ID NO:44)

MEFGLSWLFLVAILKGVQCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFSSSYIS
 WLRQAPGQRLEWIAWIYAGTGGTSYNQKFTGRVTLTVDTSASTAYMELSSLRSEDYAV
 YYCARHNPRYYAMDYWGQGTITVTVSSLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTDTQMTQSPSSLS
 ASVGDRVTITCITSTDIDDDMNWYQQKPGKAPKLLISEGNTLRPGVPSRFSGSGYGTDF
 FTISSLQPEDIATYYCLQSDNLPYTFGGGKVEI (SEQ ID NO:46)

PMEFGLSWLFLVAILKGVQCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYW
 IGWVKQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYNEKFKGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDY
 AVYYCARGTGGGDYWGQGLVTVSSLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTDIVLTQSPDSLAVS
 LGERATINCRASQSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPDRFSGSGSGT
 DFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSWEIPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:48)

[0093] Любой полипептид по настоящему изобретению может содержать SEQ ID NO: 19, 44, 46 или 48, или последовательность, которая, по меньшей мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична SEQ ID NO: 19, 44, 46 или 48.

[0094] В конкретных примерах область анти-TROP-2 антитела (например, RS7, 2G10, 2EF), которая используется в молекуле CAR, содержит, состоит из или состоит по существу из аминокислот 1-50, 1-51, 1-52, 1-53, 1-54, 1-55, 1-56, 1-57, 1-58, 1-59, 1-60, 1-61, 1-62, 1-63, 1-64, 1-65, 1-66, 1-67, 1-68, 1-69, 1-70, 1-71, 1-72, 1-73, 1-74, 1-75, 1-76, 1-77, 1-78, 1-79, 1-80, 1-81, 1-82, 1-83, 1-84, 1-85, 1-86, 1-87, 1-88, 1-89, 1-90, 1-91, 1-92, 1-93, 1-94, 1-95, 1-96, 1-97, 1-98, 1-99, 1-100, 1-101, 1-102, 1-103, 1-104, 1-105, 1-106, 1-107, 1-108, 1-109, 1-110, 1-111, 1-112, 1-113, 1-114, 1-115, 1-116, 1-117, 1-118, 1-119, 1-120, 1-121, 1-122, 1-123, 1-124, 1-125, 1-126, 1-127, 1-128, 1-129, 1-130, 1-131, 1-132, 1-133, 1-134, 1-135, 1-136, 1-137, 1-138, 1-139, 1-140, 1-141, 1-142, 1-143, 1-144, 1-145, 1-146, 1-147, 1-148, 1-149, 1-150, 1-151, 1-152, 1-153, 1-154, 1-155, 1-156, 1-157, 1-158, 1-159, 1-160, 1-161, 1-162, 1-163, 1-164, 1-165, 1-166, 1-167, 1-168, 1-169, 1-170, 1-171, 1-172, 1-173, 1-174, 1-175, 1-176, 1-177, 1-178, 1-179, 1-180, 1-181, 1-182, 1-183, 1-184, 1-185, 1-186, 1-187, 1-188, 1-189, 1-190, 1-191, 1-192, 1-193, 1-194, 1-195, 1-196, 1-197, 1-198, 1-199, 1-200, 1-201, 1-202, 1-203, 1-204, 1-205, 1-206, 1-207, 1-208, 1-209, 1-210, 1-211, 1-212, 1-213, 1-214, 1-215, 1-216, 1-217, 1-218, 1-219, 1-220 или всех из SEQ ID NO: 9, 10, 14, 15, 19, 44, 46 и/или 48; в конкретных вариантах осуществления такие аминокислоты в этих диапазонах являются последовательными. В некоторых вариантах осуществления используется участок SEQ ID NO: 9, 10, 14, 15, 19, 44, 46 и/или 48, который имеет усечение на N-конце, например, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 аминокислот или более от N-конца. В некоторых случаях имеет место усечение на этом N-конце 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 аминокислот или более, и имеется усечение на C-конце.

2. Трансмембранные домены

[0095] Любой подходящий трансмембранный домен может быть использован в TROP-2-специфическом CAR по настоящему изобретению. Примеры включают, по меньшей мере, трансмембранные домены из DAP10, DAP12, CD28, NKG2D, CD3-эпсилон, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 или CD154, из альфа (α)-цепи или бета (β)-цепи T-клеточного рецептора, из дзета (ζ)-цепи CD3, из ICOS, их функциональных производных и их комбинаций. В определенных случаях используется трансмембранный домен из DAP10, DAP12, CD28, CD8 или NKG2D. Можно использовать примеры следующих конкретных последовательностей трансмембранных доменов, а именно:

[0096] Аминокислотная последовательность трансмембранного домена CD27:

[0097] ILVIFSGMFLVFTLAGALFLH (SEQ ID NO:22)

[0098] Аминокислотная последовательность трансмембранного домена CD28:

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO:23)

[0099] Аминокислотная последовательность трансмембранного домена CD8:

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT (SEQ ID NO:24)

[0100] Аминокислотная последовательность трансмембранного домена 4-1BB:
HISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVV (SEQ ID NO:25)

[0101] Аминокислотная последовательность трансмембранного домена DAP10:
LLAGLVAADAVASLLIVGAVF (SEQ ID NO:26)

[0102] Аминокислотная последовательность трансмембранного домена DAP12:
GVLGIVMGDLVLTVLIALAV (SEQ ID NO:27)

[0103] Аминокислотная последовательность трансмембранного домена NKG2D:
AVMIIFRIGMAVAIFCCFFFP (SEQ ID NO:28)

[0104] Любой полипептид по настоящему изобретению может содержать SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 или последовательность, которая, по меньшей мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, , 97, 98, 99% или более идентична SEQ ID NO: 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28.

3. Внутриклеточные домены

[0105] Один или более внутриклеточных доменов (которые также могут называться здесь как домены активации сигнала или костимулирующие домены) могут использоваться в специфических анти-TROP-2 CAR по настоящему изобретению или нет. Конкретные примеры включают внутриклеточные домены из CD3-дзета, 4-1BB, NKG2D, OX-40, CD27, DAP10, DAP12, B7-1/CD80, CD28, 2B4, 4-1BBL, B7-2/CD86, CTLA-4, B7-H1/PD-L1, ICOS, B7-H2, PD-1, B7-H3, PD-L2, B7-H4, PDCD6, BTLA или их комбинации.

[0106] Примерами конкретных внутриклеточных доменов, которые можно использовать в CAR по настоящему изобретению, являются следующие:

[0107] Пример аминокислотной последовательности внутриклеточного домена CD3-дзета:

[0108]

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRG
(SEQ ID NO:29)

[0109] Аминокислотная последовательность внутриклеточного домена 4-1BB:
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO:30)

[0110] Аминокислотная последовательность внутриклеточного домена DAP10:
LCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG (SEQ ID NO:31)

[0111] Аминокислотная последовательность внутриклеточного домена DAP12:
YFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK
(SEQ ID NO:32)

[0112] Аминокислотная последовательность внутриклеточного домена NKG2D:
SANERCKSKVPCRQKQWRTSFDSKLDLNYNHFESMEWSHRSRRGRIWGM
(SEQ ID NO:33)

[0113] Любой полипептид по настоящему изобретению может содержать SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32 или 33 или последовательность, которая, по меньшей мере, на 70, 75, 80,

85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32 или 33.

4. Шарнирная область

[0114] В некоторых вариантах осуществления в CAR имеется шарнирная область между одним или более внеклеточными антигенсвязывающими доменами и трансмембранным доменом. В конкретных вариантах осуществления шарнир имеет определенную длину, например, такую как 10-20, 10-15, 11-20, 11-15, 12-20, 12-15 или 15-20 аминокислот в длину. Шарнирная область может представлять собой любой подходящий шарнир и в некоторых случаях включает шарнир из IgG или CD28. В конкретных вариантах осуществления шарнирная область представляет собой небольшой гибкий полипептид, который соединяет домены CH2-CH3 и CH1 IgG Fc. Например, можно использовать шарнир CH2-CH3 (частично или весь) из различных подклассов IgG (IgG14, модифицированный или нет). Однако в некоторых случаях весь шарнир CH2-CH3 не используется, а вместо этого используется часть шарнира (например, сам CH3 или сама часть CH3). В конкретных вариантах осуществления используется шарнирная область CH2-CH3, полученная из IgG1, и в некоторых случаях используется вся шарнирная область CH2-CH3 (все 229 аминокислот), используется только шарнир CH3 (119 аминокислот) или короткий шарнир (12 аминокислот).

[0115] В конкретных случаях можно изменить идентичность или длину спейсера и/или шарнира для оптимизации эффективности CAR. См., например, Hudecek et al. (2014) и Джонналагадда и др. (2015). В конкретных вариантах осуществления в TROP-2 CAR используется, например, шарнир IgG4+CH3 или стебель CD8a.

[0116] Таким образом, в конкретных вариантах осуществления используемая шарнирная область IgG обычно представляет собой IgG1 или IgG4, и в некоторых случаях CAR содержит домен CH2-CH3 IgG Fc. Использование домена IgG Fc может обеспечить гибкость CAR, имеющего низкую иммуногенность, что облегчит детектирование экспрессии CAR с использованием анти-Fc реагентов и позволит удалить один или более модулей CH2 или CH3 для размещения спейсеров различной длины. Однако в одном варианте осуществления мутации в некоторых спейсерах, позволяющие избежать связывания Fc γ R, могут улучшить «приживание» CAR⁺ Т-клеток и противоопухолевую эффективность, чтобы избежать связывания, например, с растворимыми и клеточными Fc гамма-рецепторами, но при этом сохранить активность, опосредующую антигенспецифический лизис. Например, можно использовать спейсеры IgG4-Fc, которые были модифицированы в области CH2. Например, область CH2 может быть мутирована, посредством точечных мутаций и/или делеций. Специфические модификации были продемонстрированы в двух сайтах (L235E; N297Q) в области CH2 и/или включают делецию CH2 (Jonnalagadda et al, 2015). В конкретных вариантах осуществления можно использовать домен шарнир-CH2-CH3 IgG4 (длиной 229 аминокислот) или только шарнирную область (длиной 12 аминокислот) (Hudecek et al., 2015).

[0117] В конкретных вариантах осуществления шарнирная область представляет собой шарнир из IgG, CD28, CD-8 альфа, 4-1BB, OX40, CD3-дзета, альфа-цепи или бета-

цепи Т-клеточного рецептора, дзета-цепи CD3, CD28, CD3ε, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS или CD154.

[0118] Примеры конкретных последовательностей шарниров, которые можно использовать, включают, по меньшей мере, следующее:

[0119] Аминокислотная последовательность шарнира IgG:

TVT VSSQDPAERKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
(SEQ ID NO:34)

[0120] Аминокислотная последовательность шарнира CD28:

IEVMYPPPYLDNEKSNGTPIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKP (SEQ ID NO:35)

[0121] Аминокислотная последовательность шарнира CD8α:

SCLCSCPPSPPPPLPLDLPPQPQQSPASLCPCGPKPVDLLPAEPCTPEAWISPA (SEQ
ID NO:36)

[0122] Любой полипептид по настоящему изобретению может содержать SEQ ID NO: 34, 35 или 36, или последовательность, которая, по меньшей мере, на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентична SEQ ID NO: 34, 35 или 36.

5. Другие белки

[0123] В некоторых вариантах осуществления один или более других белков используются с анти-TROP-2 CAR по настоящему изобретению. Один или более других белков можно использовать по любой причине, в том числе для повышения эффективности самого CAR и/или клеток любого типа, экспрессирующих CAR. В некоторых случаях другой белок облегчает лечение субъекта, получающего клетки, экспрессирующие CAR, в качестве терапии, независимо от того, влияет ли другой белок(и) прямо или косвенно на активность CAR или клеток. В некоторых случаях другой белок представляет собой продукт «суицидного» гена, один или более цитокинов или и то, и другое. В конкретных вариантах осуществления один или более других белков получают из вектора и в конечном итоге получают в виде двух отдельных полипептидов. Например, CAR анти-TROP-2 и другой белок(и) могут быть разделены, например, последовательностью 2A или IRES.

[0124] В конкретных вариантах осуществления цитокин, такой как IL-15, используется в сочетании с анти-TROP-2 CAR.

[0125] Аминокислотная последовательность IL-15:

ISKPHLR SISIQCYLCLLNSHFLTEAGIHV FILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKI
EDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDVTENLILANNS
LSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:37)

[0126] В конкретных вариантах осуществления продукт «суицидного» гена, такой как каспаза 9 (например, индуцибельная каспаза 9), используется в сочетании с анти-TROP-2 CAR.

[0127] Пример аминокислотной последовательности каспазы 9:

MLEGVQVETISPGDGRTFPRKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKVDSSRDRNKPFKFML
 GKQEVIRGWEEGVAQMSVGRRAKL TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESG
 GSGVDGFGDVGALSLRGNADLAYILSMPCGHCLINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCE
 KLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF
 PGAVYGTGDCPVSVKEIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTPEDE
 SPGSNPEPDATPFQEGLRTRFDQLDAISSLPTSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETL
 DDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSAS (SEQ ID
 NO: 42)

[0128] В случаях, когда CAR и другой белок в одном и том же векторе предназначены для получения двух разных полипептидов, то можно использовать специфическую последовательность 2A.

[0129] Аминокислотная последовательность E2A, который можно использовать, представляет собой следующее:

QCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 38)

[0130] Могут быть использованы и другие примеры 2A:

[0131] T2A: EGRGSLTTCGDVEENPGP (SEQ ID NO:39)

[0132] P2A: ATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO:40)

[0133] F2A: VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO:41)

[0134] Настоящее изобретение также относится к специфическим молекулам CAR, в том числе для экспрессии в иммунных эффекторных клетках любого типа.

[0135] В векторе CAR может экспрессироваться с помощью IL-15, например, который может быть отделен от CAR последовательностью 2A. В конкретном примере такая конструкция CAR и IL-15 может иметь следующую нуклеотидную последовательность:

[0136] **iC9mRs7VLVH28H28z15**

ATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGCGACGGGCGCACCT
 TCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCACCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGA
 AAGAAAGTTGATTCCTCCCGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAA
 GCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTGAG
 AGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGC
 ATCATCCCACCATGCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAAGTGGAAATCT
 GGCGGTGGATCCGGAGTCGACGGATTTGGTGTGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGG
 GGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATT
 ATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAAC
 ATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTG
 AAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCA
 GGACCACGGTGTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGC
 CAGCCACCTGCAGTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTGGT
 CGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGC
 CCAAGCTCTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGATCATGGGTTTGAGG

TGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCA
CCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGC
CCACACCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCTGGAG
GGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGT
GGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG
TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAAAAACTTT
TCTTTAAAACATCAGCTTCGCGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGG
GACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTG
GCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGCTCTAGAG_{ag}GACATTCAGCTGACCCAGTCTCACA
AATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAG
GATGTGAGTATTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTA
CTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGT
GGATCTGGGACGGATTTCACTTTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCA
GTTTATTACTGTCAGCAACATTATATTACTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAG
CTGGAGCTGAAACGGTTGGAAATAAAGGGCTCTACAAGCGGCTCAGGAAAACCTGG
ATCAGGCCAAGGGTCTACGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGAGCTGAAGAAGC
CTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGATATACCTTCACAACTATG
GAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATA
AACACCTACACTGGAGAGCCAACATATACTGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTC
TCTTTGGAAACCTCTGCCACCACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAGTGAG
GACATGGCTACATATTTCTGTGCAAGAGGGGGGTTCCGGTAGTAGCTACTGGTACTTC
GATGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA_cCGTACGCCATTGAAGTT
ATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTG
AAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCAAATTT
TGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTG
GCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTAC
ATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCC
CCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCACGCGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGA
CGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGAC
GAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGG
GGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAA
GATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGG
GCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTAC
GACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCT
CTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAA
GCCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCA
CTTCTGACCGAGGCCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTACAGCGCCGGACT
GCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAG
GACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCA
CCCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGA_{ACT}GCAGGTGATCAG

CCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGG
 CCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTG
 CGAGGAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCG
 TGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:1)

[0137] Соответствующая аминокислотная последовательность
 iC9mRs7VLVH28H28z15 является следующей:

MLEGVQVETISPGDGRTFPRKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFFKML
 GKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKL TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESG
 GSGVDGFGDVGALSLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCE
 KLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF
 PGAVYGTGCPVSVKEIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTPEDE
 SPGSNPEPDATPFQEGLRFTDQLDAISSLPTSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETL
 DDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRAEGRGSL
 LTCGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAILKGVQCSREDIQLTQSHKFMSTSVGDRVSITCKAS
 QDVSI AVAWYQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVY
 YCQQHYITPLTFGAGTKLELKRLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTVKLQESGPELKKPGETVKI
 SCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLETSAT
 TAYLQINNLKSEDMATYFCARGGFGSSYWFVDVWGQGTTVTVSSPYAIEVMYPPPYLD
 NEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPKFWLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKR
 SRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY
 NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
 ERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPM
 RISKPHLRSISIQCYLCLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLI
 QSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDVTENLILANNSLSSN
 GNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:2)

[0138] **iC9mRS7VHVL28H28icz15**

ATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGCGACGGGCGCACCT
 TCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGC ACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGA
 AAGAAAGTTGATTCCTCCCGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAA
 GCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTGCCAGATGAGTGTGGGTCAG
 AGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGC
 ATCATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAA ACTGGAATCT
 GGCGGTGGATCCGGAGTCGACGGATTTGGTGTATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGG
 GGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATT
 ATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAAC
 ATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTG
 AAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCA
 GGACCACGGTGTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGC
 CAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTGGT
 CGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGC

CCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGATCATGGGTTTGAGG
TGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCA
CCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGC
CCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCAGGTTTTGTTTCCTGGAG
GGACCCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGT
GGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG
TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCCTCCGGAAAAAACTTT
TCTTTAAAACATCAGCTTCGCGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGG
GACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTG
GCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGCTCTAGAGagGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGACCT
GAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGATATAC
CTTCACAAACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGT
GGATGGGCTGGATAAACACCTACACTGGAGAGCCAACATATACTGATGACTTCAAG
GGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCACCACTGCCTATTTGCAGATCAAC
AACCTCAAAGTGAGGACATGGCTACATATTTCTGTGCAAGAGGGGGGTTTCGGTAG
TAGCTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCATT
GGAAATAAAGGGCTCTACAAGCGGCTCAGGAAAACCTGGATCAGGCGAAGGGTCTA
CGGACATTCAGCTGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGG
GTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTATTGCTGTAGCCTGGTATCAA
CAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACACT
GGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACTTTCACCATC
AGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAACATTATATTACT
CCGCTCACGTTTCGGTGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGcCGTACGCCATTGAA
GTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCAT
GTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCAAA
TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACA
GTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAC
TACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTAT
GCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCACGCGTGAAGTTCAGCAGGAGCGC
AGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAG
GACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATG
GGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGA
AAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAG
GGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCT
ACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATG
CTCTCTTGAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCA
AGCCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCC
ACTTCTGACCGAGGCCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGAC
TGCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAG
GACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCA

CCCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAAGTGCAGGTGATCAG
 CCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGG
 CCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTG
 CGAGGAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCG
 TGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:3)

[0139] Соответствующая аминокислотная последовательность
 iC9mRS7VHVL28H28icz15 является следующей:

MLEGVQVETISPGDGRTFPRKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKVDSSRDRNKPFKFML
 GKQEVIRGWEEGVAQMSVGRRAKL TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESG
 GSGVDGFGDVGALSLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCE
 KLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMLVALLELAAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF
 PGAVYGTGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTPEDE
 SPGSNPEPDATPFQEGLRFTDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETL
 DDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRAEGRGSL
 LTCGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAILKGVQCSREVKLQESGPELKKPGETVKISCKASG
 YFTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLETSATTAYLQI
 NNLKSEDMATYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGTTVTVSSLEIKGSTSGSGKPGSGEGST
 DIQLTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVP
 DRFTGSGSGTDFFTISSVQAEDLAVYYCQQHYITPLTFGAGTKLELKRPAIEVMYPPP
 YLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR
 SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQN
 QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
 MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNP
 GPMRISKPHLRSISIQCYLCLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAAGLPKTEANWVNVISDLKKI
 EDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLILANNS
 LSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:4)

[0140] iC9hRs7VLVH28H28z15

ATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGCGACGGGCGCACCT
 TCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCACACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGA
 AAGAAAGTTGATTCCTCCCGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAA
 GCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCCAGATGAGTGTGGGTGAG
 AGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGC
 ATCATCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAACCTGGAATCT
 GGCGGTGGATCCGGAGTCGACGGATTTGGTGTGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGG
 GGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATT
 ATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAAC
 ATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTG
 AAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCA
 GGACCACGGTGTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCACGGCTGTCAGGC
 CAGCCACCTGCAGTTCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTGGT

CGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGC
CCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGATCATGGGTTTGAGG
TGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCA
CCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGC
CCACACCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCTGGAG
GGACCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGT
GGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGTAATGCTGTTTCGG
TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAAAAACTTT
TCTTTAAAACATCAGCTTCGCGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGG
GACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTG
GCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGCTCTAGAG_{ag}GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCAT
CCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGG
ATGTGAGTATTGCTGTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTC
CTGATCTACTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGATAGGTTTCAAGTGGCAGT
GGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGA
GTTTATTACTGTCAGCAACATTATATTACTCCGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAG
GTGGAGATCAAACGTTTGGAAATAAAGGGCTCTACAAGCGGCTCAGGAAAACCTGG
ATCAGGCGAAGGGTCTACGCAGGTCCAACCTGCAGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGA
AGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCTTCTGGATAACACCTTCACAACT
ATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGGCTTAAATGGATGGGCTGG
ATAAACACCTACACTGGAGAGCCAACATATACTGATGACTTCAAGGGACGTTTGC
CTTCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTCCAGATCAGCAGCCTAAAGGC
TGACGACACTGCCGTGTATTTCTGTGCAAGAGGGGGGTTTCGGTAGTAGCTACTGGTA
CTTCGATGTCTGGGGCCAAGGGTCCCTGGTCACCGTCTCCTCA_cCGTACGCCATTGA
AGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCA
TGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCAA
ATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAAC
AGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGA
CTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTA
TGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCACGCGTGAAGTTCAGCAGGAGCGC
AGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAG
GACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATG
GGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGA
AAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAG
GGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCT
ACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATG
CTCTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCA
AGCCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCC
ACTTCTGACCGAGGCCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGAC
TGCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAG

GACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCA
 CCCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAAGTGCAGGTGATCAG
 CCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGG
 CCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTG
 CGAGGAAGTGGAAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCG
 TGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:5)

[0141] Соответствующая аминокислотная последовательность
 iC9hRs7VLVH28H28z15 является следующей:

MLEGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKVDSSRDRNKPFFKML
 GKQEVIRGWEEGVAQMSVGRRAKL TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESG
 GSGVDGFGDVGALSLRGNADLAYILSMEPCGHCLINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCE
 KLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF
 PGAVYGTGCPVSVKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTPEDE
 SPGSNPEPDATPFQEGLRFTDQLDAISSLPTSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETL
 DDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRAEGRGSL
 LTCGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAILKGVQCSREDIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKAS
 QDVSI AVAWYQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVY
 YCQQHYITPLTFGAGTKVEIKRLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTQVQLQQSGSELKKPGASV
 KVSCKASGYTFTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPYTDDFKGRFAFSLDTS
 VSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWFYDVGQGLVTVSSPYAIEVMYPPPYL
 DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPKFWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSK
 RSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
 YNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGMPGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK
 GERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGP
 MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIED
 LIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLILANNSLSS
 NGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:6)

[0142] **iC9TROP2VLVH28H28z15**

ATGCTCGAGGGAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGCGACGGGCGCACCT
 TCCCCAAGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCACACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGA
 AAGAAAGTTGATTCCTCCCGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAA
 GCAGGAGGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTGAG
 AGAGCCAAACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGC
 ATCATCCCACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAAGTGAATCT
 GGCGGTGGATCCGGAGTCGACGGATTTGGTGTGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGG
 GGAAATGCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATT
 ATCAACAATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAAC
 ATCGACTGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTG
 AAGGGCGACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCA
 GGACCACGGTGTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGC

CAGCCACCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCCGGT
CGAGAAGATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGC
CCAAGCTCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGATCATGGGTTTGAGG
TGGCCTCCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCA
CCCCGTTCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGC
CCACACCCAGTGACATCTTTGTGTCCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAG
GGACCCAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGT
GGGCTCACTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGG
TGAAAGGGATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCCTCCGGAAAAAACTTT
TCTTTAAAACATCAGCTTCGCGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGG
GACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTG
GCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGCTCTAGAGagCAGGTCCAAGTGCAGCAATCTGGG
TCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCCTGCAAGGCTTCTGGATAC
ACCTTCACAACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGGCTTAA
ATGGATGGGCTGGATAAACACCTACACTGGAGAGCCAACATATACTGATGACTTCA
AGGGACGGTTTGCCTTCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTCCAGATCA
GCAGCCTAAAGGCTGACGACACTGCCGTGATTTCTGTGCAAGAGGGGGGTTCCGGT
AGTAGCTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAAGGGTCCCTGGTCACCGTCTCCTCA
TTGGAATAAAGGGCTCTACAAGCGGCTCAGGAAAACCTGGATCAGGCGAAGGGTC
TACGGACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG
AGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTATTGCTGTAGCCTGGTATCA
GCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTACTCGGCATCCTACCGGTACA
CTGGAGTCCCTGATAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCA
TCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAACATTATATTA
CTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTcCGTACGCCATTG
AAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCC
ATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCA
AATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAA
CAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTG
ACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCT
ATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCACGCGTGAAGTTCAGCAGGAGC
GCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCT
AGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGC
AGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCG
GAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACA
CCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCCGAGTGTACTAATT
ATGCTCTCTTGAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATT
GCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACA
GCCACTTCTGACCGAGGCCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCG

GACTGCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATC
 GAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGT
 GCACCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACCTGCAGGTGAT
 CAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCC
 TGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGA
 GTGCGAGGAACTGGAAGAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACA
 TCGTGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTGA (SEQ ID NO:7)

[0143] Соответствующая аминокислотная последовательность
 iC9TROP2VLVH28H28z15 является следующей:

MLEGVQVETISPGDGRTFPRKRGQTCVVHYTGMLLEDGKKVDSSRDRNKPFKFML
 GKQEVIRGWEEGVAQMSVGRRAKL TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESG
 GSGVDGFGDVGALSLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCE
 KLRRRFFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQF
 PGAVYGTGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTPEDE
 SPGSNPEPDATPFQEGLRFTDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETL
 DDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRAEGRGSL
 LTCGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAILKGVQCSREQVQLQQSGSELKKPGASVKVSKAS
 GYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQ
 ISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGS LVTVSSLEIKGSTSGSGKPGSGEGST
 DIQLTQSPSSLASVGDVRSITCKASQDVSI AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPD
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKRPAIEVMYPPPYL
 DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPKFWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSK
 RSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQL
 YNELNLGRREEYDVLKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK
 GERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGP
 MRISKPHLRSISIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIED
 LIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLILANNSLSS
 NGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:8)

iC9h2EF-7VHL28H28icZ15

ATGGGAGTGCAGGTGGAACCATCTCCCCAGGCGACGGGCGCACCTTCCCCA
 AGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGC ACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAA
 GTTGATTCCCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGA
 GGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCA
 AACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCC
 CACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAACTGGAATCTGGCGGTG
 GATCCGGAGTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAAT
 GCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAAC
 AATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGAC
 TGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGC
 GACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCAGGACCA

CGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCA
CCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTTCGGTCGAGAA
GATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGC
TCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGATCATGGGTTTGAGGTGGCCT
CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGT
TCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACAC
CCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCC
CAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA
CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG
GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAA
ACATCAGCTTCGCGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGA
GGAAAATCCCGGGCCCATGGAGTTCGGCTTGAGTTGGTTGTTTCCTTGTGGCGATACT
CAAAGGCGTTCAATGTCAAGTCCAGCTCGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAAC
CTGGGGCTTCAGTGAAGGTGTCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTAACTACT
GGATCGGATGGGTCAAACAGGCCCTGGACAGGGCCTCGAGTGGATTGGAGATATT
TACCCTGGAGGAGGCTATACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAGAGCCCACT
GACTGCAGACACATCCGCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTG
AGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCAAGAGGAACTGGAGGCGGAGACTACTGGGGC
CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCATTGGAAATAAAGGGCTCTACAAGCGGCTCA
GGAAAACCTGGATCAGGCGAAGGGTCTACGGACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGA
CTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGGGAGAGGGCCACCATCAACTGCAGGGCCAGCCAAA
GTGTCAGTACATCTAGCTATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAG
CCACCCAAACTCCTCATCAAGTATGCATCCAACCTGGAATCTGGGGTCCCTGACAGA
TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAGCTCCCTGCAGGCC
GAGGATGTGGCAGTCTATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCTACACCTTCGGA
GGCGGGACCAAGCTGGAAATCAAACGTACGATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTAC
CTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTG
TCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGT
GGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGA
GGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGC
CCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCC
TATCGCTCAACGCGTGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCA
GGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATG
TTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAA
GAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCT
ACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCT
TTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGG
CCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGA AATTGGCTGGAG
ATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATC
AGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCTGACCGAGGCCGGC

ATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGACTGCCCAAGACCGAGGCCAAC
 TGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCA
 CATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCACCCCAGCTGCAAGGTGACCG
 CCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACCTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGGGCAGGCC
 AGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCCTGGCCAACACAGCCTGAGCAG
 CAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAGAAG
 AACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATCAACACC
 AGCTGA (SEQ ID NO:50)

Соответствующая аминокислотная последовательность iC9h2EF-7VHL28H28icZ15 является следующей:

MGVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGK
 QEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKL TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESGGG
 SGVDGFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKL
 RRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG
 AVYGTGDCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFVASTSPEDESP
 GSNPEPDATPFQEGLRFTDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDD
 IFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRAEGRGSLLT
 CGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAILKGVQCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF
 TNYWIGWVKQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYNEKFKGRATLTADTSASTAYMELSSLR
 SEDTAVYYCARGTGGGDYWGQGLTVTVSSLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTDIVLTQSPDS
 LAVSLGERATINCRASQSVSTSSYSYMHWYQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPDRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSWEIPYTFGGGKLEIKRTIEVMYPPPYLDNEKSN
 GTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHS
 DYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSTRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELN
 LGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
 GKGHDLGYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKP
 HLRSISIQCYLCLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMH
 IDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVT
 ESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:51)

iC9h2EF-7VHL28H10icZ15

ATGGGAGTGCAGGTGGAACCATCTCCCCAGGCGACGGGCGCACCTTCCCCA
 AGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCACCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAA
 GTTGATTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGA
 GGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCA
 AACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCC
 CACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAACCTGGAATCTGGCGGTG
 GATCCGGAGTCGACGGATTTGGTGTGTCGGTGTCTTGTAGAGTTTGTAGGGGAAAT
 GCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAAC
 AATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGAC
 TGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGC

GACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCAGGACCA
CGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCA
CCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTTCGGTCGAGAA
GATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGC
TCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGATCATGGGTTTGAGGTGGCCT
CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGT
TCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCACAC
CCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCC
CAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA
CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG
GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAAAAACTTTTTCTTTAAA
ACATCAGCTTCGCGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGA
GGAAAATCCCGGGCCCATGGAGTTCGGCTTGAGTTGGTTGTTTCCTTGTGGCGATACT
CAAAGGCGTTCAATGTCAAGTCCAGCTCGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAAC
CTGGGGCTTCAGTGAAGGTGTCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTAACTACT
GGATCGGATGGGTCAAACAGGCCCTGGACAGGGCCTCGAGTGGATTGGAGATATT
TACCCTGGAGGAGGCTATACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAGAGCCACACT
GACTGCAGACACATCCGCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTG
AGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCAAGAGGAACTGGAGGCGGAGACTACTGGGGC
CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCATTGGAAATAAAGGGCTCTACAAGCGGCTCA
GGAAAACCTGGATCAGGCGAAGGGTCTACGGACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGA
CTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGGGAGAGGGCCACCATCAACTGCAGGGCCAGCCAAA
GTGTCAGTACATCTAGCTATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAG
CCACCCAAACTCCTCATCAAGTATGCATCCAACCTGGAATCTGGGGTCCCTGACAGA
TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAGCTCCCTGCAGGCC
GAGGATGTGGCAGTCTATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCCTACACCTTCGGA
GGCGGGACCAAGCTGGAAATCAAACGTACGATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTAC
CTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTG
TCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGT
GGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGC
TTTGCGCACGCCACGCCGACCCCCGCCAAGAAGATGGCAAAGTCTACATCAAC
ATGCCAGGCAGGGGCACGCGTGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTA
CCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGT
ACGATGTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAG
AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCG
GAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACG
ATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCA
TGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGG
CTGGAGATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGG
AGCATCAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCTGACCGAG

GCCGGCATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGACTGCCCAAGACCGAG
 GCCAACTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAG
 CATGCACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCACCCCAGCTGCAAGG
 TGACCGCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAACCTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGGC
 GACGCCAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCT
 GAGCAGCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAA
 GAGAAGAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATC
 AACACCAGCTGA (SEQ ID NO:52)

Соответствующая аминокислотная последовательность iC9h2EF-7VHL28H10icZ15
 является следующей:

MGVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGK
 QEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKL TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESGGG
 SGVDGFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKL
 RRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG
 AVYGTGDCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFVASTSPEDESP
 GSNPEPDATPFQEGLRFTDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDD
 IFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRAEGRGSLLT
 CGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAILKGVQCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF
 TNYWIGWVKQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYNEKFKGRATLTADTSASTAYMELSSLR
 SEDTAVYYCARGTGGGDYWGQGTLVTVSSLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTDIVLTQSPDS
 LAVSLGERATINCRASQSVSTSSYSYMHWYQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPDRFSGS
 GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSWEIPYTFGGGKLEIKRTIEVMYPPPYLDNEKSN
 GTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVLCARPRRSPA
 QEDGKVYINMPGRGTRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRD
 PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD
 TYDALHMQUALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKPHLRSISIQCYLCLLN SHF
 LTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT
 AMKCFLLELQVISLESGDASIHDVTENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEF
 LQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:53)

iC9h2G10-5VHL28H28icZ15

ATGGGAGTGCAGGTGGAAACCATCTCCCCAGGCGACGGGCGCACCTTCCCCA
 AGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGC ACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAA
 GTTGATTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGA
 GGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCA
 AACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCC
 CACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAA ACTGGAATCTGGCGGTG
 GATCCGGAGTCGACGGATTTGGTGTGTCGGTGTCTTGTAGAGTTTGTAGGGGAAAT
 GCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAAC
 AATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGAC
 TGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGC

GACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGTCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCAGGACCA
CGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCA
CCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTCTGGTCGAGAA
GATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGC
TCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGATCATGGGTTTGAGGTGGCCT
CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGT
TCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCACAC
CCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCC
CAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA
CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG
GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAAAAACTTTTTCTTTAAA
ACATCAGCTTCGCGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGA
GGAAAATCCCGGGCCCATGGAGTTCGGCTTGAGTTGGTTGTTCTTGTGGCGATACT
CAAAGGCGTTCAATGTCAAGTGCAGCTCGTCCAGTCTGGAGCTGAAGTCAAAAAGC
CTGGGGCTTCAGTGAAAGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTTCACCTTCAGCAGTAGCT
ATATCAGTTGGTTGAGGCAGGCCCTGGACAGAGACTTGAGTGGATTGCATGGATTT
ATGCTGGAACTGGCGGAACTAGCTATAATCAGAAGTTCACAGGCAAGGCCACACTG
ACTGTAGACACATCCGCCAGCACAGCCTACATGGAACTCAGCAGCCTGAGATCTGA
GGACTGCCGTCTATTACTGTGCAAGACATAACCCTCGTTACTATGCTATGGACTA
CTGGGGCCAAGGAACCACAGTCACCGTCTCCTCATTGGAAATAAAGGGCTCTACAA
GCGGCTCAGGAAAACCTGGATCAGGCGAAGGGTCTACGGACACCAGATGACCCAG
TCTCCAAGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGAGATAGAGTCACCATCACATGCATCACC
AGCACTGATATTGATGATGATATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCTCC
TAAGCTCCTGATTTCAGAAGGCAATACTCTGCGCCCTGGAGTCCCATCCCGATTCTC
CGGCAGTGGCTATGGAACAGATTTTACCTTTACAATTAGCTCCCTGCAGCCAGAAGA
TATTGCAACCTACTACTGTTTGCAAAGTGATAACCTGCCCTACACCTTCGGAGGGGG
GACCAAAGTCGAAATCAAACGTACGATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGA
CAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAA
GTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCTTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGT
CCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGT
AAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGG
GCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCG
CTCAACGCGTGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCC
AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG
GACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGT
GAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACC
AGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG
CCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTT
GAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCAGCAT

CCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCCTGACCGAGGCCGGCATCCA
 CGTGTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGACTGCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGT
 GAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCG
 ACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCACCCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATG
 AAGTGCTTTCTGCTGGAACCTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCAT
 CCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACG
 GCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCAGGAACTGGAAGAGAAGAACAT
 CAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTG
 A (SEQ ID NO:54)

Соответствующая аминокислотная последовательность iC9h2G10-5VHL28H28icZ15
 является следующей:

MGVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGK
 QEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESGGG
 SGVDGFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKL
 RRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG
 AVYGTGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESP
 GSNPEPDATAFQEGLRTRFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDD
 IFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRAEGRGSLLT
 CGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAILKGVQCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTF
 SSSYISWLRQAPGQRLEWIAWIYAGTGGTSYNQKFTGKATLTVDTSASTAYMELSSLRS
 EDTAVYYCARHNPRYYAMDYWGQTTVTVSSLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTDTQMTQS
 PSSLSASVGDRVTITCITSTDIDDDMNWYQQKPGKAPKLLISEGNTLRPGVPSRFSGSGY
 GTDFTFTISSLQPEDIATYYCLQSDNLPYTFGGGTKVEIKRTIEVMYPPPYLDNEKSNGTII
 HVK GKHLCPSPFPGPSKPFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM
 NMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSTRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR
 EEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKPHLRSI
 SIQCYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSAAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT
 LYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHTVENLIILANNLSNNGNVTESGC
 KECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:55)

iC9hu2G10-5VHL28H10icZ15

ATGGGAGTGCAGGTGGAACCATCTCCCCAGGCGACGGGCGCACCTTCCCCA
 AGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGCCTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAA
 GTTGATTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGA
 GGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCA
 AACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCC
 CACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAACTGGAATCTGGCGGTG
 GATCCGGAGTCGACGGATTTGGTGTGTCGGTGTCTTGTAGAGTTTGTAGGGGAAAT
 GCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAAC
 AATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGAC

TGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGC
GACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCAGGACCA
CGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCA
CCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTTCGGTCGAGAA
GATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGC
TCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGATCATGGGTTTGAGGTGGCCT
CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGT
TCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACAC
CCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGACCC
CAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA
CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG
GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAA
ACATCAGCTTCGCGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGA
GGAAAATCCCGGGCCCATGGAGTTCGGCTTGAGTTGGTTGTTTCTTGTGGCGATACT
CAAAGGCGTTCAATGTCAAGTGCAGCTCGTCCAGTCTGGAGCTGAAGTCAAAAAGC
CTGGGGCTTCAGTGAAAGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTTCACCTTCAGCAGTAGCT
ATATCAGTTGGTTGAGGCAGGCCCTGGACAGAGACTTGAGTGGATTGCATGGATTT
ATGCTGGAAGTGGCGGAACTAGCTATAATCAGAAGTTCACAGGCAAGGCCACACTG
ACTGTAGACACATCCGCCAGCACAGCCTACATGGAAGTTCAGCAGCCTGAGATCTGA
GGACACTGCCGTCTATTACTGTGCAAGACATAACCCTCGTTACTATGCTATGGACTA
CTGGGGCCAAGGAACCACAGTCACCGTCTCCTCATTGGAAATAAAGGGCTCTACAA
GCGGCTCAGGAAAACCTGGATCAGGCGAAGGGTCTACGGACACCCAGATGACCCAG
TCTCCAAGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGAGATAGAGTCACCATCACATGCATCACC
AGCACTGATATTGATGATGATATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCTCC
TAAGCTCCTGATTTTCAAGGCAATACTCTGCGCCCTGGAGTCCCATCCCGATTCTC
CGGCAGTGGCTATGGAACAGATTTTACCTTTACAATTAGCTCCCTGCAGCCAGAAGA
TATTGCAACCTACTACTGTTTGCAAAGTGATAACCTGCCCTACACCTTCGGAGGGGG
GACCAAAGTCGAAATCAAACGTACGATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGA
CAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAA
GTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGT
CCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGCTTTGC
GCACGCCACGCCGACCCCCGCCAAGAAGATGGCAAAGTCTACATCAACATGCC
AGGCAGGGGCACGCGTGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGC
AGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGAT
GTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGC
CTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGC
CTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAG
GCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGA
GATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCAT

CAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCCTGACCGAGGCCGG
 CATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGACTGCCCAAGACCGAGGCCAA
 CTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGC
 ACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCACCCCAGCTGCAAGGTGACC
 GCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAAGTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGC
 CAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCA
 GCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAGAA
 GAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATCAACAC
 CAGCTGA (SEQ ID NO:56)

Соответствующая аминокислотная последовательность iC9hu2G10-5VHL28H10icZ15 является следующей:

MGVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGK
 QEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKL TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESGGG
 SGVDGFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNVNFCRESGLRTRTGSNIDCEKL
 RRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG
 AVYGTGCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESP
 GSNPEPDATA PFQEGLRTRFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDD
 IFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRAEGRGSLLT
 CGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAILKGVQCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTF
 SSSYISWLRQAPGQRLEWIAWIYAGTGGTSYNQKFTGKATLTVDTASTAYMELSSLRS
 EDTAVYYCARHNPRYYAMDYWGQTTVTVSSLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTDTQMTQS
 PSSLSASVGDRVTITCITSTDIDDDMNWYQQKPGKAPKLLISEGNTLRPGVPSRFSGSGY
 GTDFTFTISSLQPEDIATYYCLQSDNLPYTFGGGTKVEIKRTIEVMYPPPYLDNEKSNGTII
 HVK GKHLCPSPFPGPSKPFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVLCARPRRSPAQED
 GKVIYNMPGRGTRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEM
 GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD
 ALHMQUALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKPHLRSISIQCYLCLLNHFLTE
 AGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAM
 KCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQS
 FVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:57)

iC9hu2G10-6VHL28H28icZ15

ATGGGAGTGCAGGTGGAACCATCTCCCCAGGCGACGGGCGCACCTTCCCCA
 AGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGC ACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAA
 GTTGATTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGA
 GGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCA
 AACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCC
 CACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAAACTGGAATCTGGCGGTG
 GATCCGGAGTCGACGGATTTGGTGTGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAAT
 GCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAAC
 AATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGAC

TGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGC
GACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCAGGACCA
CGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCA
CCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTTCGGTCGAGAA
GATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGC
TCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGATCATGGGTTTGAGGTGGCCT
CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGT
TCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCACAC
CCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCTGGAGGGACCC
CAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA
CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG
GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAA
ACATCAGCTTCGCGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGA
GGAAAATCCCGGGCCCATGGAGTTCGGCTTGAGTTGGTTGTTTCTTGTGGCGATACT
CAAAGGCGTTCAATGTCAAGTGCAGCTCGTCCAGTCTGGAGCTGAAGTCAAAAAGC
CTGGGGCTTCAGTGAAAGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTTCACCTTCAGCAGTAGCT
ATATCAGTTGGTTGAGGCAGGCCCTGGACAGAGACTTGAGTGGATTGCATGGATTT
ATGCTGGAAGTGGCGGAACTAGCTATAATCAGAAGTTCACAGGCAGAGTCACACTG
ACTGTAGACACATCCGCCAGCACAGCCTACATGGAAGTTCAGCAGCCTGAGATCTGA
GGACACTGCCGTCTATTACTGTGCAAGACATAACCCTCGTTACTATGCTATGGACTA
CTGGGGCCAAGGAACCACAGTCACCGTCTCCTCATTGGAAATAAAGGGCTCTACAA
GCGGCTCAGGAAAACCTGGATCAGGCGAAGGGTCTACGGACACCCAGATGACCCAG
TCTCCAAGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGAGATAGAGTCACCATCACATGCATCACC
AGCACTGATATTGATGATGATATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCTCC
TAAGCTCCTGATTTCAGAAGGCAATACTCTGCGCCCTGGAGTCCCATCCCGATTCTC
CGGCAGTGGCTATGGAACAGATTTTACCTTTACAATTAGCTCCCTGCAGCCAGAAGA
TATTGCAACCTACTACTGTTTGCAAAGTGATAACCTGCCCTACACCTTCGGAGGGGG
GACCAAAGTCGAAATCAAACGTACGATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGA
CAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAA
GTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGT
CCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGT
AAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGG
GCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCG
CTCAACGCGTGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCC
AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTG
GACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGT
GAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACC
AGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG
CCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAATTGGCTGGAGATGTT

GAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCATCAGCAT
 CCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCTGACCGAGGCCGGCATCCA
 CGTGTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGACTGCCCAAGACCGAGGCCAACTGGGT
 GAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGCACATCG
 ACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCACCCAGCTGCAAGGTGACCGCCATG
 AAGTGCTTTCTGCTGGAAGTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGCCAGCAT
 CCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCAGCAACG
 GCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCAGGAACTGGAAGAGAAGAACAT
 CAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATCAACACCAGCTG
 A (SEQ ID NO:58)

Соответствующая аминокислотная последовательность iC9hu2G10-6VHL28H28icZ15 является следующей:

MGVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGK
 QEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKL TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESGGG
 SGVDGFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNWNFCRESGLRTRTGSNIDCEKL
 RRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG
 AVYGTGDCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFVASTSPEDESP
 GSNPEPDATPFQEGLRFTDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDD
 IFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRAEGRGSLLT
 CGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAILKGVQCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTF
 SSSYISWLRQAPGQRLEWIAWIYAGTGGTSYNQKFTGRVTLTVDTSASTAYMELSSLRS
 EDTAVYYCARHNPRYYAMDYWGQTTVTVSSLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTDTQMTQS
 PSSLSASVGDRTITCITSTDIDDDMNWYQQKPGKAPKLLISEGNTLRPGVPSRFSGSGY
 GTDFTFTISSLQPEDIATYYCLQSDNLPYTFGGGTKVEIKRTIEVMYPPPYLDNEKSNGTII
 HVK GKHLCPSPFPGPSKPFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYM
 NMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSTRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR
 EEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGH
 DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKPHLRSI
 SIQCYLCLLNHFLTEAGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDAT
 LYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGC
 KECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:59)

iC9hu2G10 -6VHL28H10icZ15

ATGGGAGTGCAGGTGGAACCATCTCCCCAGGCGACGGGCGCACCTTCCCCA
 AGCGCGGCCAGACCTGCGTGGTGC ACTACACCGGGATGCTTGAAGATGGAAAGAAA
 GTTGATTCTCCCGGGACAGAAACAAGCCCTTTAAGTTTATGCTAGGCAAGCAGGA
 GGTGATCCGAGGCTGGGAAGAAGGGGTTGCCAGATGAGTGTGGGTCAGAGAGCCA
 AACTGACTATATCTCCAGATTATGCCTATGGTGCCACTGGGCACCCAGGCATCATCC
 CACCACATGCCACTCTCGTCTTCGATGTGGAGCTTCTAAA ACTGGAATCTGGCGGTG
 GATCCGGAGTCGACGGATTTGGTGATGTCGGTGCTCTTGAGAGTTTGAGGGGAAAT
 GCAGATTTGGCTTACATCCTGAGCATGGAGCCCTGTGGCCACTGCCTCATTATCAAC

AATGTGAACTTCTGCCGTGAGTCCGGGCTCCGCACCCGCACTGGCTCCAACATCGAC
TGTGAGAAGTTGCGGCGTCGCTTCTCCTCGCTGCATTTTCATGGTGGAGGTGAAGGGC
GACCTGACTGCCAAGAAAATGGTGTCTGGCTTTGCTGGAGCTGGCGCAGCAGGACCA
CGGTGCTCTGGACTGCTGCGTGGTGGTCATTCTCTCTCACGGCTGTCAGGCCAGCCA
CCTGCAGTTCCCAGGGGCTGTCTACGGCACAGATGGATGCCCTGTGTTCGGTCGAGAA
GATTGTGAACATCTTCAATGGGACCAGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGC
TCTTTTTTCATCCAGGCCTGTGGTGGGGAGCAGAAAGATCATGGGTTTGAGGTGGCCT
CCACTTCCCCTGAAGACGAGTCCCCTGGCAGTAACCCCGAGCCAGATGCCACCCCGT
TCCAGGAAGGTTTGAGGACCTTCGACCAGCTGGACGCCATATCTAGTTTGCCCACAC
CCAGTGACATCTTTGTGTCTACTCTACTTTCCCAGGTTTTGTTTCCTGGAGGGACCC
CAAGAGTGGCTCCTGGTACGTTGAGACCCTGGACGACATCTTTGAGCAGTGGGCTCA
CTCTGAAGACCTGCAGTCCCTCCTGCTTAGGGTCGCTAATGCTGTTTCGGTGAAAGG
GATTTATAAACAGATGCCTGGTTGCTTTAATTTCCCTCCGGAAAAAACTTTTCTTTAAA
ACATCAGCTTCGCGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTTCTAACATGCGGGGACGTGGA
GGAAAATCCCGGGCCCATGGAGTTCGGCTTGAGTTGGTTGTTCCCTGTGGCGATACT
CAAAGGCGTTCAATGTCAAGTGCAGCTCGTCCAGTCTGGAGCTGAAGTCAAAAAGC
CTGGGGCTTCAGTGAAAGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTTCACCTTCAGCAGTAGCT
ATATCAGTTGGTTGAGGCAGGCCCTGGACAGAGACTTGAGTGGATTGCATGGATTT
ATGCTGGAACTGGCGGAACTAGCTATAATCAGAAGTTCACAGGCAGAGTCACACTG
ACTGTAGACACATCCGCCAGCACAGCCTACATGGAACTCAGCAGCCTGAGATCTGA
GGACACTGCCGTCTATTACTGTGCAAGACATAACCCTCGTTACTATGCTATGGACTA
CTGGGGCCAAGGAACCACAGTCACCGTCTCCTCATTGGAAATAAAGGGCTCTACAA
GCGGCTCAGGAAAACCTGGATCAGGGCGAAGGGTCTACGGACACCCAGATGACCCAG
TCTCCAAGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGAGATAGAGTCACCATCACATGCATCACC
AGCACTGATATTGATGATGATATGAACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCTCC
TAAGCTCCTGATTTCAGAAGGCAATACTCTGCGCCCTGGAGTCCCATCCCGATTCTC
CGGCAGTGGCTATGGAACAGATTTTACCTTTACAATTAGCTCCCTGCAGCCAGAAGA
TATTGCAACCTACTACTGTTTGCAAAGTGATAACCTGCCCTACACCTTCGGAGGGGG
GACCAAAGTCGAAATCAAACGTACGATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGA
CAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAA
GTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGT
CCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGCTTTGC
GCACGCCACGCCGCAGCCCCGCCAAGAAGATGGCAAAGTCTACATCAACATGCC
AGGCAGGGGCACGCGTGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGC
AGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGAT
GTTTTGGACAAAAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGC
CTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGC
CTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAG
GCCCTGCCCCCTCGCGGACCGCAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGA

GATGTTGAGAGCAATCCCGGGCCCATGCGCATTAGCAAGCCCCACCTGCGGAGCAT
 CAGCATCCAGTGCTACCTGTGCCTGCTGCTGAACAGCCACTTCCTGACCGAGGCCGG
 CATCCACGTGTTTCATCCTGGGCTGCTTCAGCGCCGGACTGCCCAAGACCGAGGCCAA
 CTGGGTGAACGTGATCAGCGACCTGAAGAAGATCGAGGACCTGATCCAGAGCATGC
 ACATCGACGCCACCCTGTACACCGAGAGCGACGTGCACCCCAGCTGCAAGGTGACC
 GCCATGAAGTGCTTTCTGCTGGAAGTGCAGGTGATCAGCCTGGAAAGCGGCGACGC
 CAGCATCCACGACACCGTGGAGAACCTGATCATCCTGGCCAACAACAGCCTGAGCA
 GCAACGGCAACGTGACCGAGAGCGGCTGCAAAGAGTGCGAGGAACTGGAAGAGAA
 GAACATCAAAGAGTTTCTGCAGAGCTTCGTGCACATCGTGCAGATGTTTCATCAACAC
 CAGCTGA (SEQ ID NO: 60)

Соответствующая аминокислотная последовательность iC9hu2G10-6VHL28H10icZ15 является следующей:

MGVQVETISPGDGRTPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRNKPFKFMLGK
 QEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKL TISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESGGG
 SGVDGFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNWNFCRESGLRTRTGSNIDCEKL
 RRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPG
 AVYGTGDCPVSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFVASTSPEDESP
 GSNPEPDATPFQEGLRFTDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDD
 IFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSASRAEGRGSLLT
 CGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAILKGVQCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTF
 SSSYISWLRQAPGQRLEWIAWIYAGTGGTSYNQKFTGRVTLTVDTSASTAYMELSSLRS
 EDTAVYYCARHNPRYYAMDYWGQTTVTVSSLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTDTQMTQS
 PSSLSASVGDRTITCITSTDIDDDMNWYQQKPGKAPKLLISEGNTLRPGVPSRFSGSGY
 GTDFTFTISSLQPEDIATYYCLQSDNLPYTFGGGTKVEIKRTIEVMYPPPYLDNEKSNGTII
 HVK GKHLCPSP LFPGPSKPFVWL VVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVLCARPRRSPAQED
 GKVYINMPGRGTRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEM
 GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYD
 ALHMQALPPRGPQCTNYALLKLAGDVESNPGPMRISKPHLRSISIQCYLCLLN SHFLTE
 AGIHVFILGCF SAGLPKTEANWVNVISDLK KIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAM
 KCFLLELQVISLESGDASIHDVTENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQS
 FVHIVQMFINTS (SEQ ID NO:61)

С. Т-клеточный рецептор (TCR)

[0144] В некоторых вариантах осуществления генетически сконструированный TROP-2-нацеленный антигенный рецептор включает рекомбинантные TCR и/или TCR, клонированные из встречающихся в природе Т-клеток, или одну или более их частей. «Т-клеточный рецептор» или «TCR» относится к молекуле, которая содержит переменные домены α - и β -цепи (также известные как TCR α и TCR β соответственно) или переменные домены γ - и δ -цепи (также известные как TCR γ и TCR δ соответственно), и которая способна специфически связываться с антигенным пептидом, связанным с рецептором МНС. В некоторых вариантах осуществления TCR находится в $\alpha\beta$ -форме.

[0145] Как правило, TCR, находящиеся в $\alpha\beta$ - и $\gamma\delta$ -формах, обычно в структурном отношении являются сходными, но Т-клетки, экспрессирующие их, могут иметь разные анатомические расположения или функции. TCR можно обнаружить на поверхности клетки или в растворимой форме. Как правило, TCR обнаруживается на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов), где он обычно ответственен за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). В некоторых вариантах осуществления TCR также может содержать константный домен, трансмембранный домен и/или короткий цитоплазматический хвост (см., например, публикацию Janeway et al., 1997). Например, в некоторых аспектах каждая цепь TCR может содержать один N-концевой переменный домен иммуноглобулина, один константный домен иммуноглобулина, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост на C-конце. В некоторых вариантах осуществления TCR ассоциируется с инвариантными белками комплекса CD3, участвующими в передаче сигналов. Если не указано иное, то термин «TCR» следует понимать как включающий его функциональные фрагменты TCR. Данный термин также включает интактные или полноразмерные TCR, включая TCR в $\alpha\beta$ - или $\gamma\delta$ -форме.

[0146] Таким образом, для целей настоящего изобретения ссылка на TCR включает любой TCR или функциональный фрагмент, такой как антигенсвязывающий участок TCR, который связывается со специфическим антигенным пептидом, связанным с молекулой МНС, т.е. комплексом МНС-пептид. Термины «антигенсвязывающий участок» или «антигенсвязывающий фрагмент» TCR, которые могут использоваться взаимозаменяемо, относятся к молекуле, которая содержит часть структурных доменов TCR, но которая связывается с антигеном (например, комплексом МНС-пептид), с которым связывается полный TCR. В некоторых случаях антигенсвязывающий участок содержит переменные домены TCR, такие как переменный домен α -цепи и переменный домен β -цепи TCR, достаточные для формирования связывающего сайта для связывания со специфическим комплексом МНС-пептид, где обычно каждая цепь содержит три участка, определяющих комплементарность.

[0147] В некоторых вариантах осуществления переменные домены цепей TCR объединяются с образованием петель или участков, определяющих комплементарность (CDR), аналогичных иммуноглобулинам, которые обеспечивают распознавание антигена и определяют специфичность пептида посредством формирования связывающего сайта молекулы TCR и определения специфичности пептида. Как правило, как и у иммуноглобулинов, CDR разделены каркасными областями (FR) (см., например, публикации Jores et al., 1990; Chothia et al., 1988; Lefranc et al., 2003). В некоторых вариантах осуществления CDR3 является основным CDR, ответственным за распознавание процессированного антигена, хотя также было показано, что CDR1 альфа-цепи взаимодействует с N-концевой частью антигенного пептида, тогда как CDR1 бета-цепи взаимодействует с C-концевой частью антигенного пептида. Полагается, что CDR2 распознает молекулу МНС. В некоторых вариантах осуществления переменный домен β -

цепи может содержать дополнительную область гипервариабельности (HV4).

[0148] В некоторых вариантах осуществления цепи TCR содержат константный домен. Например, как и у иммуноглобулинов, внеклеточная часть цепей TCR (например, α -цепи, β -цепи) может содержать два домена иммуноглобулина, переменный домен (например, V_α или V_β ; обычно аминокислоты 1-116, основываясь на системе нумерации по Kabat et al., «Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.) на N-конце и один константный домен (например, константный домен α -цепи или C_α , обычно аминокислоты 117-259, основываясь на системе нумерации Kabat, константный домен β -цепи или C_β , обычно аминокислоты 117-295, основываясь на системе нумерации Kabat), прилегающие к клеточной мембране. Например, в некоторых случаях внеклеточная часть TCR, образованная двумя цепями, содержит два константных домена, проксимальных к мембране, и два переменных домена, дистальных к мембране, содержащих CDR. Константный домен TCR домена содержит короткие соединительные последовательности, в которых остаток цистеина образует дисульфидную связь, образуя связь между двумя цепями. В некоторых вариантах осуществления TCR может иметь дополнительный остаток цистеина в каждой из α - и β -цепей, так что TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах.

[0149] В некоторых вариантах осуществления цепи TCR могут содержать трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен заряжен положительно. В некоторых случаях цепи TCR содержат цитоплазматический хвост. В некоторых случаях структура позволяет TCR связываться с другими молекулами, такими как CD3. Например, TCR, содержащий константные домены с трансмембранной областью, может «заякоривать» белок в клеточной мембране и ассоциироваться с инвариантными субъединицами сигнального аппарата или комплекса CD3.

[0150] Как правило, CD3 представляет собой мультибелковый комплекс, который может иметь три отдельные цепи (γ , δ и ϵ) у млекопитающих и ξ -цепь. Например, у млекопитающих комплекс может содержать цепь CD3 γ , цепь CD3 δ , две цепи CD3 ϵ и гомодимер цепей CD3 ξ . Цепи CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ представляют собой тесно связанные белки клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, содержащие один домен иммуноглобулина. Трансмембранные участки цепей CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ отрицательно заряжены, что является характеристикой, позволяющей этим цепям связываться с положительно заряженными цепями T-клеточных рецепторов. Внутриклеточные хвосты цепей CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ содержат один консервативный мотив, известный как мотив активации иммунорецептора на основе тирозина или ITAM, тогда как каждая цепь CD3 ξ имеет три. Как правило, ITAM участвуют в обеспечении сигнальной способности комплекса TCR. Данные вспомогательные молекулы имеют отрицательно заряженные трансмембранные области и играют роль в распространении сигнала от TCR в клетку. CD3- и ξ -цепи вместе с TCR образуют так называемый T-клеточный рецепторный комплекс.

[0151] В некоторых вариантах осуществления TCR может представлять собой

гетеродимер из двух α - и β -цепей (или необязательно γ - и δ -цепей) или может представлять собой одноцепочечную конструкцию TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой гетеродимер, содержащий две отдельные цепи (α - и β -цепи или γ - и δ -цепи), которые связаны, например, дисульфидной связью или дисульфидными связями. В некоторых вариантах осуществления TCR для целевого антигена (например, опухолевого антигена) идентифицируется и вводится в клетки. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, можно получить из различных источников, например, амплификацией с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) общедоступных последовательностей ДНК TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR получают из биологического источника, например, из клеток, таких как Т-клетка (например, цитотоксическая Т-клетка), Т-клеточные гибридомы или другой общедоступный источник. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки можно получить из выделенных *in vivo* клеток. В некоторых вариантах осуществления от пациента можно выделить высокоаффинный клон Т-клеток и выделить TCR. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут представлять собой культивированную Т-клеточную гибридому или клон. В некоторых вариантах осуществления клон TCR для целевого антигена был генерирован в организме трансгенных мышей, сконструированных с использованием генов иммунной системы человека (например, системы человеческих лейкоцитарных антигенов или HLA). См., например, опухолевые антигены (см., например, Parkhurst et al., 2009 и Cohen et al., 2005). В некоторых вариантах осуществления фаговый дисплей используют для выделения TCR против целевого антигена (см., например, Varela-Rohena et al., 2008 и Li, 2005). В некоторых вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающий участок можно получить синтетически на основе информации о последовательности TCR.

III. Цитокины

[0152] Один или более цитокинов можно использовать с одним или более сконструированными TROP-2-нацеленными рецепторами, такими как TROP-2-специфические CAR. В некоторых случаях один или более цитокинов находятся на той же векторной молекуле, что и сконструированный рецептор, хотя в других случаях они находятся в отдельных векторных молекулах. В конкретных вариантах осуществления один или более цитокинов соэкспрессируются из того же вектора, что и сконструированный рецептор. Один или более цитокинов могут продуцироваться в виде отдельного полипептида из TROP-2-специфического рецептора. В качестве одного примера используется интерлейкин-15 (IL-15). IL-15 можно использовать, поскольку, например, его присутствие ограничивается тканями и только при патологических состояниях он обнаруживается на любом уровне в сыворотке или системно. IL-15 обладает несколькими свойствами, которые желательны для адоптивной терапии. IL-15 представляет собой гомеостатический цитокин, который индуцирует развитие и клеточную пролиферацию естественных клеток-киллеров, способствует эрадикации уже сформировавшихся опухолей посредством снижения функциональной супрессии опухоль-резидентных клеток и

ингибирует гибель клеток, вызванную активацией. Помимо IL-15 предусматриваются и другие цитокины. Они включают, помимо прочего, цитокины, хемокины и другие молекулы, которые способствуют активации и пролиферации клеток, используемых для применения у человека. В качестве одного примера, одним или более цитокинами являются IL-15, IL-12, IL-2, IL-18, IL-21, IL-23, IL-7 или их комбинация. Можно использовать НК-клетки, экспрессирующие IL-15, которые способны продолжать поддерживать передачу сигналов цитокинов, что пригодно для их выживания после инфузии.

[0153] В конкретных вариантах осуществления НК-клетки экспрессируют один или более экзогенно введенных цитокинов. Цитокин может экзогенно поступать в НК-клетки, поскольку он экспрессируется из экспрессионного вектора внутри клетки и/или поскольку он присутствует в клеточной культуральной среде. В альтернативном случае эндогенный цитокин в клетке активируется при манипуляциях с регуляцией экспрессии эндогенного цитокина, таких как генетическая рекомбинация в промоторном сайте(ах) цитокина. В случаях, когда цитокин вводится в клетку в экспрессирующей конструкции, то цитокин может кодироваться тем же вектором, что и «суицидный» ген. Цитокин может экспрессироваться в виде отдельной полипептидной молекулы из «суицидного» гена и в виде отдельного полипептида из сконструированного рецептора клетки. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к совместному использованию векторов CAR и/или TCR с IL-15, в частности, в НК-клетках.

IV. «Суицидные» гены

[154] В конкретных вариантах осуществления «суицидный» ген используется в сочетании с клеточной терапией любого типа для контроля его использования и обеспечения возможности прекращения клеточной терапии в желаемое событие и/или время. «Суицидный» ген используется в трансдуцированных клетках с целью индукции гибели трансдуцированных клеток, когда это становится необходимым. TROP-2-нацеленные клетки по настоящему изобретению, которые были модифицированы для включения вектора, охватываемого настоящим изобретением, могут содержать один или более «суицидных» генов. В некоторых вариантах осуществления термин «суицидный ген», используемый в настоящем документе, определяется как ген, который при введении пролекарства или другого агента вызывает переход генного продукта в соединение, которое обеспечивает киллинг клетки-хозяина. В других вариантах осуществления «суицидный» ген кодирует генный продукт, который, когда это требуется, нацеливается агентом (таким как антитело), нацеленный на продукт «суицидного гена». Термин «продукт суицидного гена» описывает белок или полипептид, кодированный «суицидным» геном.

[0155] Примерами комбинаций «суицидного» гена/пролекарства, которые можно использовать, являются тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSV-tk) и ганцикловир, ацикловир или FIAU; оксидоредуктаза и циклогексимид; цитозиндезаминаза и 5-фторцитозин; тимидинкиназа, тимидилаткиназа (Tdk::Tmk) и AZT; и дезоксицитидинкиназа и цитозин арабинозид. Можно использовать пуридинуклеозидфосфорилазу *E.coli*, так называемый «суицидный» ген, который

превращает пролекарство 6-метилпуриндезоксирибозид в токсичный пурин, 6-метилпурин. Другими примерами «суицидных» генов, используемых в терапии пролекарствами, являются ген цитозиндезаминазы *E. coli* и ген тимидинкиназы HSV.

[0156] Типичные «суицидные» гены также включают CD20, CD52, EGFRv3 или индуцибельную каспазу 9. В одном варианте осуществления усеченная версия варианта III EGFR (EGFRv3) может использоваться в качестве «суицидного» антигена, который можно удалить с помощью цетуксимаба. Дополнительные «суицидные» гены, известные в данной области техники, которые можно использовать в настоящем описании, включают пуриннуклеозидфосфорилазу (PNP), ферменты семейства цитохрома p450 (CYP), карбоксипептидазы (CP), карбоксилэстеразу (CE), нитроредуктазу (NTR), гуанинрибозилтрансферазу (XGRTP), ферменты гликозидазы, метионин- α,β -лиазу (MET) и тимидинфосфорилазу (TP). В некоторых вариантах осуществления используется индуцибельная каспаза 9 (iC9). Пример iC9 описан, например, в публикации Yagyu S. et al. *Mol Ther.* 2015 Sep;23(9):1475-85, включенной в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

[0157] В конкретных вариантах осуществления векторы, которые кодируют TROP-2-нацеленный CAR или любой вектор в НК-клетке по настоящему изобретению, включают один или более «суицидных» генов. «Суицидный» ген может находиться или может не находиться в том же векторе, что и TROP-2-нацеленный CAR. В случаях, когда «суицидный» ген находится в том же векторе, что и TROP-2-нацеленный CAR, то «суицидный» ген и CAR могут быть разделены, например, элементом IRES или 2A.

В. Векторы

[0158] TROP-2-нацеленные CAR могут быть доставлены в иммунные клетки реципиента любым подходящим вектором, включая вирусный вектор или невирусный вектор. Примеры вирусных векторов включают, по меньшей мере, ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные или аденоассоциированные вирусные векторы. Примеры невирусных векторов включают, по меньшей мере, плазмиды, транспозоны, липиды, наночастицы и т.д.

[0159] В случаях, когда иммунная клетка трансдуцируется вектором, кодирующим TROP-2-нацеленный рецептор, и также когда требуется трансдукция в клетку другого гена или генов, таких как «суицидный» ген и/или цитокин, и/или продукт необязательного терапевтического гена, то TROP-2-нацеленный рецептор, «суицидный» ген, цитокин и необязательный терапевтический ген могут находиться или могут не находиться в одном и том же векторе. В некоторых случаях TROP-2-нацеленный CAR, «суицидный» ген, цитокин и необязательный терапевтический ген экспрессируются из одной и той же векторной молекулы, например, из одной и той же молекулы вирусного вектора. В таких случаях экспрессия TROP-2-нацеленного CAR, «суицидного» гена, цитокина и необязательного терапевтического гена может регулироваться или может не регулироваться одним и тем же регуляторным элементом(ами). Когда TROP-2-нацеленный CAR, «суицидный» ген, цитокин и необязательный терапевтический ген находятся в одном и том же векторе, то они

могут или могут не экспрессироваться в виде отдельных полипептидов. В тех случаях, когда они экспрессируются в виде отдельных полипептидов, то они могут быть разделены в векторе, например, элементом 2A или элементом IRES (или оба типа могут быть использованы в одном и том же векторе один или более раз).

А. Общие варианты осуществления

[0160] Специалисты в данной области должны быть хорошо подготовлены для конструирования вектора с помощью стандартных рекомбинантных методов (см., например, Sambrook et al., 2001 и Ausubel et al., 1996, оба включены в настоящий документ посредством ссылки) для экспрессии антигенных рецепторов по настоящему изобретению.

1. Регуляторные элементы

[0161] Экспрессионные кассеты, включенные в векторы, пригодные в настоящем изобретении, в частности, содержат (в направлении от 5' к 3') эукариотический промотор транскрипции, функционально связанный с последовательностью, кодирующей белок, сигналы сплайсинга, включая промежуточные последовательности, и последовательность терминации транскрипции/полиаденилирования. Промоторы и энхансеры, которые контролируют транскрипцию генов, кодирующих белки, в эукариотических клетках, могут состоять из многочисленных генетических элементов. Клеточные механизмы способны собирать и интегрировать регуляторную информацию, передаваемую каждым элементом, что позволяем различным генам развивать отдельные, часто сложные модели регуляции транскрипции. Промотор, используемый в контексте настоящего изобретения, включает, например, конститутивные, индуцибельные и тканеспецифичные промоторы. В случаях, когда вектор используется для генерации противораковой терапии, то промотор может быть эффективен в условиях гипоксии.

2. Промотор/энхансеры

[0162] Экспрессионные конструкции, описанные в настоящем документе, содержат промотор для регуляции экспрессии антигенного рецептора и других продуктов цистронного гена. Промотор обычно содержит последовательность, которая определяет положение стартового сайта синтеза РНК. Наиболее известным его примером является ТАТА-бокс, но в некоторых промоторах без ТАТА-бокса, например, таких как промотор гена концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы млекопитающих и промотор поздних генов SV40, дискретный элемент, находящийся над стартовым сайтом сам помогает зафиксировать место инициации. Дополнительные промоторные элементы регулируют частоту инициации транскрипции. Обычно они располагаются в области апстрим от стартового сайта, хотя было показано, что ряд промоторов содержат функциональные элементы и даунстрим от стартового сайта. Для того, чтобы поставить кодирующую последовательность «под контроль» промотора, 5'-конец сайта инициации транскрипции рамки транскрипционного считывания располагают «даунстрим» (т.е. 3') от выбранного промотора. «Апстрим» промотор стимулирует транскрипцию ДНК и способствует экспрессии кодированной РНК.

[0163] Расстояние между промоторными элементами часто является гибким, так что

функция промотора сохраняется, когда элементы переворачиваются или перемещаются относительно друг друга. Например, в tk-промоторе расстояние между элементами промотора может быть увеличено до 50 п.н., прежде чем активность начнет снижаться. Полагается, что в зависимости от промотора отдельные элементы могут функционировать либо совместно, либо независимо, в активации транскрипции. Промотор может использоваться или может не использоваться в сочетании с «энхансером», который относится к цис-действующей регуляторной последовательности, участвующей в активации транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты.

[0164] Промотор может быть промотором, естественным образом связанным с последовательностью нуклеиновой кислоты, который может быть получен выделением 5'-некодирующих последовательностей, расположенных апстрим от кодирующего сегмента и/или экзона. Такой промотор может относиться к «эндогенному». Аналогично, энхансер может быть естественным образом связан с последовательностью нуклеиновой кислоты, расположенной либо даунстрим, либо апстрим от этой последовательности. Альтернативно, определенные преимущества будут иметь место помещением кодирующего сегмента нуклеиновой кислоты под контроль рекомбинантного или гетерологичного промотора, который относится к промотору, который обычно не связан с последовательностью нуклеиновой кислоты в его естественном окружении. Рекомбинантный или гетерологичный энхансер также относится к энхансеру, который обычно не связан с последовательностью нуклеиновой кислоты в его естественном окружении. Такие промоторы или энхансеры могут включать промоторы или энхансеры других генов, и промоторы или энхансеры, выделенные из любого другого вируса или прокариотической или эукариотической клетки, и промоторы или энхансеры, не «встречающиеся в природе», т.е. содержащие разные элементы различных областей регуляции транскрипции и/или мутации, которые изменяют экспрессию. Например, промоторы, которые наиболее часто используются при конструировании рекомбинантной ДНК, включают промоторные системы β -лактамазы (пенициллиназы), лактозы и триптофана (*trp*-). Помимо синтетического получения нуклеиновокислотных последовательностей промоторов и энхансеров, последовательности можно получить с использованием технологии рекомбинантного клонирования и/или технологии амплификации нуклеиновых кислот, включая ПЦР™, в связи с композициями, раскрытыми здесь. Кроме того, полагается, что также можно использовать контрольные последовательности, которые регулируют транскрипцию и/или экспрессию последовательностей в неядерных органеллах, таких как митохондрии, хлоропласты и т.п.

[0165] Естественно, будет важно использовать промотор и/или энхансер, который эффективно направляет экспрессию сегмента ДНК в органелле, определенном типе клеток, ткани, органе или организме, выбранных для экспрессии. Специалистам в области молекулярной биологии обычно известно использование промоторов, энхансеров и комбинаций типов клеток для экспрессии белков (см., например, монографию Sambrook et al. 1989, включенную в настоящий документ посредством ссылки). Используемые

промоторы могут быть конститутивными, тканеспецифическими, индуцибельными и/или пригодными в соответствующих условиях для направления экспрессии введенного сегмента ДНК на высоком уровне, что является преимуществом при крупномасштабном производстве рекомбинантных белков и/или пептидов. Промотор может быть гетерологичным или эндогенным.

[0166] Кроме того, для регуляции экспрессии также можно использовать любую комбинацию промотор/энхансер (например, согласно базе данных эукариотических промоторов EPDB, размещенной во всемирной сети по адресу epd.isb-sib.ch/). Другим возможным вариантом осуществления является использование цитоплазматической экспрессионной системы T3, T7 или SP6. Эукариотические клетки могут поддерживать цитоплазматическую транскрипцию из определенных бактериальных промоторов, если имеется соответствующая бактериальная полимераза либо в виде части комплекса для доставки, либо в виде дополнительной генетической экспрессионной конструкции.

[0167] Неограничивающие примеры промоторов включают ранние или поздние вирусные промоторы, такие как ранние или поздние промоторы SV40, немедленные ранние промоторы цитомегаловируса (CMV), ранние промоторы вируса саркомы Рауса (RSV); промоторы эукариотических клеток, например, такие как промотор бета-актина, промотор GADPH, промотор металлотионеина; и составные промоторы элемента ответа, такие как промоторы элемента ответа на циклический AMP (cre), промотор элемента ответа на сыворотку (sre), промотор сложного эфира форбола (TPA) и минимальные промоторы элемента ответа (tre) вблизи ТАТА-бокса. Также возможно использовать промоторные последовательности гормона роста человека (например, минимальный промотор гормона роста человека, описанный в GenBank®, идентификационный номер X05244, нуклеотиды 283-341) или промотор опухоли молочной железы мышей (доступен в ATCC номер по каталогу 45007). В некоторых вариантах осуществления промотором является промотор CMV IE, дектина-1, дектина-2, человеческого CD11c, F4/80, SM22, RSV, SV40, Ad MLP, бета-актина, промотор МНС класса I или МНС класса II, однако любой другой промотор, который пригоден для регуляции экспрессии терапевтического гена, применим к практике настоящего изобретения.

[0168] В некоторых аспектах способы по настоящему изобретению также относятся к энхансерным последовательностям, т.е. нуклеиновокислотным последовательностям, которые повышают активность промотора и которые обладают потенциалом функционировать в цис-ориентации, независимо от их ориентации, даже на относительно больших расстояниях (вплоть до расстояния нескольких килобаз от целевого промотора). Однако функция энхансеров не обязательно ограничивается такими большими расстояниями, поскольку они также могут функционировать в непосредственной близости от данного промотора.

3. Сигналы инициации и связанная экспрессия

[0169] Специфический сигнал инициации также может использоваться в экспрессионных конструкциях, представленных в настоящем описании, для эффективной

трансляции кодирующих последовательностей. Такие сигналы включают кодон инициации ATG или смежные последовательности. Возможно, потребуется обеспечить экзогенные сигналы контроля трансляции, включая кодон инициации ATG. Специалист в данной области техники легко сможет определить это и обеспечить необходимые сигналы. Хорошо известно, что иницирующий кодон должен находиться «в рамке» с рамкой считывания желаемой кодирующей последовательности, чтобы гарантировать трансляцию всей вставки. Экзогенные сигналы контроля трансляции и кодоны инициации могут быть как природными, так и синтетическими. Эффективность экспрессии можно повысить посредством включения соответствующих элементов-энхансеров транскрипции.

[0170] В некоторых вариантах осуществления элементы внутренних сайтов входа в рибосому (IRES) используются для создания мультигенных или полицистронных мессенджеров. Элементы IRES способны обходить модель сканирования рибосомы 5'-метирированной Cap-зависимой трансляции и начинать трансляцию на внутренних сайтах. Были описаны элементы IRES двух членов семейства пикорнавирусов (возбудителей полиомиелита и энцефаломиокардита), а также IRES из мессенджеров млекопитающих. Элементы IRES могут быть связаны с гетерологичными открытыми рамками считывания. Многочисленные открытые рамки считывания могут быть транскрибированы вместе, каждая из которых разделена IRES, создавая полицистронные мессенджеры. Благодаря элементу IRES каждая открытая рамка считывания доступна рибосомам для эффективной трансляции. Многочисленные гены можно эффективно экспрессировать с использованием одного промотора/энхансера для транскрипции одного мессенджера.

[0171] Как подробно описано в настоящем документе, определенные элементы последовательности 2A можно использовать для обеспечения связанной или коэкспрессии генов в конструкциях, описанных в настоящем документе. Например, последовательности расщепления можно использовать для коэкспрессии генов посредством связывания открытых рамок считывания с образованием одного цистрона. Типичная последовательность расщепления представляет собой последовательность вируса А ринита лошадей (E2A) или F2A (вируса ящура 2A) или «2A-подобную» последовательность (например, вируса *Thosea asigna* 2A; T2A) или свиного тешовируса-1 (P2A). В конкретных вариантах осуществления в одном векторе несколько последовательностей 2A не являются идентичными, хотя в альтернативных вариантах осуществления в одном и том же векторе используются две или более одинаковых последовательностей 2A. Примеры последовательностей 2A представлены в заявке на патент США 2011/0065779, которая в полном объеме включена в настоящий документ посредством ссылки.

4. Ориджины репликации

[0172] Для размножения вектора в клетке-хозяине он может содержать один или более ориджинов репликации (часто называемых «ori»), например, последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую oriP EBV, как описано выше, или генетически сконструированный oriP с аналогичной или повышенной функцией программирования, который представляет собой специфическую последовательность нуклеиновой кислоты, с

которой инициируется репликация. Альтернативно можно использовать ориджин репликации другого внехромосомно реплицирующегося вируса, как описано выше, или автономно реплицирующуюся последовательность (ARS).

5. Селекция и селектируемые маркеры

[0173] В некоторых вариантах осуществления НК-клетки, содержащие конструкцию TROP-2-нацеливающего рецептора по настоящему изобретению можно идентифицировать *in vitro* или *in vivo* посредством включения маркера в экспрессионный вектор. Такие маркеры будут придавать клетке идентифицируемые изменения, что позволит легко идентифицировать клетки, содержащие экспрессионный вектор. Обычно селектируемый маркер представляет собой маркер, который придает свойство, позволяющее осуществлять селекцию. Положительный селектируемый маркер представляет маркер, присутствие которого обеспечивает его селекцию, тогда как отрицательный селектируемый маркер представляет маркер, присутствие которого препятствует его селекции. Примером положительного селектируемого маркера является маркер лекарственной резистентности.

[0174] Обычно включение селектируемого маркера на основе лекарственного препарата помогает при клонировании и идентификации трансформантов, например, пригодными селектируемыми маркерами являются гены, которые придают резистентность к неомицину, пурамицину, гигромицину, DHFR, GPT, зеоцину и гистидинолу. Помимо маркеров, придающих фенотип, позволяющий различать трансформанты на основе обеспечения условий, также предусматриваются другие типы маркеров, включая скринируемые маркеры, такие как GFP, основой для детектирования которого является колориметрический анализ. В качестве альтернативы можно использовать поддающиеся скринингу ферменты в качестве отрицательных селектируемых маркеров, такие как тимидинкиназа (tk) вируса простого герпеса или хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT). Специалистам в данной области также известно, как использовать иммунологические маркеры, возможно, в сочетании с анализом FACS. Выбор используемого маркера не считается важным, если маркер способен экспрессироваться одновременно с нуклеиновой кислотой, кодирующей продукт гена. Дополнительные примеры маркеров селекции и скрининга хорошо известны специалистам в данной области.

В. Мультицистронные векторы

[0175] В конкретных вариантах осуществления TROP-2-нацеленный рецептор, необязательный «суицидный» ген, необязательный цитокин и/или необязательный терапевтический ген экспрессируются из мультицистронного вектора (термин «цистрон», используемый в настоящем документе, относится к нуклеиновокислотной последовательности из которой может продуцироваться генный продукт). В конкретных вариантах осуществления мультицистронный вектор кодирует TROP-2-нацеленный рецептор, «суицидный» ген и, по меньшей мере, один цитокин и/или сконструированный рецептор, такой как Т-клеточный рецептор и/или дополнительный не-TROP-2-нацеленный CAR. В некоторых случаях мультицистронный вектор кодирует, по меньшей мере, один TROP-2-нацеленный CAR, по меньшей мере один мутант TNF-альфа и по меньшей мере

один цитокин. Цитокин может относиться к цитокину определенного типа, например, цитокину человека, мыши или любого вида. В конкретных случаях цитокин представляет собой IL15, IL12, IL2, IL18 и/или IL21.

[0176] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гибкой модульной системе (термин «модульный», используемый в настоящем документе, относится к цистрону или компоненту цистрона, который допускает их взаимозаменяемость, например, посредством удаления и замещения всего цистрона или компонента цистрона, соответственно, например, с использованием стандартных методов рекомбинации) с использованием полицистронного вектора, обладающего способностью экспрессировать многочисленные цистроны на практически идентичных уровнях. Систему можно использовать для конструирования клеток, позволяющую обеспечить комбинаторную экспрессию (включая сверхэкспрессию) многочисленных генов. В конкретных вариантах осуществления один или более генов, экспрессированных вектором, включают один, два или более антигенных рецепторов. Многочисленные гены могут включать, помимо прочего, CAR, TCR, цитокины, хемокины, хоминговые рецепторы, CRISPR/Cas9-опосредованные генные мутации, рецепторы-ловушки, цитокиновые рецепторы, химерные цитокиновые рецепторы и т.д. Вектор может дополнительно содержать: (1) один или более репортеров, например флуоресцентные или ферментативные репортеры, например, для клеточных анализов и визуализации животных; (2) один или более цитокинов или других сигнальных молекул; и/или (3) «суицидный» ген.

[0177] В конкретных случаях вектор может содержать, по меньшей мере, 4 цистрона, разделенных сайтами расщепления любого типа, такими как сайты расщепления 2A. Вектор может быть или может не быть основан на вирусе мышинового лейкоза Молони (MoMLV или MMLV), включая 3'- и 5'-LTR с упаковочной последовательностью Psi в остове pUC19. Вектор может содержать 4 или более цистронов с тремя или более сайтами расщепления 2A и многочисленными ORF для замещения генов. Система обеспечивает комбинаторную сверхэкспрессию многочисленных генов (7 или более), фланкированных сайтом(ами) рестрикции, для быстрой интеграции посредством субклонирования, и в некоторых вариантах осуществления система также включает по меньшей мере три сайта саморасщепления 2A. Таким образом, система обеспечивает экспрессию многочисленных CAR, TCR, сигнальных молекул, цитокинов, цитокиновых рецепторов и/или хоминговых рецепторов. Данную систему можно также применять к другим вирусным и невирусным векторам, включая, помимо прочего, лентивирус, аденовирус AAV, а также невирусные плазмиды.

[0178] Модульная природа системы также позволяет эффективно субклонировать ген в каждый из 4 цистронов полицистронного экспрессионного вектора и замещать гены, например, для быстрого тестирования. Сайты рестрикции, стратегически расположенные в полицистронном экспрессионном векторе, позволяют эффективно замещать гены.

[0179] Варианты осуществления настоящего изобретения включают системы, в которых используется полицистронный вектор, где, по меньшей мере, часть вектора

является модульной, например, обеспечивая возможность удаления и замещения одного или более цистронов (или компонентов одного или более цистронов), например, посредством использования одного или более сайтов рестрикции, идентичность и расположение которых специфически выбраны для облегчения модульного использования вектора. Вектор также имеет варианты осуществления, где многочисленные цистроны транслируются в один полипептид и процессируются в отдельные полипептиды, тем самым давая для вектора преимущество экспрессировать отдельные генные продукты практически в эквимоллярных концентрациях.

[0180] Вектор по настоящему изобретению имеет модульную конфигурацию, позволяющую заменять один или более цистронов вектора и/или заменять один или более компонентов одного или более конкретных цистронов. Вектор можно сконструировать таким образом, чтобы использовать уникальные сайты рестрикции, фланкирующие концы одного или более цистронов и/или фланкирующие концы одного или более компонентов конкретного цистрона.

[0181] Варианты осуществления настоящего изобретения включают полицистронные векторы, содержащие, по меньшей мере, два, по меньшей мере, три или, по меньшей мере, четыре цистрона, каждый из которых фланкирован одним или более сайтами рестрикции, где, по меньшей мере, один цистрон кодирует, по меньшей мере, один антигенный рецептор. В некоторых случаях два, три, четыре или более цистронов транслируются в один полипептид и расщепляются на отдельные полипептиды, тогда как в других случаях многочисленные цистроны транслируются в один полипептид и расщепляются на отдельные полипептиды. Смежные цистроны в векторе могут быть разделены сайтом саморасщепления, таким как сайт саморасщепления 2A. В некоторых случаях каждый из цистронов экспрессирует отдельные полипептиды из вектора. В отдельных случаях смежные цистроны вектора разделяются элементом IRES.

[0182] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к системе конструирования клеток, обеспечивающей комбинаторную экспрессию, включая сверхэкспрессию, многочисленных цистронов, которые могут включать, например, один, два или более антигенных рецепторов. В конкретных вариантах осуществления использование полицистронного вектора, как описано в настоящем документе, позволяет вектору продуцировать эквимоллярные количества многочисленных генных продуктов из одной и той же мПНК. Многочисленные гены могут включать, помимо прочего, CAR, TCR, цитокины, хемокины, хоминговые рецепторы, CRISPR/Cas9-опосредованные генные мутации, рецепторы-ловушки, цитокиновые рецепторы, химерные цитокиновые рецепторы и т.д. Вектор может дополнительно содержать один или более флуоресцентных или ферментативных репортеров, например, для клеточных анализов и визуализации животных. Вектор может также содержать продукт «суицидного» гена для элиминации клеток, несущих вектор, когда они больше не нужны или становятся вредными для хозяина, которому они были введены.

[0183] В конкретных вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный

вектор (например, ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор или аденоассоциированный вирусный вектор) или невирусный вектор. Вектор может содержать 5'-LTR, 3'-LTR и/или упаковочный элемент Psi вируса мышиноного лейкоза Молони (MMLV). В определенных случаях упаковочный элемент Psi включается между 5'-LTR и последовательностью, кодирующей антигенный рецептор. Вектор может содержать или может не содержать последовательность pUC19. В некоторых аспектах вектора, по меньшей мере, один цистрон кодирует цитокин (например, IL-15, IL-7, IL-21, IL-23, IL-18, IL-12 или IL-2), хемокин, цитокиновый рецептор и/или хоминговый рецептор.

[0184] Когда в векторе используются сайты расщепления 2A, то сайт расщепления 2A может содержать сайт P2A, T2A, E2A и/или F2A.

[0185] Сайт рестрикции может быть любого типа и может включать любое число оснований в сайте узнавания, например, от 4 до 8 оснований; количество оснований в сайте узнавания может составлять, по меньшей мере, 4, 5, 6, 7, 8 или более. На участке разреза может образоваться тупой конец или липкие концы. Рестриктаза может относиться, например, к типу I, типу II, типу III или типу IV. Сайты рестрикции можно получить из доступных баз данных, таких как Интегрированная реляционная база данных ферментов (IntEnz) или BRENDA (Комплексная информационная система ферментов).

[0186] Примерные векторы могут быть циклическими и условно, где положение 1 (положение на 12 ч в верхней части круга, и остальная часть последовательности расположена по часовой стрелке) установлено в начале 5'-LTR.

[0187] В вариантах осуществления, в которых используются саморасщепляющиеся пептиды 2A, пептиды 2A могут представлять собой вирусные олигопептиды длиной 18-22 аминокислоты (aa), которые опосредуют «расщепление» полипептидов во время трансляции в эукариотических клетках. Обозначение «2A» относится к определенной области вирусного генома, и различные вирусные 2A обычно имеют название по названию вируса, из которого они происходят. Первым открытым 2A был F2A (вируса ящура), после чего были идентифицированы также E2A (вируса ринита А лошадей), P2A (тешовируса свиней-1 2A) и T2A (вируса *Thosea asigna* 2A). Было обнаружено, что механизм «саморасщепления», опосредованного 2A, заключается в том, что рибосома «проскакивает» образование глицил-пролил-пептидной связи на С-конце 2A.

[0188] В конкретных случаях вектор может представлять собой γ -ретровирусный вектор для переноса. Ретровирусный вектор для переноса может содержать остов на основе плазмиды, такой как плазида pUC19 (большой фрагмент (2,63 т.п.н.) между сайтами рестрикции HindIII и EcoRI). Остов может нести вирусные компоненты из вируса мышиноного лейкоза Молони (MoMLV), включая 5'-LTR, упаковочную последовательность Psi и 3'-LTR. LTR представляют собой длинные концевые повторы, обнаруженные по обе стороны ретровирусного провируса, и в случае вектора для переноса заключают в скобки представляющий интерес генетический груз, такой как TROP-2-нацеленный CAR, и связанные компоненты. Упаковочная последовательность Psi, которая является целевым сайтом для упаковки нуклеокапсида, также включена в цис-положение между 5'-LTR и

кодирующей последовательностью CAR. Таким образом, базовая структура примера вектора для переноса может быть сконфигурирована следующим образом: последовательность pUC19-5'-LTR - упаковочная последовательность Psi - представляющий интерес генетический груз - 3' LTR - последовательность pUC19. Эту систему можно также применять к другим вирусным и невирусным векторам, включая, помимо прочего, лентивирус, аденовирус AAV, а также невирусные плазмиды.

VI. Клетки

[0189] Настоящее изобретение относится к иммунным клеткам или стволовым клеткам любого типа, которые содержат, по меньшей мере, один вектор, который кодирует TROP-2-нацеленный рецептор, и который также может кодировать, по меньшей мере, один цитокин и/или, по меньшей мере, один «суицидный» ген. В некоторых случаях разные векторы кодируют CAR и «суицидный» ген и/или цитокин. Иммунные клетки, включая НК-клетки, могут быть получены из пуповинной крови (включая пул пуповинной крови из нескольких источников), периферической крови, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), гемопоэтических стволовых клеток (HSC), костного мозга или их смеси. НК-клетки могут быть получены из клеточной линии, такой как, помимо прочего, клетки NK-92. НК-клетка может представлять собой моноклеарную клетку пуповинной крови, такую как CD56⁺ НК-клетка.

[0190] Настоящее изобретение относится к иммунным или другим клеткам любого типа, включая обычные Т-клетки, гамма-дельта-Т-клетки, NKT и инвариантные НК-Т-клетки, регуляторные Т-клетки, макрофаги, В-клетки, дендритные клетки, мезенхимальные стромальные клетки (MSC) или их смесь.

[0191] В некоторых случаях клетки экспандировали в присутствии эффективного количества универсальных антигенпрезентирующих клеток (UAPC), в том числе в любом подходящем соотношении. Клетки можно культивировать с UAPC в соотношении от 10:1 до 1:10; от 9:1 до 1:9; от 8:1 до 1:8; от 7:1 до 1:7; от 6:1 до 1:6; от 5:1 до 1:5; от 4:1 до 1:4; от 3:1 до 1:3; от 2:1 до 1:2; или 1:1, в том числе, например, в соотношении 1:2. В некоторых случаях НК-клетки экспандировали в присутствии IL-2, например, в концентрации 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100, 10-50, 100-500, 100-400, 100-300, 100-200, 200-500, 200-400, 200-300, 300-500, 300-400 или 400-500 Е/мл.

[0192] После генетической модификации вектором(ами) НК-клетки можно немедленно инфузировать или подвергнуть хранению. В некоторых аспектах после генетической модификации клетки можно размножить в течение суток, недель или месяцев *ex vivo* в виде основной популяции в течение примерно 1, 2, 3, 4, 5 суток или более после переноса гена в клетки. В дополнительном аспекте трансфектанты клонируют, и клон, демонстрирующий наличие одной интегрированной или эписомально поддерживаемой экспрессионной кассеты или плазмиды, и экспрессию TROP-2-нацеленного CAR, подвергают экспансии *ex vivo*. Клон, отобранный для экспансии, демонстрирует способность специфически распознавать и лизировать клетки-мишени, экспрессирующие TROP-2. Рекомбинантные иммунные клетки можно экспандировать при стимуляции IL-2

или другими цитокинами, которые связываются с общей гамма-цепью (например, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21, IL-23 и другие). Рекомбинантные иммунные клетки можно экспандировать посредством стимуляции искусственными антигенпредставляющими клетками. В дополнительном аспекте генетически модифицированные клетки можно криоконсервировать.

[0193] Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к клеткам, которые экспрессируют один или более TROP-2-нацеленных CAR, и один или более «суицидных» генов, как описано в настоящем документе. NK-клетка содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более TROP-2-нацеленных CAR, и один или более сконструированных несекретируемых мембраносвязанных мутантных полипептидов TNF-альфа в конкретных вариантах осуществления. В конкретных вариантах осуществления, помимо экспрессии одного или более TROP-2-нацеленных CAR, и мутантных полипептидов TNF-альфа, клетка также содержит нуклеиновую кислоту, которая кодирует один или более терапевтических генных продуктов.

[0194] Клетки можно получить непосредственно от субъекта или можно получить из депозитария или другого хранилища. Клетки для терапии могут быть аутологичными или аллогенными по отношению к субъекту, которому эти клетки обеспечиваются в качестве терапии.

[0195] Клетки могут быть получены от субъекта, нуждающегося в лечении по поводу патологического состояния, и после манипуляций с ними для экспрессии TROP-2-нацеленного CAR, необязательного «суицидного» гена, необязательного цитокина(ов) и необязательного терапевтического генного продукта(ов) (например, с использованием стандартных методов трансдукции и экспансии для адоптивной клеточной терапии), могут быть введены обратно субъекту, от которого они были первоначально получены. В некоторых случаях клетки сохраняются для последующего применения для субъекта или другого субъекта.

[0196] Иммунные клетки могут находиться в популяции клеток, и эта популяция может содержать большую часть клеток, которые трансдуцированы одним или более TROP-2-нацеленными рецепторами, и/или одним или более «суицидными» генами и/или одним или более цитокинами. Популяция клеток может включать 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% иммунных клеток, трансдуцированных одним или более TROP-2-нацеленными рецепторами, и/или одним или более «суицидными» генами и/или одним или более цитокинами. Один или более TROP-2-нацеленных рецепторов, и/или один или более «суицидных» генов и/или один или более цитокинов могут представлять собой отдельные полипептиды.

[0197] Иммунные клетки могут быть получены с одним или более TROP-2-нацеленными рецепторами, и/или одним или более «суицидными» генами и/или одним или более цитокинами с целью придания им модульности по отношению к конкретной цели.

Например, могут быть созданы клетки, в том числе для коммерческого распространения, экспрессирующие TROP-2-нацеленные рецепторы и/или один или более «суицидных» генов, и/или один или более цитокинов (или для распространения в виде нуклеиновой кислоты, которая кодирует мутант для последующей трансдукции), и пользователь может модифицировать их для экспрессии одного или более других представляющих интерес генов (включая терапевтические гены) в зависимости от цели их предполагаемого применения. Например, для субъекта, нуждающегося в лечении TROP-2-положительных клеток, включая TROP-2-положительный рак, можно получить или создать клетки, экспрессирующие «суицидный» ген (или гетерологичные клетки, экспрессирующие цитокины), и модифицировать их для экспрессии рецептора, содержащего TROP-2-специфический scFv или наоборот.

[0198] В конкретных вариантах осуществления используются NK-клетки, и геном трансдуцированных NK-клеток, экспрессирующих один или более TROP-2-нацеленных CAR и/или один или более «суицидных» генов, и/или один или более цитокинов, может быть модифицирован. Геном можно модифицировать любым способом, но в конкретных вариантах осуществления геном модифицируют, например, посредством технологии редактирования генов CRISPR. Геном клеток можно модифицировать для повышения эффективности клеток для любых целей.

VII. Редактирование генов TROP-2-специфических CAR клеток

[0199] В конкретных вариантах осуществления клетки, содержащие, по меньшей мере, сконструированный TROP-2-специфический рецептор, подвергаются редактированию генов для модификации экспрессии одного или более эндогенных генов в клетке. В определенных случаях TROP-2-специфические CAR клетки модифицируют для обеспечения пониженных уровней экспрессии одного или более эндогенных генов, включая ингибирование экспрессии одного или более эндогенных генов (что можно назвать нокаутом). Такие клетки можно экспандировать и нет.

[0200] В конкретных случаях один или более эндогенных генов TROP-2-специфических CAR клеток модифицируют, например, в результате нарушается их экспрессия, при этом экспрессия снижается частично или полностью. В конкретных случаях один или более генов подвергаются нокдауну или нокауту с использованием способов по изобретению. В определенных случаях многочисленные гены подвергаются нокдауну или нокауту, и это может иметь место или может не иметь место на одной и той же стадии их получения. Гены, которые редактируются в TROP-2-специфических CAR-клетках, могут представлять собой любой тип, но в конкретных вариантах осуществления гены представляют собой гены, генные продукты которых ингибируют активность и/или пролиферацию TROP-2-специфических CAR клеток, включая TROP-2-специфические NK-клетки, например, полученные из пуповинной крови. В определенных случаях гены, которые редактируются в TROP-2-специфических CAR клетках, позволяют TROP-2-специфическим CAR клеткам более эффективно «функционировать» в микроокружении опухоли. В конкретных случаях гены представляют собой один или более генов из NKG2A,

SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5 и CD7. В конкретных вариантах осуществления ген TGFBR2 подвергается нокауту или нокдауну в TROP-2-специфических CAR клетках.

[0201] В некоторых вариантах осуществления редактирование генов проводят с использованием одной или более ДНК-связывающих нуклеиновых кислот, например, модификация проводится с использованием РНК-направляемой эндонуклеазы (RGEN). Например, модификацию можно осуществить с использованием кластеризованных коротких палиндромных повторов с регулярными интервалами (CRISPR) и CRISPR-ассоциированных (Cas) белков; в некоторых вариантах осуществления вместо Cas9 используется CrF1. В общем, «система CRISPR» в совокупности относится к транскриптам и другим элементам, участвующим в экспрессии или регуляции активности CRISPR-ассоциированных («Cas») генов, включая последовательности, кодирующие ген Cas, tracr-последовательность (транс-активирующая CRISPR) (например, tracrРНК или активная частичная tracrРНК), парная tracr-последовательность (включающая «прямой повтор» и tracrРНК-процессированный частичный прямой повтор в контексте эндогенной системы CRISPR), направляющую последовательность (также называемую «спейсером» в контексте эндогенной системы CRISPR) и/или другие последовательности и транскрипты из локуса CRISPR.

[0202] Нуклеаза CRISPR/Cas или нуклеазная система CRISPR/Cas может включать некодирующую молекулу РНК (направляющую) РНК, которая специфически связывается с ДНК, и белок Cas (например, Cas9) с нуклеазной активностью (например, два нуклеазных домена). Один или более элементов системы CRISPR могут происходить из системы CRISPR типа I, типа II или типа III, например, происходящих из конкретного организма, содержащего эндогенную систему CRISPR, такого как *Streptococcus pyogenes*.

[0203] В некоторых аспектах в клетку вводят нуклеазу Cas и гРНК (включая слитую конструкцию из crРНК, специфическую для целевой последовательности, и фиксированной tracrРНК). Как правило, целевые сайты на 5'-конце гРНК нацеливают нуклеазу Cas на целевой сайт, например, ген, используя комплементарное спаривание оснований. Целевой сайт может быть выбран на основе его положения непосредственно 5' от последовательности примыкающего к протоспейсеру мотива (PAM), обычно такого как NGG или NAG. В этом отношении гРНК нацеливается на требуемую последовательность посредством модификации первых 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 14, 12, 11 или 10 нуклеотидов направляющей РНК, чтобы они соответствовали целевой последовательности ДНК. В целом система CRISPR характеризуется элементами, которые способствуют образованию комплекса CRISPR в сайте целевой последовательности. Как правило, «целевая последовательность», в общем, относится к последовательности, к которой сконструирована направляющая последовательность так, чтобы обеспечить комплементарность, где гибридизация целевой последовательности и направляющей последовательности способствует образованию комплекса CRISPR. Полная

комплементарность не требуется обязательно, при условии, что она достаточна для того, чтобы обеспечить гибридизацию и способствовать образованию комплекса CRISPR.

[0204] Система CRISPR может индуцировать образование двухцепочечных разрывов (DSB) в целевом сайте с последующими разрушениями или изменениями, описанными в настоящем документе. В других вариантах осуществления варианты Cas9, называемые «никазами», используются для обеспечения одноцепочечного разрыва в целевом сайте. Можно использовать парные никазы, например, для повышения специфичности, каждая из которых направляется парой различных последовательностей нацеленных гРНК, так что при одновременном введении разрывов образуется 5'-выступ. В других вариантах осуществления каталитически неактивная Cas9 слита с гетерологичным эффекторным доменом, таким как репрессор или активатор транскрипции, для воздействия на экспрессию гена.

[0205] Целевая последовательность может содержать любой полинуклеотид, такой как ДНК или РНК полинуклеотиды. Целевая последовательность может располагаться в ядре или цитоплазме клетки, например, внутри органеллы клетки. Как правило, последовательность или матрицу, которую можно использовать для рекомбинации в целевой локус, содержащий целевые последовательности, называют «редактирующей матрицей», «редактирующим полинуклеотидом» или «редактирующей последовательностью». В некоторых аспектах экзогенный матричный полинуклеотид может относиться к редактирующей матрице. В некоторых аспектах рекомбинация является гомологичной рекомбинацией.

[0206] Как правило, в контексте эндогенной системы CRISPR образование комплекса CRISPR (включающего направляющую последовательность, гибридизованную с целевой последовательностью и образующую комплекс с одним или более белками Cas) приводит к расщеплению одной или обеих цепей в или рядом (например, в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 или более пар оснований) с целевой последовательностью. Трасг-последовательность, которая может содержать или состоять из всей или части трасг-последовательности дикого типа (например, примерно или более чем примерно 20, 26, 32, 45, 48, 54, 63, 67, 85 или более нуклеотидов трасг-последовательности дикого типа) также может образовывать часть комплекса CRISPR, например, посредством гибридизации, по меньшей мере, части трасг-последовательности со всей или частью парной трасг-последовательности, которая функционально связана с направляющей последовательностью. Трасг-последовательность обладает достаточной комплементарностью с парной трасг-последовательностью для гибридизации и участия в формировании комплекса CRISPR, например, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% комплементарностью последовательностей по длине парной трасг-последовательности при оптимальном выравнивании.

[0207] Один или более векторов, регулирующих экспрессию одного или более элементов системы CRISPR, могут быть введены в клетку таким образом, чтобы экспрессия элементов системы CRISPR направляла образование комплекса CRISPR в одном или более

целевых сайтах. Компоненты также могут доставляться в клетки в виде белков и/или РНК. Например, фермент Cas, направляющая последовательность, связанная с парной tracr-последовательностью, и tracr-последовательность могут быть функционально связаны с отдельными регуляторными элементами в отдельных векторах. Альтернативно, два или более элементов, экспрессированных одним и тем же или разными регуляторными элементами, могут быть объединены в один вектор с одним или более дополнительными векторами, обеспечивающими любые компоненты системы CRISPR, не включенные в первый вектор. Вектор может содержать один или более сайтов инсерции, таких как последовательность распознавания эндонуклеазы рестрикции (также называемая «сайтом клонирования»). В некоторых вариантах осуществления один или более сайтов инсерции расположены апстрим и/или даунстрим от одного или более элементов последовательности одного или более векторов. При использовании многочисленных различных направляющих последовательностей можно использовать одну экспрессирующую конструкцию для нацеливания активности CRISPR на многочисленные различные соответствующие целевые последовательности внутри клетки.

[0208] Вектор может содержать регуляторный элемент, операбельно связанный с последовательностью, кодирующей фермент, кодирующей фермент CRISPR, такой как белок Cas. Неограничивающие примеры белков Cas включают Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известные как Csn1 и Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, Cpf1 (Cas12a) и их гомологи, или их модифицированные варианты. Такие ферменты известны; например, аминокислотную последовательность белка Cas9 *S. pyogenes* можно найти в базе данных SwissProt под идентификационным номером Q99ZW2.

[0209] Ферментом CRISPR может быть Cas9 (например, из *S. pyogenes* или *S. pneumoniae*). В некоторых случаях в качестве эндонуклеазы вместо Cas9 можно использовать Cpf1 (Cas12a). Фермент CRISPR может направлять расщепление одной или обеих цепей в местоположении целевой последовательности, например, внутри целевой последовательности и/или в комплементе целевой последовательности. Вектор может кодировать фермент CRISPR, который мутирован относительно соответствующего фермента дикого типа, так что в результате мутантный фермент CRISPR теряет способность расщеплять одну или обе цепи целевого полинуклеотида, содержащего целевую последовательность. Например, замена аспартата на аланин (D10A) в каталитическом домене RuvC I Cas9 из *S. pyogenes* превращает Cas9 из нуклеазы, которая расщепляет обе цепи, в никазу (расщепляет одну цепь). В некоторых вариантах осуществления никаза Cas9 может использоваться в комбинации с направляющей последовательностью(ями), например, двумя направляющими последовательностями, которые нацелены соответственно на смысловую и антисмысловую цепи ДНК-мишени. Такая комбинация позволяет разрезать обе цепи и использовать их для индукции NHEJ или HDR.

[0210] В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая

фермент CRISPR, является кодон-оптимизированной для экспрессии в определенных клетках, таких как эукариотические клетки. Эукариотические клетки могут представлять собой клетки определенного организма или получены из него, например, млекопитающего, включая, помимо прочего, человека, мышь, крысу, кролика, собаку или примата, отличного от человека. В общем, кодон-оптимизация относится к процессу модификации последовательности нуклеиновой кислоты для усиления экспрессии в представляющих интерес клетках-хозяевах посредством замещения, по меньшей мере, одного кодона нативной последовательности кодонами, которые чаще или наиболее часто используются в генах этой клетке-хозяину, сохраняя при этом нативную аминокислотную последовательность. Различные виды демонстрируют особое «предпочтение» к определенным кодонам конкретной аминокислоты. Смещение использования кодонов (различия в использовании кодонов между организмами) часто коррелирует с эффективностью трансляции матричной РНК (мРНК), которая, как полагают, в свою очередь зависит, среди прочего, от свойств транслируемых кодонов и наличия определенных молекул транспортной РНК (тРНК). Преобладание выбранных тРНК в клетке обычно является отражением кодонов, наиболее часто используемых в синтезе пептидов. Соответственно, гены можно адаптировать для оптимальной экспрессии генов в данном организме на основе кодон-оптимизации.

[0211] В общем, направляющая последовательность представляет собой любую полинуклеотидную последовательность, имеющую достаточную комплементарность с целевой полинуклеотидной последовательностью для обеспечения гибридизации с целевой последовательностью и прямого последовательность-специфического связывания комплекса CRISPR с целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между направляющей последовательностью и соответствующей целевой последовательностью при оптимальном выравнивании с использованием подходящего алгоритма выравнивания составляет примерно или более чем примерно 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или более.

[0212] Оптимальное выравнивание может быть осуществлено с использованием любого подходящего алгоритма выравнивания последовательностей, неограничивающие примеры которого включают в себя алгоритм Смита-Уотермана, алгоритм Нидлмана-Вунша, алгоритмы, основанные на преобразовании Барроуза-Уиллера (например, алгоритм Барроуза-Уиллера), Clustal W, Clustal X, BLAT, Novoalign (Novocraft Technologies, ELAND (Illumina, San Diego, Calif.), SOAP (доступно на soap.genomics.org.cn) и Maq (доступно на maq.sourceforge.net).

[0213] Фермент CRISPR может быть частью слитого белка, содержащего один или более гетерологичных белковых доменов. Слитый белок фермента CRISPR может содержать любую дополнительную белковую последовательность и, необязательно, линкерную последовательность между любыми двумя доменами. Примеры белковых доменов, которые могут быть слиты с ферментом CRISPR, включают, помимо прочего, эпитопные метки, последовательности репортерных генов и белковые домены, обладающие

одной или более из следующих активностей: метилазной активностью, деметилазной активностью, активностью активации транскрипции, активностью репрессии транскрипции, активностью высвобождения фактора транскрипции, активностью модификации гистонов, активностью расщепления РНК и активностью связывания нуклеиновых кислот. Неограничивающие примеры эпитопных меток включают гистиридиновые метки (His), V5-метки, FLAG-метки, метки гемагглютинина гриппа (HA), Мус-метки, VSV-G-метки и тиоредоксиновые метки (Trx). Примеры репортерных генов включают, помимо прочего, глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), бета-галактозидазу, бета-глюкуронидазу, люциферазу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), HcRed, DsRed, голубой флуоресцентный белок (CFP), желтый флуоресцентный белок (YFP) и аутофлуоресцентные белки, включая синий флуоресцентный белок (BFP). Фермент CRISPR может быть слит с последовательностью гена, кодирующего белок или фрагмент белка, который связывает молекулы ДНК или другие клеточные молекулы, включая, помимо прочего, мальтозосвязывающий белок (MBP), S-метку, ДНК-связывающий домен Lex A (DBD), слитая конструкция ДНК-связывающего домена GAL4A и слитые конструкции белков VP16 вируса простого герпеса (HSV). Дополнительные домены, которые могут образовывать часть слитого белка, содержащего фермент CRISPR, описаны в заявке на патент США 20110059502, включенной в настоящий документ посредством ссылки.

VIII. Способы лечения

[0214] В различных вариантах осуществления на больные или другие клетки, экспрессирующие эндогенный TROP-2 на своей поверхности, воздействуют с целью улучшения состояния субъекта, страдающего этим заболеванием, или с целью снижения риска или замедления обострения и/или начала развития заболевания у субъекта. В определенных случаях опухолевые клетки, экспрессирующие эндогенный TROP-2, подвергаются воздействию с целью киллинга опухолевых клеток.

[0215] TROP-2-нацеленные CAR конструкции, нуклеиновокислотные последовательности, векторы, иммунные клетки и т.д., раскрытые в настоящем документе, и/или фармацевтические композиции, содержащие их, используются для профилактики, лечения или облегчения злокачественного заболевания, такого как опухоль. В конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть особенно пригодной для профилактики, облегчения и/или лечения рака, включая типы рака, при которых экспрессируется TROP-2, и которые могут представлять собой или могут не представлять собой солидные опухоли, например.

[0216] Иммунными клетками, для которых используется TROP-2-нацеленный рецептор, могут представлять собой NK-клетки, Т-клетки, гамма-дельта-Т-клетки, альфа-бета-Т-клетки или NKT, или инвариантные NKT (iNKT), или инвариантные NKT-клетки, сконструированные для клеточной терапии у млекопитающих, в конкретных вариантах осуществления. В тех случаях, когда клетки представляют собой NK-клетки, то NK-клеточная терапия может быть любого типа, и NK-клетки могут быть любого типа. В

конкретных вариантах осуществления клетки представляют собой НК-клетки, которые были сконструированы для экспрессии одного или более TROP-2-нацеленных CAR и/или одного или более «суицидных» генов, и/или одного или более цитокинов. В конкретных вариантах осуществления клетки представляют собой НК-клетки, трансдуцированные TROP-2-нацеленным CAR.

[0217] В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение частично относится к клеткам, экспрессирующим TROP-2 CAR, TROP-2-нацеленным CAR конструкциям, TROP-2-нацеленным CAR молекулам нуклеиновой и TROP-2-нацеленным CAR векторам, которые можно вводить самостоятельно или в любой комбинации с использованием стандартных векторов и/или систем доставки генов и, по меньшей мере, в некоторых аспектах, вместе с фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом. В некоторых вариантах осуществления после введения, молекулы нуклеиновой кислоты или векторы могут стабильно интегрироваться в геном субъекта.

[0218] В конкретных вариантах осуществления можно использовать вирусные векторы, которые специфичны для определенных клеток или тканей и устойчивы в НК-клетках. Подходящие фармацевтические носители и эксципиенты хорошо известны в данной области. Композиции, приготовленные согласно изобретению, можно использовать для профилактики, лечения или замедления развития выявленных заболеваний.

[0219] Кроме того, изобретение относится к способу профилактики, лечения или облегчения опухолевого заболевания, включающему стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества клеток, которые экспрессируют TROP-2-нацеленный CAR, последовательность нуклеиновой кислоты, вектор, описанный в настоящем документе, и/или полученный способом, описанным в настоящем документе.

[0220] Возможными показаниями для введения композиции(й) типичных TROP-2-нацеленных CAR клеток являются злокачественные заболевания, включая опухолевые заболевания, включая В-клеточные злокачественные новообразования, множественную миелому, рак молочной железы, глиобластому, почечноклеточный рак, рак поджелудочной железы или рак легкого, например. Типичными показаниями для введения композиции(й) TROP-2-нацеленных CAR клеток являются злокачественные заболевания, включая любые злокачественные новообразования, которые экспрессируют TROP-2. Введение композиции(й) по настоящему изобретению пригодно для всех стадий (I, II, III или IV) и типов рака, включая минимальную остаточную болезнь, рак на ранних стадиях, рак на поздних стадиях и/или метастатический рак, и/или, например, рефрактерный рак.

[0221] Настоящее изобретение также относится к протоколы совместного введения с другими соединениями, например, конструкциями биспецифических антител, целевыми токсинами или другими соединениями, функционирующими через иммунные клетки. Клиническая схема совместного введения соединения(ий) по изобретению может включать одновременное введение, до или после введения другого компонента. Конкретные комбинированные способы лечения включают химиотерапию, лучевую терапию, хирургическое вмешательство, гормональную терапию или другие виды иммунотерапии.

[0222] Варианты осуществления относятся к набору, содержащему TROP-2-нацеленную CAR конструкцию, описанную в настоящем документе, последовательность нуклеиновой кислоты, описанную в настоящем документе, вектор, описанный в настоящем документе, и/или клетку-хозяина (такую как иммунная клетка), описанную в настоящем документе. Также полагается, что набор по настоящему изобретению содержит фармацевтическую композицию, описанную здесь выше, либо отдельно, либо в сочетании с дополнительными лекарственными средствами для введения субъекту, нуждающемуся в медицинском лечении или вмешательстве.

А. Фармацевтические композиции

[0223] Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям и составам, содержащим трансдуцированные NK-клетки и фармацевтически приемлемый носитель. Трансдуцированные клетки могут находиться в среде, подходящей для переноса субъекту, и/или среде, подходящей для консервации, такой как криоконсервация, в том числе перед переносом субъекту.

[0224] Фармацевтические композиции и составы, описанные в настоящем документе, можно приготовить смешиванием активных ингредиентов (таких как клетки), имеющих желаемую степень чистоты, с одним или более необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd edition, 2012), в форме лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители, как правило, нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях, и включают, помимо прочего: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлокомплексы (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Примеры фармацевтически приемлемых носителей по настоящему изобретению дополнительно включают агенты для внутритканевого введения лекарственных средств, такие как растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, растворимые гликопротеины гиалуронидазы человека PH-20, такие как rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Некоторые типичные sHASEGP и способы применения, включая rHuPH20, описаны в патентных публикациях США № 2005/0260186 и 2006/0104968. В одном аспекте sHASEGP

комбинируют с одной или более дополнительными гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

В. Комбинированная терапия

[0225] В некоторых вариантах осуществления композиции и способы согласно вариантам осуществления настоящего изобретения включают популяцию иммунных клеток (в том числе, популяцию НК-клеток) в комбинации, по меньшей мере, с одной дополнительной терапией. Дополнительной терапией может быть лучевая терапия, хирургическое вмешательство (например, лампэктомия и мастэктомия), химиотерапия, генная терапия, ДНК-терапия, вирусная терапия, РНК-терапия, иммунотерапия, трансплантация костного мозга, нанотерапия, терапия моноклональными антителами, гормональная терапия, онколитические вирусы или сочетание вышеперечисленного. Дополнительная терапия может быть в форме адьювантной или неоадьювантной терапии.

[0226] В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой введение низкомолекулярного ингибитора ферментов или антиметастатического средства. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой введение агентов, ограничивающих побочные эффекты (например, агентов, предназначенных для снижения возникновения и/или тяжести побочных эффектов лечения, таких как средства против тошноты и т. д.). В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой лучевую терапию. В некоторых вариантах осуществления дополнительной терапией является хирургическое вмешательство. В некоторых вариантах дополнительная терапия представляет собой комбинацию лучевой терапии и хирургического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления дополнительной терапией является облучение гамма-лучами. В некоторых вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой терапию, нацеленную на путь РВК/АКТ/mTOR, ингибитор HSP90, ингибитор тубулина, ингибитор апоптоза и/или химиопрофилактическое средство. Дополнительная терапия может представлять собой один или более химиотерапевтических препаратов, известных в данной области.

[0227] В конкретных вариантах осуществления, в дополнение к клеточной терапии по настоящему изобретению, субъекту предоставлена, предоставляется и/или может быть предоставлена специфическая дополнительная терапия рака, включая одно или более из хирургического вмешательства, лучевой терапии, иммунотерапии (кроме клеточной терапии по настоящему изобретению), гормональной терапии, генной терапии, химиотерапии и т.д.

[0228] Терапию иммунными клетками можно проводить до, во время, после или в различных комбинациях относительно дополнительной терапии рака. Введения могут осуществляться с интервалами от одновременных до нескольких минут, суток и недель. В вариантах осуществления, где клеточная иммунотерапия проводится пациенту отдельно от дополнительного терапевтического агента, то обычно следует гарантировать, что между временем каждой доставки отсутствует значительный период времени, чтобы два соединения все еще будут способны оказывать преимущественно комбинированное

воздействие на пациента. В таких случаях полагается, что можно обеспечить пациенту терапию антителами и противораковую терапией с интервалом примерно от 12 до 24 или 72 ч друг от друга и, более конкретно, с интервалом примерно в 6-12 ч друг от друга. В некоторых ситуациях может оказаться желательным существенно удлинить период лечения, при этом перерыв между соответствующими введениями составляет от нескольких суток (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8).

[0229] Можно использовать различные комбинации. В приведенном ниже примере иммунноклеточная терапия представляет собой «А», и противораковая терапия представляет собой «В»:

A/V/A V/A/V V/V/A A/A/V A/V/V V/A/A A/V/V/V V/A/V/V
 V/V/V/A V/V/A/V A/A/V/V A/V/A/V A/V/V/A V/V/A/A
 V/A/V/A V/A/A/V A/A/A/V V/A/A/A A/V/A/A A/A/V/A

[0230] Введение любого соединения или клеточной терапии по вариантам осуществления настоящего изобретения пациенту будет осуществляться в соответствии с общими протоколами введения таких соединений, принимая во внимание токсичность агентов, если таковая имеется. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления предусмотрена стадия мониторинга токсичности, связанной с комбинированной терапией.

1. Химиотерапия

[0231] В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения можно использовать широкий спектр химиотерапевтических препаратов. Термин «химиотерапия» относится к использованию лекарственных препаратов для лечения рака. термин «химиотерапевтический препарат» используется для обозначения соединения или композиции, которые вводят при лечении рака. Такие агенты или лекарственные препараты классифицируются по механизму их действия в клетке, например, по тому, влияют ли они на клеточный цикл и на какой его стадии. Альтернативно, агент можно охарактеризовать на основе его способности напрямую «сшивать» ДНК, интеркалировать в ДНК или индуцировать хромосомные и митотические аберрации, при этом оказывая влияние на синтез нуклеиновой кислоты.

[0232] Примеры химиотерапевтических препаратов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоксон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (в частности, буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; калистатин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карцелезин и бизелезин); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид,

мехлоретамин, оксида мехлорэтамина гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид и урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как эндииновые антибиотики (например, калихеамицин, в частности, калихеамицин гаммаII и калихеамицин омегаII); динемидин, включая динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также хромофор неокарциностаина и родственные ему хромопротеиновые антибиотические хромофоры, аклациномизин, актиномицин, аутрарницин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофиллин, хромомицин, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцеломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаларницин, оливомицины, пепломицин, потфирамицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностаин и зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-ФУ); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, птероптерин и триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн и тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин и флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромастанол пропионат, эпитиостанол, мепитиостан и тестолактон; антиадреналовые средства, такие как митотан и трилостан; восполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидный гликозид; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; ацетат эллиптиния; эпотилен; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтансиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лосоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарабазин; полисахаридный комплекс (ПСК); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотецены (в частности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ара-С»); циклофосфамид; таксоиды, например паклитаксел и доцетаксел гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; платиновые координационные комплексы, такие как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин; новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; иринотекан (например, СРТ-11); ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифформетилорнитин (ДМФО); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; карбоплатин, прокарабазин, поликомицин, гемцитабиен, навелбин, ингибиторы фарнезилпротеинтрансферазы, трансплатина и фармацевтически приемлемые соли, кислоты

или производные любого из вышеперечисленного.

2. Лучевая терапия

[0233] Другие факторы, вызывающие повреждение ДНК и широко используемые, включают так называемые γ -лучи, рентгеновские лучи и/или направленную доставку радиоизотопов к опухолевым клеткам. Также предполагаются другие формы ДНК-повреждающих факторов, такие как микроволны, облучение пучком протонов (патенты США № 5760395 и 4870287) и УФ-облучение. Наиболее вероятно, что все эти факторы вызывают широкий спектр повреждений ДНК, оказывают влияние на предшественники ДНК, репликацию и репарацию ДНК, а также сборку и поддержание хромосом. Диапазон доз рентгеновских лучей варьируется от суточных доз от 50 до 200 рентген в течение длительных периодов времени (3-4 недели) до разовых доз от 2000 до 6000 рентген. Диапазоны доз радиоизотопов широко варьируются и зависят от периода полураспада изотопа, активности и типа испускаемого излучения, а также поглощения неопластическими клетками.

3. Иммуноterapia

[0234] Специалисту в данной области техники будет понятно, что дополнительные иммунотерапевтические методы можно использовать в комбинации или в сочетании со способами согласно вариантам осуществления изобретения. В контексте лечения рака иммуноterapia, как правило, основана на использовании иммунных эффекторных клеток и молекул для нацеливания и элиминации опухолевых клеток. Ритуксимаб (РИТУКСАН®) является таким примером. Иммунным эффектором может быть, например, антитело, специфичное к определенному маркеру на поверхности опухолевой клетки. Антитело само по себе может служить эффектором терапии или может привлекать другие клетки, чтобы фактически влиять на киллинг клеток. Антитело также может быть конъюгировано с лекарственным средством или токсином (химиотерапевтическим, радионуклидом, А-цепью рицина, холерным токсином, коклюшным токсином и т.д.) и служить в качестве нацеливающего агента. Альтернативно, эффектор может представлять собой лимфоцит, несущий поверхностную молекулу, которая прямо или опосредованно взаимодействует с целевой опухолевой клеткой. Различные эффекторные клетки включают цитотоксические Т-клетки и НК-клетки.

[0235] Конъюгаты антитело-лекарственное средство стали прорывным подходом к разработке методов лечения рака. Рак является одной из ведущих причин смертности в мире. Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) включают моноклональные антитела (MAb), которые ковалентно связаны с лекарственными препаратами, приводящими к киллингу клеток. Такой подход сочетает в себе высокую специфичность моноклональных антител в отношении их антигенных мишеней с высокоэффективными цитотоксическими препаратами, в результате чего появляются «вооруженные» моноклональные антитела, которые доставляют полезную нагрузку (лекарственный препарат) в опухолевые клетки с высокими уровнями антигена. Направленная доставка лекарственного препарата также сводит к минимуму его воздействие на нормальные ткани,

что приводит к снижению токсичности и повышению терапевтического индекса. Одобрение FDA двух препаратов ADC, ADCETRIS® (брентуксимаб ведотин) в 2011 г. и KADCYLA® (трастузумаб эмтанзин или T-DM1) в 2013 г., подтвердило эффективность данного подхода. В настоящее время более 30 кандидатов на лекарственные ADC находятся на различных стадиях клинических испытаний для лечения рака (Leal et al., 2014). Поскольку конструирование антител и оптимизация линкера-полезной нагрузки становятся все более совершенными, то открытие и разработка новых ADC все больше зависит от идентификации и установления новых мишеней, которые подходят для этого подхода, и создания нацеливающих МАб. Двумя критериями для целей ADC являются повышенный/высокий уровень экспрессии в опухолевых клетках и эффективная интернализация.

[0236] В одном аспекте иммунотерапии, опухолевая клетка должна нести определенный маркер, который поддается нацеливанию, т.е. отсутствует на большинстве других клеток. Существует множество опухолевых маркеров, и любой из них может быть подходящим для нацеливания в контексте вариантов осуществления настоящего изобретения. Общие опухолевые маркеры включают CD20, карциноэмбриональный антиген, тирозиназу (p97), gp68, TAG-72, HMFG, сиалиновый антиген Льюиса, MucA, MucB, PLAP, ламининовый рецептор, erb B и p155. Альтернативным аспектом иммунотерапии является сочетание противоопухолевого эффекта с иммуностимулирующим эффектом. Также существуют иммуностимулирующие молекулы, включающие: цитокины, такие как IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, гамма-IFN, хемокины, такие как MIP-1, MCP-1, IL-8 и факторы роста, такой как лиганд FLT3.

[0237] Примерами иммунотерапевтических подходов, которые в настоящее время исследуются или используются, являются иммунные адьюванты, например, *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, динитрохлорбензол и ароматические соединения (патенты США № 5801005 и 5739169; Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides et al., 1998); цитокиновая терапия, например, α , β и γ интерфероны, IL-1, GM-CSF и TNF (Bukowski et al., 1998; Davidson et al., 1998; Hellstrand et al., 1998); генная терапия, например, TNF, IL-1, IL-2 и p53 (Qin et al., 1998; Austin-Ward and Villaseca, 1998; патенты США № 5830880 и 5846945); и моноклональные антитела, например, анти-CD20, анти-ганглиозид GM2 и анти-p185 (Hollander, 2012; Hanibuchi et al., 1998; патент США № 5824311). Полагается, что вместе с терапией антителами, описанной в настоящем документе, можно использовать один или более способов противоопухолевой терапии.

[0238] В некоторых вариантах осуществления препарат для иммунотерапии может представлять собой ингибитор иммунных контрольных точек. Иммунные контрольные точки либо усиливают сигнал (например, костимулирующие молекулы), либо ослабляют сигнал. Ингибиторные иммунные контрольные точки, на которые может быть нацелена блокада иммунных контрольных точек, включают аденозиновый рецептор A2A (A2AR), B7-H3 (также известный как CD276), аттенюатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA), цитотоксический белок 4, ассоциированный с Т-лимфоцитами (CTLA-4), также известный

как CD152), индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), иммуноглобулиноподобные рецепторы клеток-киллеров (KIR), ген активации лимфоцитов-3 (LAG3), белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1), домен Т-клеточного иммуноглобулина и домен-3 муцина (TIM-3) и супрессор Т клеточной активации, содержащий V-домен Ig (VISTA). В частности, ингибиторы иммунных контрольных точек нацелены на ось PD-1 и/или CTLA-4.

[0239] Ингибиторы иммунных контрольных точек могут представлять собой лекарственные средства, такие как небольшие молекулы, рекомбинантные формы лигандов или рецепторов, или, в частности, антитела, такие как антитела человека (например, публикация международной заявки WO2015016718; Pardoll, *Nat. Rev. Cancer*, 12(4): 252-64, 2012; оба источника включены в настоящий документ посредством ссылки). Можно использовать известные ингибиторы белков контрольных точек иммунного ответа или их аналоги, в частности, можно использовать химеризованные, гуманизированные или человеческие формы антител. Как известно специалистам в данной области, для некоторых антител, указанных в настоящем описании, могут использоваться альтернативные и/или эквивалентные названия. Такие альтернативные и/или эквивалентные названия являются взаимозаменяемыми в контексте настоящего изобретения. Например, известно, что ламбролизумаб также известен под альтернативными и эквивалентными названиями МК-3475 и пембролизумаб.

[0240] В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PD-1 с его партнерами по связыванию, лигандами. В конкретном аспекте партнерами по связыванию, лигандами, PD-1 являются PDL1 и/или PDL2. В другом варианте осуществления антагонист связывания PDL1 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PDL1 с его партнерами по связыванию. В конкретном аспекте партнерами по связыванию PDL1 являются PD-1 и/или B7-1. В другом варианте осуществления антагонист связывания PDL2 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PDL2 с его партнерами по связыванию. В конкретном аспекте партнером по связыванию PDL2 является PD-1. Антагонист может представлять собой антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, иммуноадгезин, слитый белок или олигопептид. Типичные антитела описаны в патентах США US8735553, US8354509 и US8008449, которые все включены в настоящий документ посредством ссылки. Другие антагонисты оси PD-1 для применения в способах, описанных в настоящем документе, известны в данной области, например, описанные в заявках на патент США US20140294898, US2014022021 и US20110008369, которые все включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0241] В некоторых вариантах осуществления антагонист, связывающий PD-1, представляет собой анти-PD-1 антитело (например, человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело). В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитело выбрано из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба и CT-011. В некоторых вариантах осуществления антагонист, связывающий PD-1, представляет собой иммуноадгезин (например, иммуноадгезин,

содержащий внеклеточную или PD-1-связывающую область PDL1 или PDL2, слитую с константной областью (например, Fc-участком последовательности иммуноглобулина). В некоторых вариантах осуществления антагонистом связывания PD-1 является AMP-224. Ниволумаб, также известный как MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558 и OPDIVO®, представляет собой анти-PD-1 антитело, описанное в WO 2006/121168. Пембролизумаб, также известный как MK-3475, Merck 3475, ламбролизумаб, KEYTRUDA® и SCH-900475, представляет собой анти-PD-1 антитело, описанное в WO 2009/114335. CT-011, также известный как hBAT или hBAT-1 представляет собой анти-PD-1 антитело, описанное в WO 2009/101611. AMP-224, также известный как B7-DCIg, представляет собой слитый с PDL2-Fc растворимый рецептор, описанный в WO 2010/027827 и WO 2011/066342.

[0242] Другой иммунной контрольной точкой, на которую можно воздействовать в способах, раскрытых в настоящем документе, является цитотоксический белок 4, ассоциированный с Т-лимфоцитами (CTLA-4), также известный как CD152. Полная последовательность кДНК человеческого CTLA-4 имеет идентификационный номер в Genbank L15006. CTLA-4 обнаруживается на поверхности Т-клеток и функционирует в качестве «выключателя» при связывании с CD80 или CD86 на поверхности антигенпрезентирующих клеток. CTLA4 является членом суперсемейства иммуноглобулинов, который экспрессируется на поверхности хелперных Т-клеток и передает ингибирующий сигнал Т-клеткам. CTLA4 сходен с Т-клеточным костимулирующим белком CD28, и обе молекулы связываются с CD80 и CD86, также называемыми B7-1 и B7-2 соответственно, на антигенпрезентирующих клетках. CTLA4 передает ингибирующий сигнал Т-клеткам, тогда как CD28 передает стимулирующий сигнал. Внутриклеточный CTLA4 также обнаружен в регуляторных Т-клетках и может иметь важное значение для их функции. Активация Т-клеток через Т-клеточный рецептор и CD28 приводит к усилению экспрессии CTLA-4, ингибирующего рецептора для молекул B7.

[0243] В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой анти-CTLA-4 антитело (например, человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело), его антигенсвязывающий фрагмент, иммуноадгезин, слитый белок или олигопептид.

[0244] Анти-CTLA-4 антитела человека (или полученные из них домены VH и/или VL), подходящие для применения в способах по настоящему изобретению, можно получить с использованием способов, хорошо известных в данной области. Альтернативно можно использовать известные в данной области анти-CTLA-4 антитела. Например, анти-CTLA-4 антитела раскрыты в следующих документах: US 8119129, WO 01/14424, WO 98/42752; WO 00/37504 (CP675206, также известный как тремелидумаб; ранее тикилидумаб), патент США № 6207156; Hurwitz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(17): 10067-10071; Camacho et al. (2004) J. Clin. Oncology, 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675206); и Mokyr et al. (1998) Cancer Res., 58:5301-5304 можно использовать в способах, раскрытых

здесь. Идея каждой из вышеуказанных публикаций включена в настоящий документ посредством ссылки. Также можно использовать антитела, которые конкурируют с любым из этих известных в данной области антител за связывание с CTLA-4. Например, гуманизованное анти-CTLA-4 антитело описано в международных патентных заявках WO2001014424, WO2000037504 и патенте США № 8017114; которые все включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0245] Типичным анти-CTLA-4 антителом является ипилимумаб (также известный как 10D1, MDX-010, MDX-101 и Yervoy®) или его антигенсвязывающие фрагменты и варианты (см., например, WO 01/14424). В других вариантах осуществления антитело содержит CDR или VR тяжелой и легкой цепи ипилимумаба. Соответственно, в одном варианте антитело содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 области VH ипилимумаба и домены CDR1, CDR2 и CDR3 области VL ипилимумаба. В еще одном варианте антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на CTLA-4, что и вышеуказанные антитела. В другом варианте осуществления антитело имеет, по меньшей мере, примерно 90% идентичность аминокислотной последовательности вариабельной области с вышеуказанными антителами (например, по меньшей мере, примерно 90%, 95% или 99% идентичность вариабельной области с ипилимумабом).

[0246] Другие молекулы для модуляции CTLA-4 включают лиганды и рецепторы CTLA-4, такие как описанные в патентах США US5844905, US5885796 и международных патентных заявках WO1995001994 и WO1998042752; все они включены в настоящий документ посредством ссылки, и иммуноадгезины, такие как описанные в патенте США US8329867, включены сюда посредством ссылки.

4. Хирургия

[0247] Примерно 60% пациентов, больных раком, подвергаются хирургическому вмешательству того или иного типа, которое включает профилактические, диагностические или этапные, лечебные и паллиативные операции. Лечебная хирургия включает резекцию, при которой вся или часть раковой ткани физически удаляется, иссекается и/или разрушается, и может использоваться в сочетании с другими методами лечения, такими как лечение по вариантам осуществления настоящего изобретения, химиотерапия, лучевая терапия, гормональная терапия, генная терапия, иммунотерапия и/или альтернативные методы лечения. Резекция опухоли означает физическое удаление, по меньшей мере, части опухоли. Помимо резекции опухоли хирургическое лечение включает лазерную хирургию, криохирургию, электрохирургию и микрографическую хирургию (операцию Мооса).

[0248] При удалении части или всех опухолевых клеток, ткани или опухоли в организме может образоваться полость. Лечение может осуществляться путем перфузии, прямой инъекции или местного применения дополнительной противораковой терапии. Такое лечение можно повторять, например, каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 суток, или каждые 1, 2, 3, 4 и 5 недель, или каждые 1, 2, 3, 4, 5 недель, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев. Такие методы лечения также могут иметь различные дозировки.

5. Другие агенты

[0249] Полагается, что другие агенты можно использовать в комбинации с некоторыми аспектами вариантов осуществления настоящего изобретения для повышения терапевтической эффективности лечения. Такие дополнительные агенты включают агенты, которые влияют на активацию рецепторов клеточной поверхности и GAP-соединений, цитостатические агенты и агенты дифференцировки, ингибиторы клеточной адгезии, агенты, которые повышают чувствительность гиперпролиферативных клеток к индукторам апоптоза или другие биологические агенты. Увеличение межклеточной передачи сигналов за счет увеличения числа GAP-соединений может усилить антигиперпролиферативный эффект на популяцию соседних гиперпролиферативных клеток. В других вариантах осуществления цитостатические или дифференцировочные агенты можно использовать в сочетании с некоторыми аспектами вариантов осуществления настоящего изобретения для повышения антигиперпролиферативной эффективности лечения. Полагается, что ингибиторы клеточной адгезии повышают эффективность вариантов осуществления настоящего изобретения. Примерами ингибиторов клеточной адгезии являются ингибиторы киназы фокальной адгезии (ФАК) и ловастатин. Кроме того, полагается, что другие агенты, которые повышают чувствительность гиперпролиферативной клетки к апоптозу, такие как антитело с225, можно использовать в сочетании с некоторыми аспектами настоящих вариантов осуществления для повышения эффективности лечения.

IX. Белки

[0250] В рамках настоящего описания, «белок» или «полипептид» относится к молекуле, содержащей, по меньшей мере, три аминокислотных остатка. Как здесь используется, термин «дикий тип» относится к эндогенному варианту молекулы, которая естественным образом встречается в организме. В некоторых вариантах осуществления используются варианты белка или полипептида дикого типа, однако во многих вариантах осуществления изобретения используется модифицированный белок или полипептид. Термины, описанные выше, могут использоваться взаимозаменяемо. «Модифицированный белок», или «модифицированный полипептид», или «вариант» относится к белку или полипептиду, химическая структура которого, в частности, его аминокислотная последовательность, изменена по сравнению с белком или полипептидом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления модифицированный/вариантный белок или полипептид обладает, по меньшей мере, одной модифицированной активностью или функцией (принимая во внимание, что белки или полипептиды могут иметь несколько активностей или функций). В частности, предполагается, что модифицированный/вариантный белок или полипептид может быть изменен в отношении одной активности или функции, сохраняя при этом активность или функцию дикого типа в других отношениях.

[0251] Когда в настоящем документе конкретно упоминается белок, то, как правило, это ссылка на нативный (дикого типа) или рекомбинантный (модифицированный) белок или, необязательно, на белок, в котором удалена любая сигнальная последовательность. Белок можно выделить непосредственно из организма, для которого он является нативным,

получить методами рекомбинантной ДНК/экзогенной экспрессии или получить твердофазным пептидным синтезом (SPPS) или другими методами *in vitro*. В конкретных вариантах осуществления имеются выделенные сегменты нуклеиновой кислоты и рекомбинантные векторы, включающие последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептид (например, антитело или его фрагмент). Термин «рекомбинантный» может использоваться в сочетании с полипептидом или названием конкретного полипептида, и обычно он относится к полипептиду, полученному из молекулы нуклеиновой кислоты, которая подвергалась манипуляциям *in vitro* или которая является продуктом репликации такой молекулы.

[0252] В некоторых вариантах осуществления размер белка или полипептида (дикого типа или модифицированного) может включать, помимо прочего, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500 аминокислотных остатков или более, и любой диапазон, полученный из них, или производное соответствующей аминокислотной последовательности, описанное или указанное здесь. Предполагается, что полипептиды можно мутировать посредством усечения, что делает их короче, чем их соответствующая форма дикого типа, и также их можно модифицировать слиянием или конъюгацией гетерологичного белка или полипептидной последовательности с определенной функцией (например, для нацеливания или локализации, для повышения иммуногенности, в целях очистки и т.д.). В настоящем документе термин «домен» относится к любой отдельной функциональной или структурной единице белка или полипептида и обычно относится к аминокислотной последовательности со структурой или функцией, известной специалисту в данной области.

[0253] Полипептиды, белки или полинуклеотиды, кодирующие такие полипептиды или белки по настоящему изобретению, могут включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 (или любой диапазон, полученный из них) или более вариантных аминокислот или замещений нуклеиновых кислот, или являются, по меньшей мере, на 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (или любой определяемый диапазон) сходными, идентичными или гомологичными, по меньшей мере, или максимум с 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82,

83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 300, 400, 500, 550, 1000 или более последовательными аминокислотами или нуклеиновыми кислотами, или любой диапазон, полученный из них, в SEQ ID NO: 1-61.

[0254] В некоторых вариантах осуществления белок, полипептид или полинуклеотид могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555,

556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999 или 1000 (или любой диапазон, полученный из них) последовательных аминокислот или нуклеотидов в любой из SEQ ID NO: 1-61.

[0255] В некоторых вариантах осуществления полипептид, белок или полинуклеотид могут содержать, по меньшей мере, максимум или точно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280,

281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999 или 1000 (или любой диапазон, полученный из них) последовательных аминокислот или нуклеотидов в SEQ ID NO:1-61, которые, по меньшей мере, максимум или точно являются на 60%, 61%,

62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или на 100% (или любой диапазон, полученный из них) сходными, идентичными или гомологичными с одной из SEQ ID NO:1-61.

[0256] Некоторые аспекты относятся к молекуле нуклеиновой кислоты или полипептиду, начинающейся в положении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685,

686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999 или 1000, любой из SEQ ID NO:1-61 и содержащие, по меньшей мере, максимум или точно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455,

456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999 или 1000 (или любой диапазон, полученный из них) последовательных аминокислот или нуклеотидов в любой из SEQ ID NO:1-61.

[0257] Нуклеотидные, а также белковые, полипептидные и пептидные последовательности различных генов были раскрыты ранее и могут быть найдены в известных компьютеризированных базах данных. Двумя широко используемыми базами данных являются базы данных Genbank и GenPept Национального центра биотехнологической информации (во Всемирной паутине на ncbi.nlm.nih.gov/) и Универсальный протеиновый ресурс (UniProt; во Всемирной паутине на uniprot.org). Кодрующие области этих генов могут быть амплифицированы и/или экспрессированы с использованием методов, раскрытых в настоящем документе или известных специалистам в данной области.

[0258] Полагается, что в композициях по настоящему изобретению содержится примерно от 0,001 мг до примерно 10 мг общего полипептида, пептида и/или белка на мл. Концентрация белка в композиции может составлять примерно, по меньшей мере, примерно или максимум примерно 0,001, 0,010, 0,050, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 мг/мл или более (или любой диапазон, полученный из них).

Х. Наборы по изобретению

[0259] Любая из композиций, описанных здесь, может находиться в наборе. В неограничивающем примере клетки, реагенты для получения клеток, векторы и реагенты для получения векторов и/или их компонентов могут находиться в наборе. В некоторых вариантах осуществления НК-клетки могут находиться в наборе, и они могут экспрессировать или могут не экспрессировать TROP-2-нацеленный рецептор, необязательный цитокин или необязательный «суицидный» ген. Такой набор может содержать или может не содержать один или более реагентов для манипуляций с клетками. Такие реагенты включают, например, небольшие молекулы, белки, нуклеиновые кислоты, антитела, буферы, праймеры, нуклеотиды, соли и/или их комбинации. В набор могут быть включены нуклеотиды, которые кодируют один или более TROP-2-нацеленных рецепторов, продукты «суицидных» генов и/или цитокины. В набор могут быть включены белки, такие как цитокины или антитела, включая моноклональные антитела. Нуклеотиды, которые кодируют компоненты сконструированных CAR-рецепторов, могут быть включены в набор, в том числе, реагенты для их получения.

[0260] В конкретных аспектах набор включает НК-клеточную терапию по настоящему изобретению, и также другую терапию рака. В некоторых случаях набор, в дополнение к вариантам клеточной терапии, также включает второй способ лечения рака, например, такой как химиотерапия, гормональная терапия и/или иммунотерапия. Набор(ы) может быть адаптирован для лечения конкретного рака у субъекта и может включать соответствующие дополнительные способы лечения рака у субъекта.

[0261] Наборы могут содержать соответствующим образом расфасованные по аликвотам композиции по настоящему изобретению. Компоненты наборов могут быть упакованы как в водной среде, так и находиться в лиофилизированной форме. Контейнеры наборов обычно включают, по меньшей мере, один флакон, пробирку, колбу, бутылку, шприц или другое контейнерное устройство, в которое может быть помещен компонент и предпочтительно соответствующим образом расфасован по аликвотам. Если в наборе содержится более одного компонента, то набор также может обычно содержать второй, третий или другой дополнительный контейнер, в который дополнительные компоненты могут быть помещены по отдельности. Однако во флаконе могут содержаться различные комбинации компонентов. Наборы по настоящему изобретению также обычно включают средства для содержания композиции и любых других контейнеров с реагентами в герметичной изоляции для коммерческой продажи. Такие контейнеры могут включать контейнеры для инъекций или формованные пластиковые контейнеры, в которых хранятся

нужные флаконы.

XI. Примеры

[0262] Следующие примеры включены для демонстрации некоторых вариантов осуществления изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что методы, раскрытые в последующих примерах, представляют собой методы, раскрытые авторами изобретения, которые хорошо функционируют при практическом применении изобретения, и, таким образом, могут рассматриваться в качестве составляющих определенных способы его практического применения. Однако специалисты в данной области техники в свете настоящего описания должны понимать, что многие изменения могут быть сделаны в конкретных раскрытых вариантах осуществления и при этом получить аналогичный или подобный результат, не выходя за рамки сущности и объема изобретения.

Пример 1

TROP-2-нацеленные химерные антигенные рецепторы

[0263] Были созданы экспрессирующие конструкции для продукции TROP-2-нацеленного химерного антигенного рецептора (CAR) в дополнение к продукции цитокина IL-15 и «суицидного» гена, индуцибельной каспазы 9 (iC9). Экспрессионные конструкции представляли собой:

Конструкция	SEQ ID NO
iC9mRs7VLVH28H28z15 (ДНК)	1
iC9mRs7VLVH28H28z15 (полипептид)	2
iC9mRS7VHVL28H28icz15 (ДНК)	3
iC9mRS7VHVL28H28icz15 (полипептид)	4
iC9hRs7VLVH28H28z15 (ДНК)	5
iC9hRs7VLVH28H28z15 (полипептид)	6
iC9TROP2VLVH28H28z15 (ДНК)	7
iC9TROP2VLVH28H28z15 (полипептид)	8

Пример 2

Оценка TROP-2 в качестве мишени при PDAC и раке яичника

[0264] Экспрессию мРНК Trop2 анализировали для различных типов рака с использованием набора данных TCGA, показав, что аденокарцинома протоков поджелудочной железы (PDAC) и карцинома яичника имеют высокую экспрессию Trop 2 (фиг. 1А и 2А). Поверхностную экспрессию Trop2 измеряли в различных клеточных линиях PDAC (фиг. 1С), рака яичника (фиг. 2В) и короректального рака (фиг. 3), показав, что эти клетки экспрессируют Trop2.

Пример 3

Конструирование и тестирование TROP2 CAR НК-клеток, полученных из RS7

[0265] Были созданы четыре конструкции CAR, как показано на фиг. 4А, каждая из

которых содержит «суицидный» ген iCas9, scFv из mRS7 или hRS7, шарнирный и трансмембранный домен CD28, костимулирующий домен CD28, внутриклеточный домен CD3-дзета и ген IL-15. На фиг. 4B-10C приведены результаты экспериментов, показывающие эффективность трансфекционной трансдукции полученных CAR, а также цитотоксичность *in vitro* и *in vivo* NK-клеток, экспрессирующих конструкции CAR, против различных опухолевых клеток, экспрессирующих Trop2.

[0266] Конструкцию CAR «#2» модифицировали для замены костимулирующего домена CD28 на костимулирующий домен DAP10 (показан на фиг. 11A). На фиг. 11B-14C приведены результаты экспериментов, показывающие эффективность трансфекции и трансдукции созданных CAR, а также цитотоксичность *in vitro* и *in vivo* NK-клеток, экспрессирующих конструкции CAR, против опухолевых клеток, экспрессирующих Trop2.

Пример 4

Конструирование и тестирование TROP2 CAR НК-КЛЕТОК, полученных из 2G10

[0267] Конструкции CAR были созданы с использованием последовательности scFv, полученной из последовательности антитела 2G10. На фиг. 15 и 16 приведены результаты, показывающие эффективность трансфекции и трансдукции различных конструкций, происходящих из 2G10, по сравнению с конструкциями, происходящими из hRS7, описанными в примере 3. На фиг. 17-21B приведены результаты, показывающие цитотоксичность *in vitro* и *in vivo* NK-клеток, экспрессирующих конструкции CAR, происходящие из 2G10, против опухолевых клеток, экспрессирующих Trop2, по сравнению с НК-клетками, экспрессирующими конструкции, происходящие из hRS7.

[0268] Все способы, раскрытые и заявленные в настоящем документе, могут быть реализованы без излишнего экспериментирования в свете настоящего раскрытия. Хотя композиции и способы по настоящему изобретению были описаны с точки зрения предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что к способам и стадиям или последовательности стадий описанного способа можно применять изменения без отступления от концепции, сущности и объема изобретения. Более конкретно, должно быть понятно, что определенными агентами, которые являются как химически, так и физиологически родственными, можно заменить агенты, описанные здесь, при этом будут достигнуты такие же или подобные результаты. Полагается, что все подобные замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, находятся в пределах сущности, объема и концепции изобретения, которые определяются прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полинуклеотид, который кодирует анти-TROP-2 химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит (i) анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок TROP-2-специфического антитела, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточную область.
2. Полинуклеотид по п.1, где TROP-2-специфическое антитело представляет собой антитело RS7.
3. Полинуклеотид по п.2, где антитело RS7 представляет собой мышинное антитело RS7 (mRS7).
4. Полинуклеотид по п.2, где антитело RS7 представляет собой гуманизированное антитело RS7 (hRS7).
5. Полинуклеотид по любому из пп.1-4, где анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 9.
6. Полинуклеотид по любому из пп.1-5, где анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14.
7. Полинуклеотид по любому из пп.1-6, где анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок содержит первую последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 9, и вторую последовательность, имеющую, по меньшей мере, 85% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 14.
8. Полинуклеотид по любому из пп.1-7, где анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок содержит SEQ ID NO: 9.
9. Полинуклеотид по любому из пп.1-8, где анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок содержит SEQ ID NO: 14.
10. Полинуклеотид по любому из пп.1-9, где анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок содержит SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 14.
11. Полинуклеотид по п.1, где TROP-2-специфическое антитело представляет собой антитело 2G10.
12. Полинуклеотид по п.11, где антитело 2G10 представляет собой мышинное антитело 2G10 (m2G10).
13. Полинуклеотид по п.11, где антитело 2G10 представляет собой человеческое антитело 2G10 (h2G10).
14. Полинуклеотид по любому из пп.11-13, где анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок содержит SEQ ID NO: 44.
15. Полинуклеотид по любому из пп.11-13, где анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок содержит SEQ ID NO: 46.
16. Полинуклеотид по любому из пп.1-15, где анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок представляет собой кодон-оптимизированный анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок.
17. Полинуклеотид по любому из пп.1-16, где трансмембранный домен представляет

собой трансмембранный домен из CD28, альфа-цепи Т-клеточного рецептора, бета-цепи Т-клеточного рецептора, дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD3-дзета, CD3-эпсилон, CD3-гамма, CD3-дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD27, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, ICOS/CD278, GITR/CD357, NKG2D, DAP10 или DAP12.

18. Полинуклеотид по п.17, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD27.

19. Полинуклеотид по п.18, где трансмембранный домен содержит SEQ ID NO: 22.

20. Полинуклеотид по п.17, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28.

21. Полинуклеотид по п.20, где трансмембранный домен содержит SEQ ID NO: 23.

22. Полинуклеотид по п.17, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8.

23. Полинуклеотид по п.22, где трансмембранный домен содержит SEQ ID NO: 24.

24. Полинуклеотид по любому из пп.1-23, где внутриклеточный домен представляет собой внутриклеточный домен из CD3-дзета, CD27, CD28, 4-1BB, DAP12, NKG2D, OX-40 (CD134), DAP10, CD40L, 2B4, DNAM, CS1, CD48, NKp30, NKp44, NKp46 или NKp80.

25. Полинуклеотид по п.24, где внутриклеточный домен представляет собой внутриклеточный домен CD3-дзета.

26. Полинуклеотид по п.25, где внутриклеточный домен содержит SEQ ID NO: 29.

27. Полинуклеотид по п.24, где внутриклеточный домен представляет собой внутриклеточный домен CD28.

28. Полинуклеотид по любому из пп.1-26, где CAR содержит два или более внутриклеточных домена.

29. Полинуклеотид по п.28, где два или более внутриклеточных домена содержат внутриклеточный домен CD3-дзета и дополнительный внутриклеточный домен, выбранный из внутриклеточного домена из CD28, DAP10, DAP12, 4-1BB, NKG2D и 2B4.

30. Полинуклеотид по пп.28 или 29, где два или более внутриклеточных домена содержат внутриклеточный домен CD3-дзета и внутриклеточный домен CD28.

31. Полинуклеотид по пп.28 или 29, где два или более внутриклеточных домена содержат внутриклеточный домен CD3-дзета и внутриклеточный домен DAP10.

32. Полинуклеотид по любому из пп.1-31, дополнительно содержащий сигнальный пептид.

33. Полинуклеотид по п.32, где сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид из CD8, CD27, рецептора гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GMSCF-R), тяжелой цепи Ig (IgH), CD3 или CD4.

34. Полинуклеотид по п.33, где сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид GMSCF-R.

35. Полинуклеотид по пп.33 или 34, где сигнальный пептид содержит SEQ ID NO: 21.

36. Полинуклеотид по п.33, где сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид IgH.
37. Полинуклеотид по п.36, где сигнальный пептид содержит SEQ ID NO: 20.
38. Полинуклеотид по любому из пп.1-37, где CAR содержит сигнальный пептид IgH, анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок антитела RS7, трансмембранный домен CD28 и внутриклеточный домен CD3-дзета.
39. Полинуклеотид по любому из пп.1-38, где полинуклеотид также кодирует дополнительный представляющий интерес полипептид.
40. Полинуклеотид по п.39, где последовательность, кодирующая дополнительный представляющий интерес полипептид, и последовательность, кодирующая CAR, разделены в полинуклеотиде элементом 2A.
41. Полинуклеотид по п.40, где элемент 2A представляет собой элемент E2A.
42. Полинуклеотид по п.41, где элемент E2A содержит SEQ ID NO: 38.
43. Полинуклеотид по любому из пп.39-42, где дополнительный представляющий интерес полипептид представляет собой терапевтический белок или белок, который повышает клеточную активность, экспансию и/или сохранность.
44. Полинуклеотид по любому из пп.39-43, где дополнительный представляющий интерес полипептид представляет собой продукт «суицидного» гена, цитокин или человеческий или вирусный белок, который повышает пролиферацию, экспансию и/или метаболическую адаптацию.
45. Полинуклеотид по любому из пп.39-44, где дополнительный представляющий интерес полипептид представляет собой цитокин.
46. Полинуклеотид по п.45, где цитокин представляет собой IL-15, IL-2, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23 или IL-7.
47. Полинуклеотид по п.46, где цитокин представляет собой IL-15.
48. Полинуклеотид по п.47, где цитокин содержит SEQ ID NO: 37.
49. Полинуклеотид по любому из пп.39-48, где дополнительный представляющий интерес полипептид представляет собой продукт «суицидного» гена.
50. Полинуклеотид по п.49, где продукт «суицидного» гена представляет собой каспазу 9.
51. Полинуклеотид по пп.49 или 50, где полинуклеотид кодирует последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичность с SEQ ID NO: 42.
52. Полинуклеотид по п.51, где полинуклеотид кодирует SEQ ID NO: 42.
53. Полинуклеотид по любому из пп.1-52, где полинуклеотид кодирует последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2.
54. Полинуклеотид по п.53, где полинуклеотид кодирует SEQ ID NO: 2.
55. Полинуклеотид по п.54, где полинуклеотид содержит SEQ ID NO: 1.
56. Полинуклеотид по любому из пп.1-52, где полинуклеотид кодирует последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95% идентичность последовательности

с SEQ ID NO: 61.

81. Полинуклеотид по п.80, где полинуклеотид кодирует SEQ ID NO: 61.
82. Полинуклеотид по п. 81, где полинуклеотид содержит SEQ ID NO: 60.
83. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп.1-82.
84. Вектор по п.83, где вектор представляет собой вирусный вектор.
85. Вектор по п.84, где вирусный вектор представляет собой аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный вектор, лентивирусный вектор или ретровирусный вектор.
86. Вектор по п.83, где вектор представляет собой невирусный вектор.
87. Вектор по п.86, где невирусный вектор представляет собой плазмиду.
88. Иммунная клетка, содержащая полинуклеотид по любому из пп.1-55 или вектор по любому из пп.83-87.
89. Иммунная клетка по п.88, где иммунная клетка представляет собой естественную клетку-киллер (NK), Т-клетку, гамма-дельта-Т-клетку, альфа-бета-Т-клетку, инвариантную NKT-клетку (iNKT), В-клетку, макрофаг, мезенхимальную стромальную клетку или дендритную клетку.
90. Иммунная клетка по п.89, где иммунная клетка представляет собой NK-клетку.
91. Иммунная клетка по п.90, где NK-клетка получена из пуповинной крови, периферической крови, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, гемопоэтических стволовых клеток, костного мозга или из клеточной линии.
92. Иммунная клетка по п.91, где NK-клетка получена из клеточной линии, где линия NK-клеток представляет собой NK-92.
93. Иммунная клетка по п.91, где NK-клетка получена из мононуклеарной клетки пуповинной крови.
94. Иммунная клетка по любому из пп.90-93, где NK-клетка представляет собой CD56⁺ NK-клетку.
95. Иммунная клетка по любому из пп.90-94, где NK-клетка экспрессирует рекомбинантный цитокин.
96. Иммунная клетка по п.95, где цитокин представляет собой IL-15, IL-2, IL-12, IL-18, IL-21, IL-7 или IL-23.
97. Иммунная клетка по п.96, где цитокин представляет собой IL-15.
98. Иммунная клетка по любому из пп.88-97, где экспрессия одного или более эндогенных генов в иммунной клетке модифицирована.
99. Иммунная клетка по п.98, где один или более генов содержат NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5, CD7, CTLA-4, TDAG8, CD38 или их комбинацию.
100. Популяция иммунных клеток, содержащая иммунную клетку по любому из пп.88-99.
101. Способ киллинга TROP-2-положительных клеток у субъекта, включающий

введение субъекту эффективного количества клеток, содержащих полинуклеотид по любому из пп.1-55.

102. Способ по п.101, где клетки, содержащие полинуклеотид, представляют собой иммунные клетки.

103. Способ по п.102, где иммунные клетки представляют собой НК-клетки, Т-клетки, гамма-дельта-Т-клетки, альфа-бета-Т-клетки, инвариантные НКТ-клетки (iNKT), В-клетки, макрофаги, дендритные клетки или их смесь.

104. Способ по п.103, где иммунные клетки содержат НК-клетки, где НК-клетки происходят из пуповинной крови, периферической крови, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, гемопоэтических стволовых клеток, костного мозга, из клеточной линии или их смеси.

105. Способ по п.104, где НК-клетки получают из мононуклеарных клеток пуповинной крови.

106. Способ по любому из пп.102-105, где иммунные клетки являются аллогенными по отношению к субъекту.

107. Способ по любому из пп.102-105, где иммунные клетки являются аутологичными по отношению к субъекту.

108. Способ по любому из пп.101-107, где субъект представляет собой человека.

109. Способ по любому из пп.101-108, где у субъекта имеется рак.

110. Способ по п.109, где у субъекта имеется рак молочной железы, острый миелоидный лейкоз, множественная миелома или глиобластома.

111. Способ по любому из пп.101-110, где клетки, содержащие полинуклеотид, вводят субъекту один раз или более одного раза.

112. Способ по п.111, где продолжительность времени между введениями клеток, содержащих полинуклеотид, субъекту составляет 1-24 ч, 1-7 суток, 1-4 недели, 1-12 месяцев или один или более лет.

113. Способ по любому из пп.101-112, дополнительно включающий стадию обеспечения субъекту эффективного количества дополнительной терапии.

114. Способ по п.113, где дополнительная терапия включает хирургическое вмешательство, лучевую терапию, генную терапию, иммунотерапию или гормональную терапию.

115. Способ по любому из пп.101-114, где клетки, содержащие полинуклеотид, вводят субъекту путем инъекции, внутривенно, внутриартериально, внутрибрюшинно, интратрахеально, интратуморально, внутримышечно, эндоскопически, внутриочаговым введением, интракраниально, чрескожно, подкожно, регионально, путем перфузии в микроокружении опухоли, или их комбинацией.

116. Способ по любому из пп.101-115, дополнительно включающий идентификацию TROP-2-положительного рака у субъекта.

117. Способ по любому из пп.101-116, дополнительно включающий получение клеток, содержащих полинуклеотид.

118. Полинуклеотид, который кодирует:

(a) анти-TROP-2 химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит (i) анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок антитела RS7, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточную область;

(b) IL-15; и

(c) каспазу 9.

119. Полинуклеотид по п.118, где антитело RS7 представляет собой мышинное антитело RS7.

120. Полинуклеотид по п.118, где антитело RS7 представляет собой гуманизированное антитело RS7.

121. Полинуклеотид, который кодирует:

(a) анти-TROP-2 химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит (i) анти-TROP-2 антигенсвязывающий участок антитела 2G10, (ii) трансмембранный домен и (iii) внутриклеточную область;

(b) IL-15; и

(c) каспазу 9.

122. Полинуклеотид по п.121, где антитело 2G10 представляет собой мышинное антитело 2G10.

123. Полинуклеотид по п.121, где антитело 2G10 представляет собой гуманизированное антитело 2G10.

124. NK-клетка, содержащая полинуклеотид по любому из пп. 118-123.

125. Естественная клетка-киллер, содержащая:

(a) первый полинуклеотид, кодирующий анти-TROP-2 химерный антигенный рецептор;

(b) второй полинуклеотид, кодирующий IL-15; и

(c) третий полинуклеотид, кодирующий каспазу 9.

126. Естественная клетка-киллер по п.125, где первый полинуклеотид, второй полинуклеотид и третий полинуклеотид находятся в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты.

127. Естественная клетка-киллер по п.125, где первый полинуклеотид, второй полинуклеотид и третий полинуклеотид находятся в двух разных молекулах нуклеиновой кислоты.

128. Естественная клетка-киллер по п.125, где первый полинуклеотид, второй полинуклеотид и третий полинуклеотид находятся в трех разных молекулах нуклеиновой кислоты.

129. Полинуклеотид, который кодирует SEQ ID NO: 2.

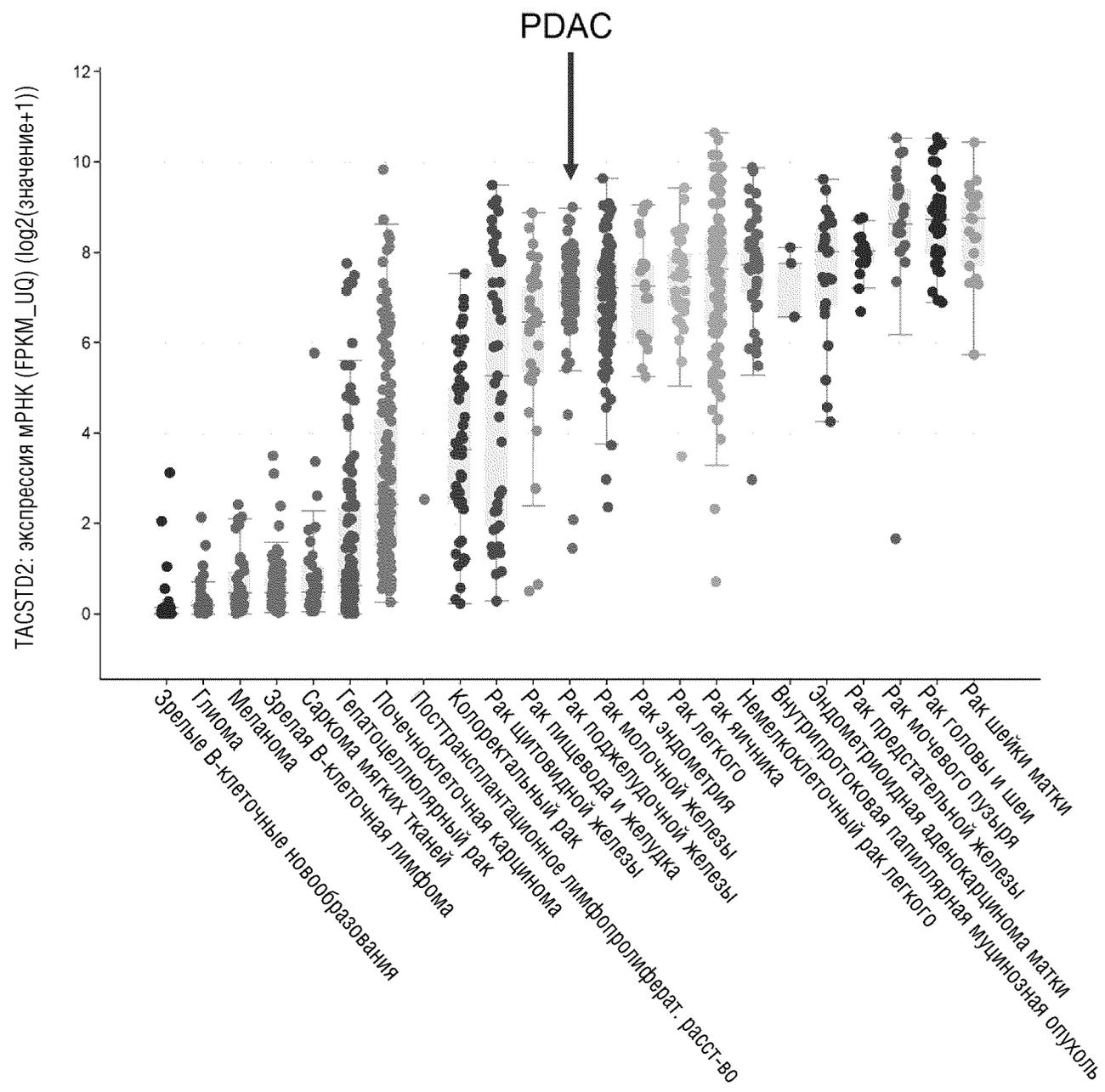
130. Полинуклеотид по п.129, где полинуклеотид содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO: 1.

131. Полинуклеотид по п.130, где полинуклеотид содержит SEQ ID NO: 1.

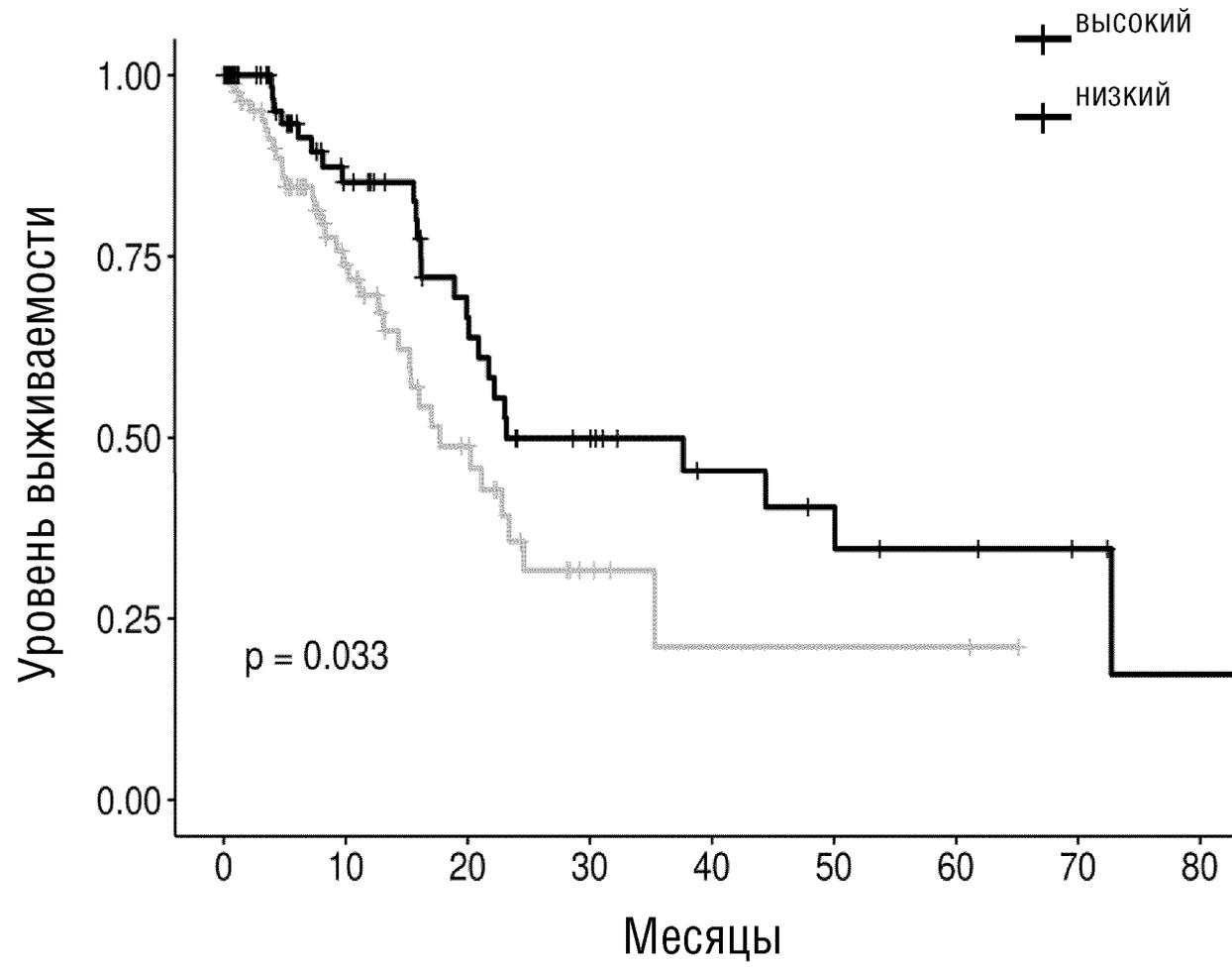
132. Полинуклеотид, который кодирует SEQ ID NO: 4.

133. Полинуклеотид по п. 132, где полинуклеотид содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO: 3.
134. Полинуклеотид по п.133, где полинуклеотид содержит SEQ ID NO: 3.
135. Полинуклеотид, который кодирует SEQ ID NO: 6.
136. Полинуклеотид по п.135, где полинуклеотид содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO: 5.
137. Полинуклеотид по п. 136, где полинуклеотид содержит SEQ ID NO: 5.
138. Полинуклеотид, который кодирует SEQ ID NO: 8.
139. Полинуклеотид по п. 138, где полинуклеотид содержит последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90% идентичность с SEQ ID NO: 7.
140. Полинуклеотид по п. 139, где полинуклеотид содержит SEQ ID NO: 7.

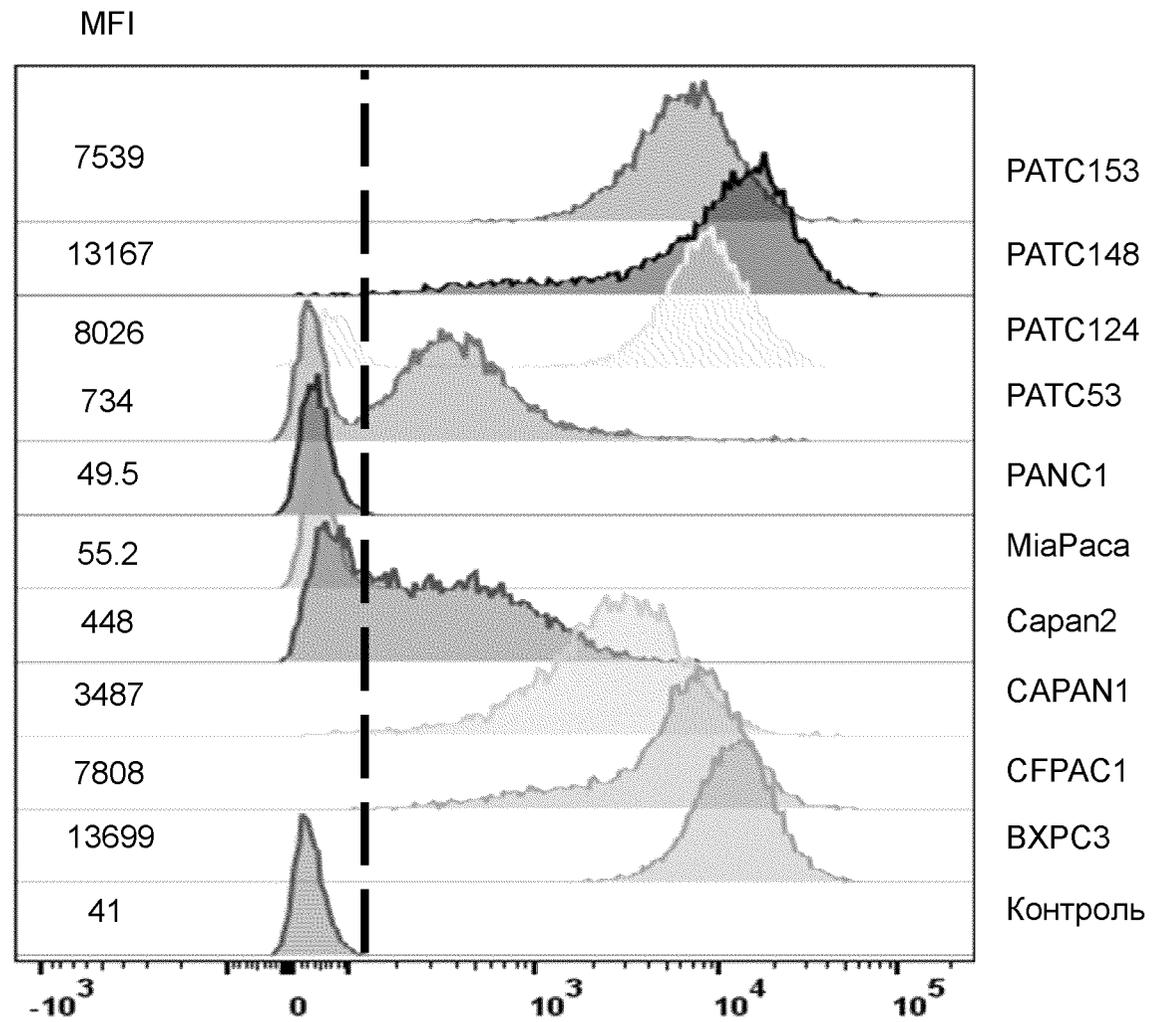
ФИГ.1А



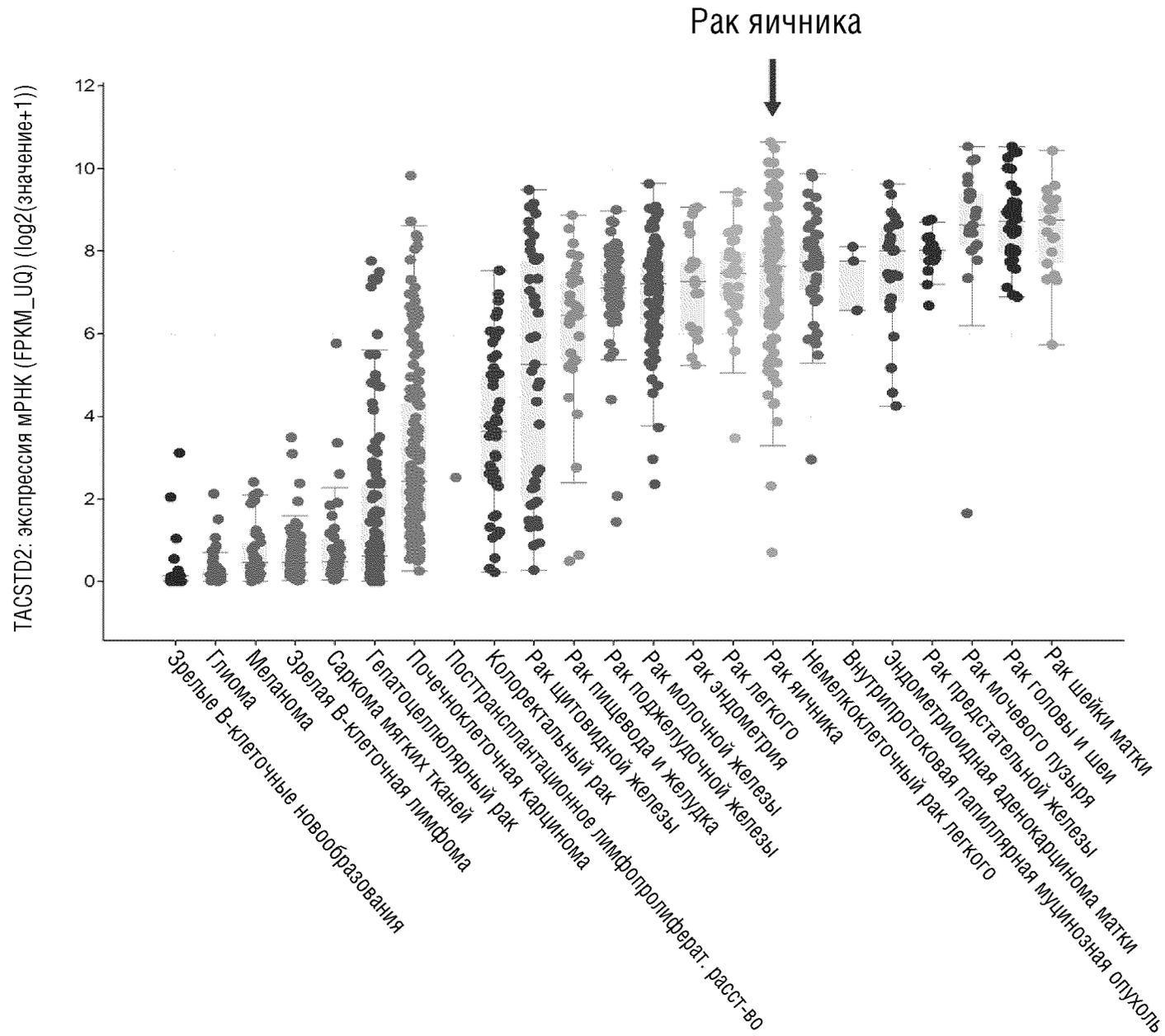
ФИГ.1В



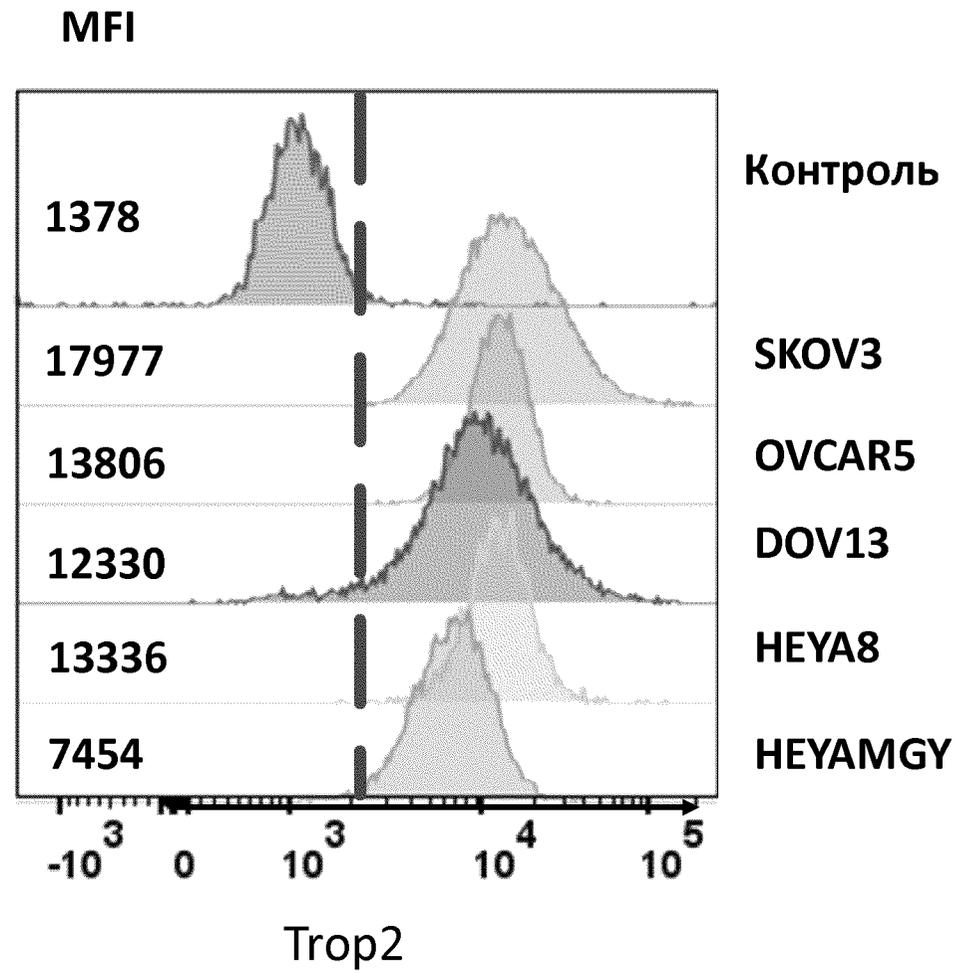
ФИГ.1С



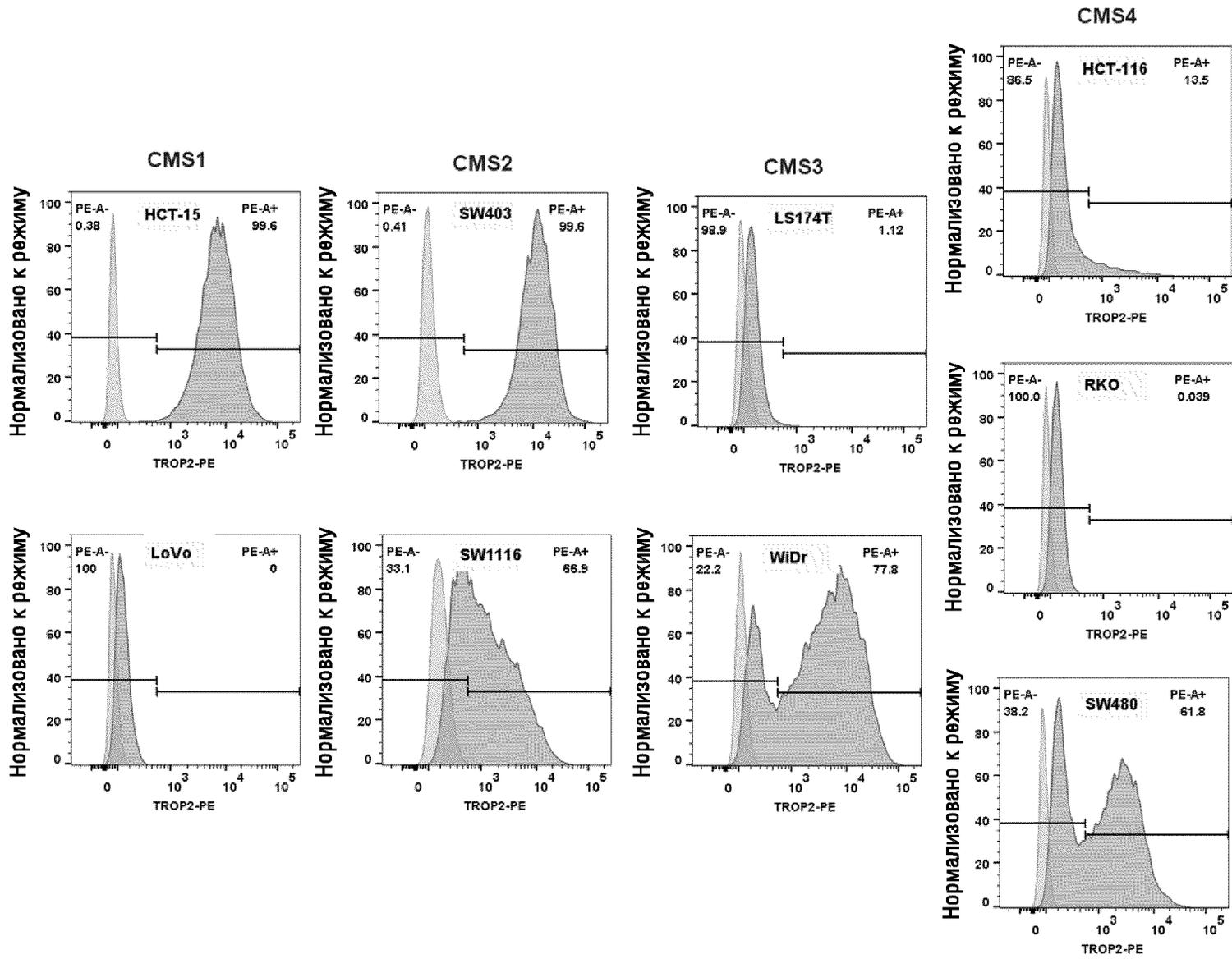
ФИГ.2А



ФИГ.2В



ФИГ.3



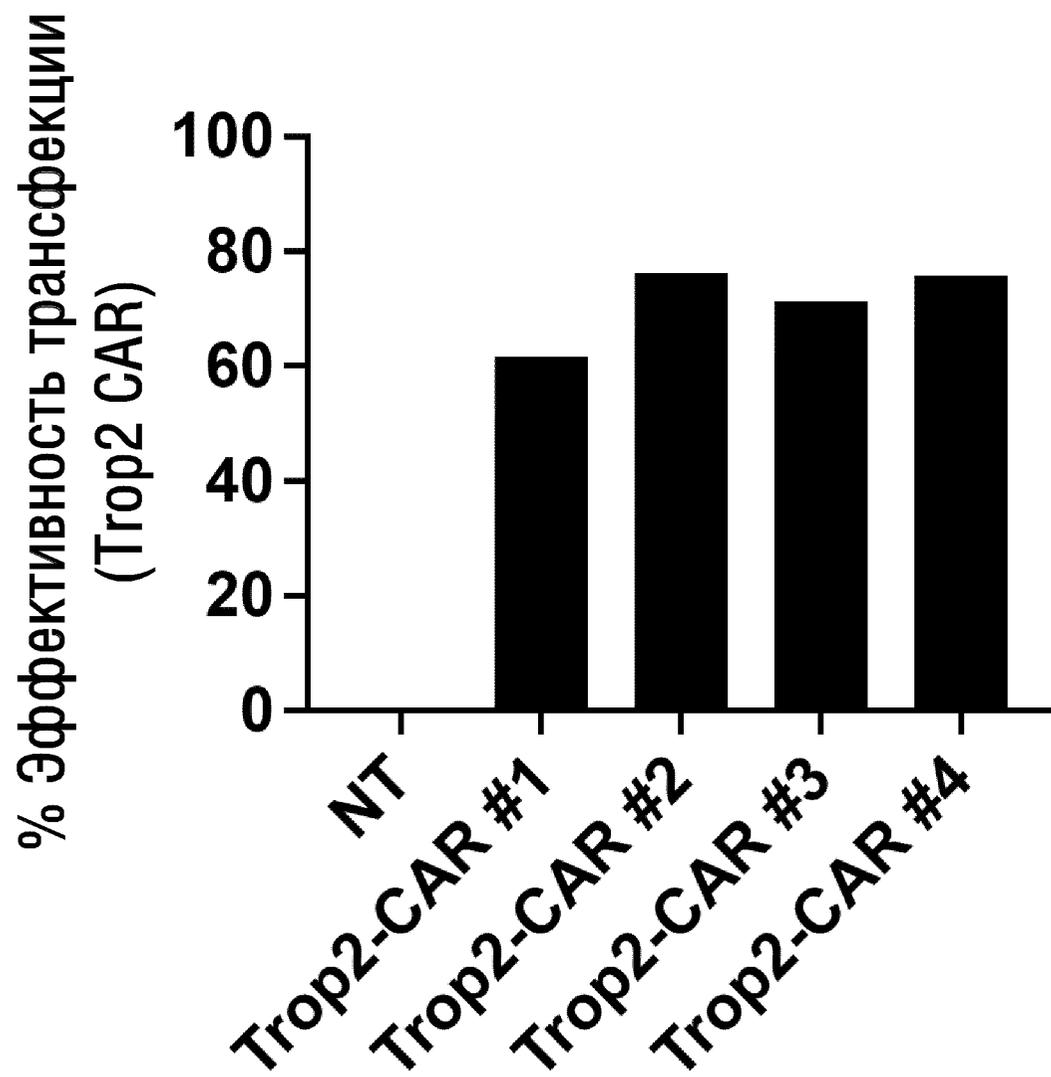
ФИГ.4А

iCas9	Trop2.scFv hRS7 VH/VL	CD28 шарнир + TMD	CD28 костимул.	CD3z	IL15
iCas9	Trop2.scFv hRS7 VL/VH	CD28 шарнир + TMD	CD28 костимул.	CD3z	IL15
iCas9	Trop2.scFv mRS7 VH/VL	CD28 шарнир + TMD	CD28 костимул.	CD3z	IL15
iCas9	Trop2.scFv mRS7 VL/VH	CD28 шарнир + TMD	CD28 костимул.	CD3z	IL15

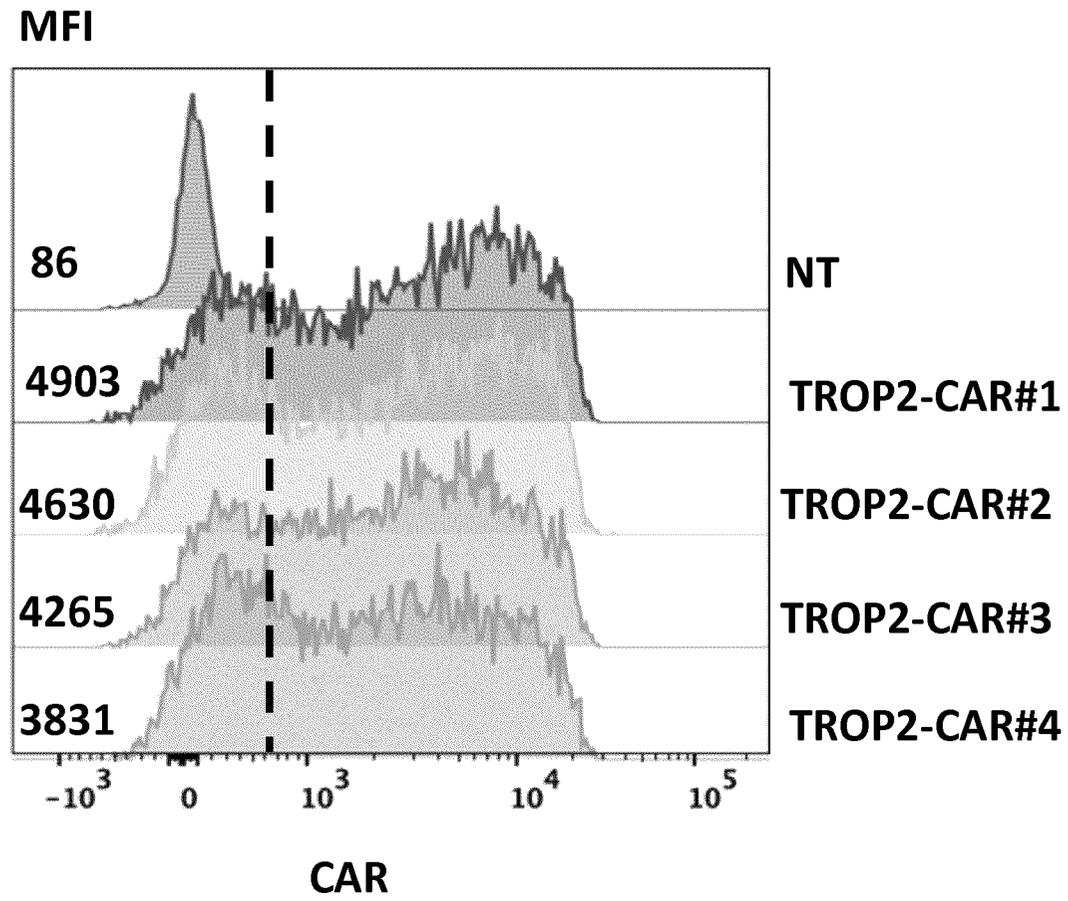
scFv: последовательность, основанная на последовательности антитела сацитузумаба говитекана-hziy (RS7)

- Вариант #1: гуманизированное (h)RS7 | VH/VL
- Вариант #2: hRS7 | VL/VH
- Вариант #3: мышинное (m) RS7 | VH/VL
- Вариант #4: mRS7 | VL/VH

ФИГ.4В

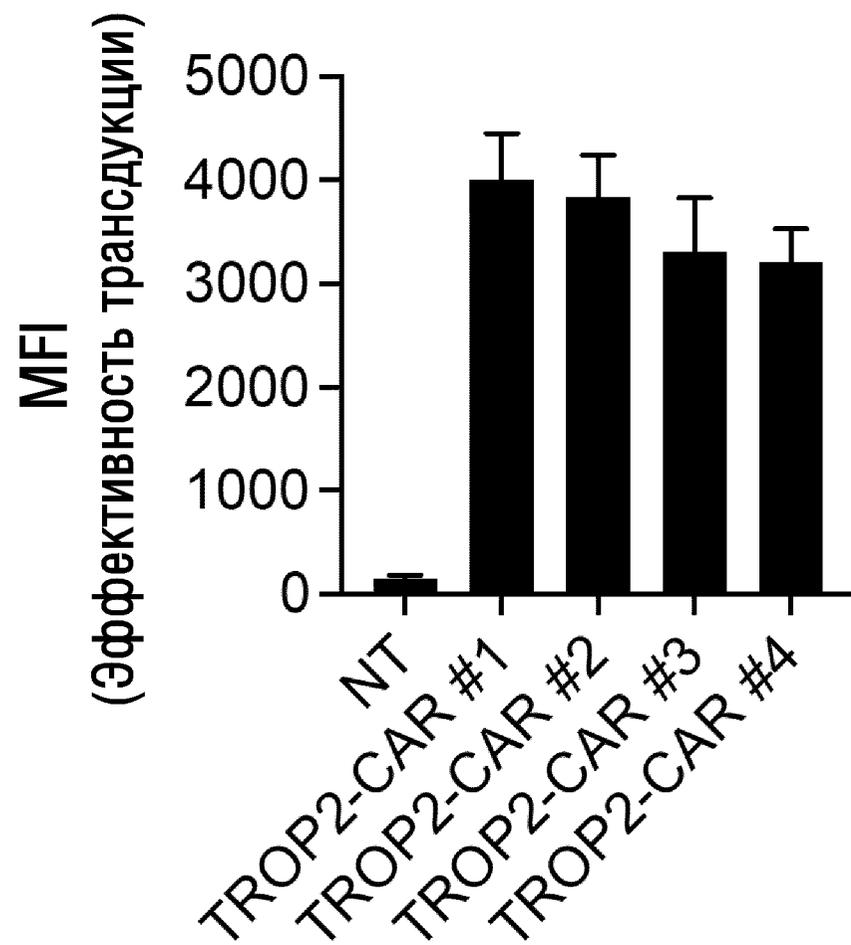


Фиг.5А

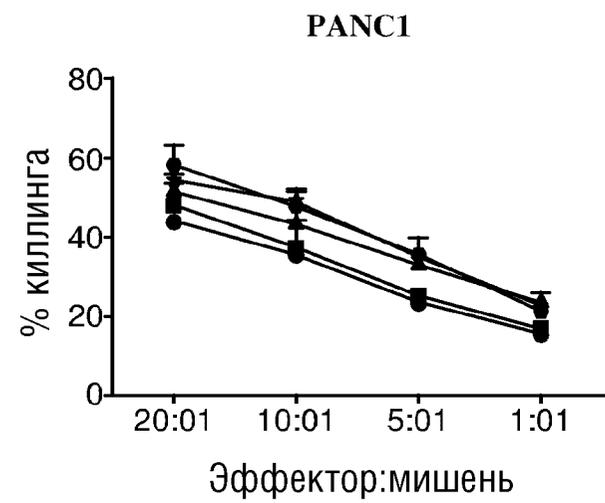
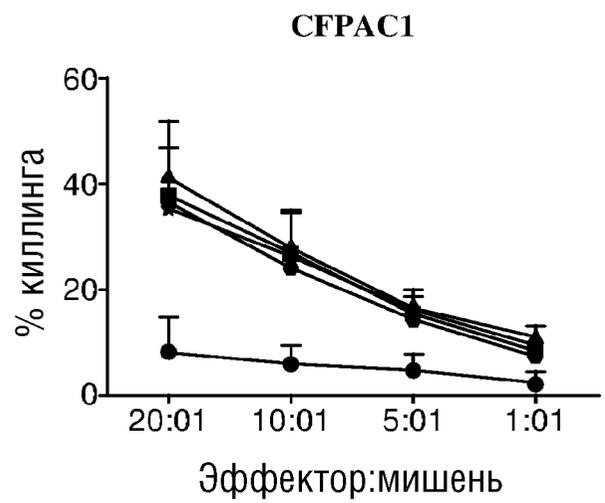


9/33

ФИГ.5В

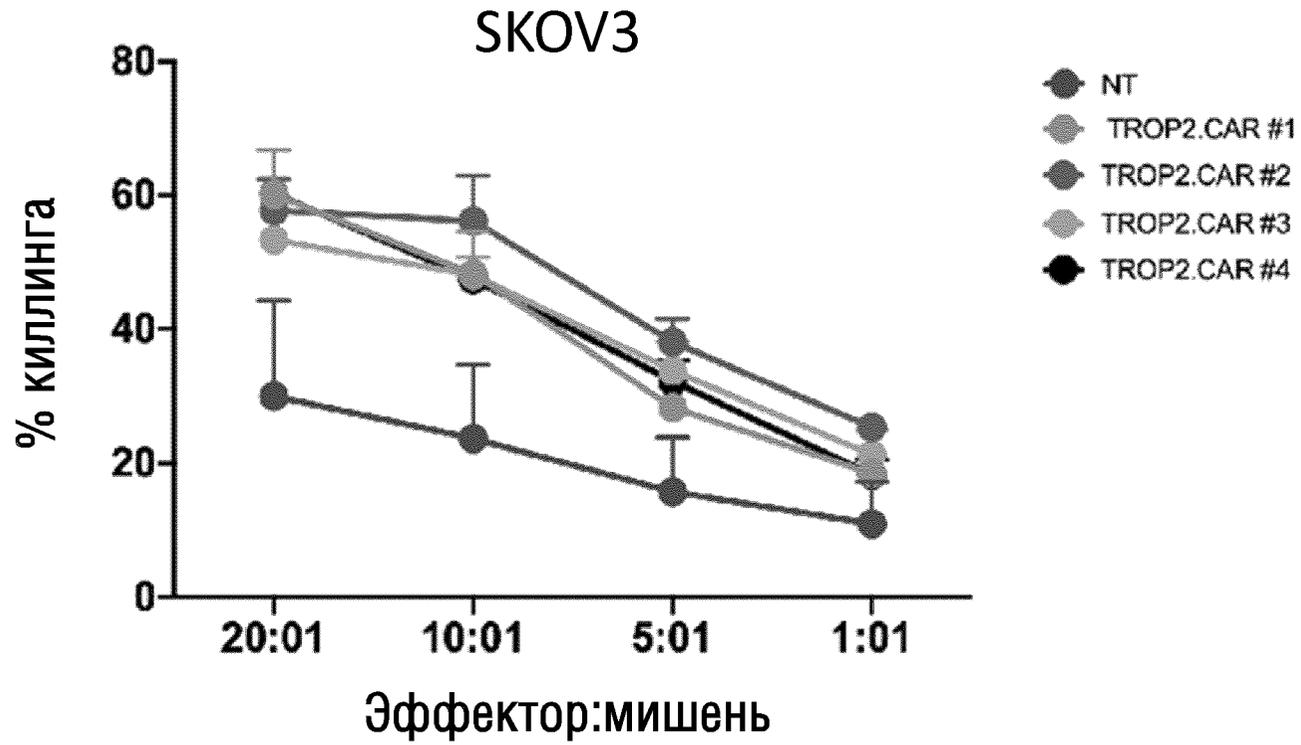


ФИГ.6

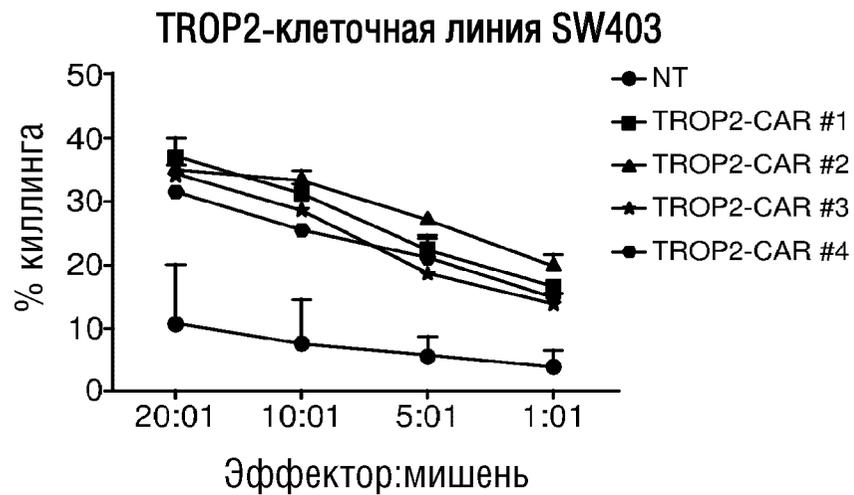


- NT
- TROP2-CAR #1
- ▲ TROP2-CAR #2
- ★ TROP2-CAR #3
- ◆ TROP2-CAR #4

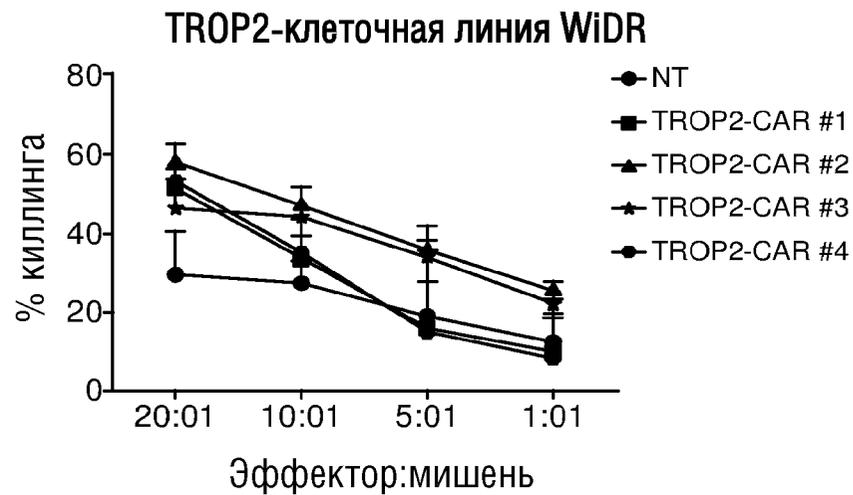
ФИГ.7



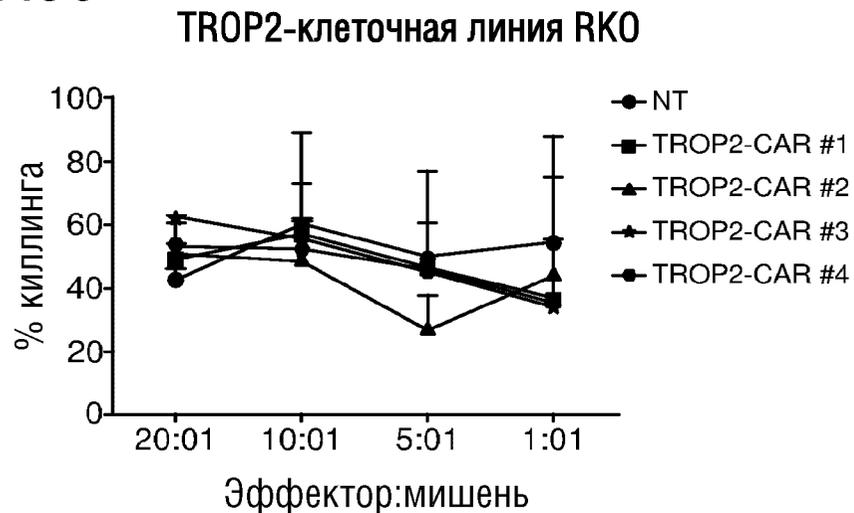
ФИГ.8А



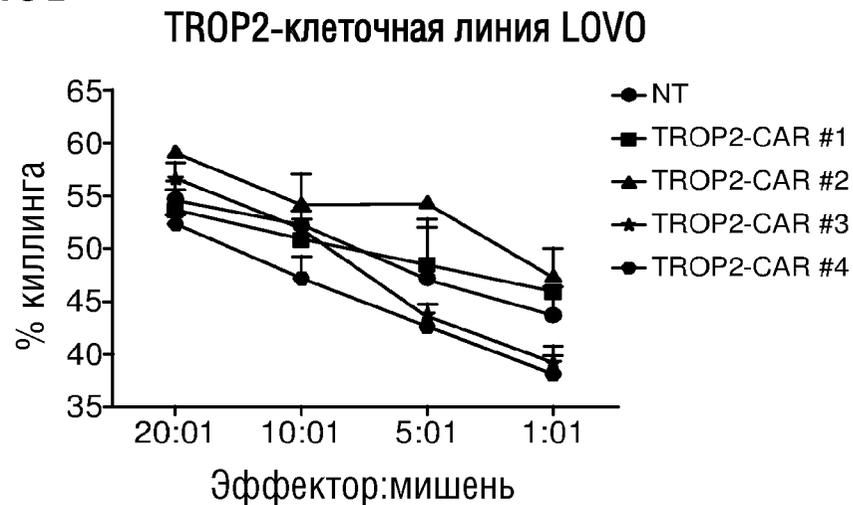
ФИГ.8В



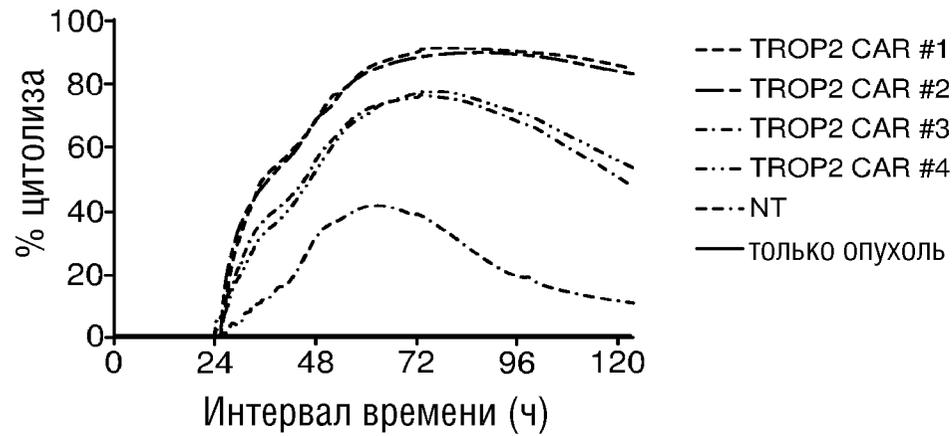
ФИГ.8С



ФИГ.8D

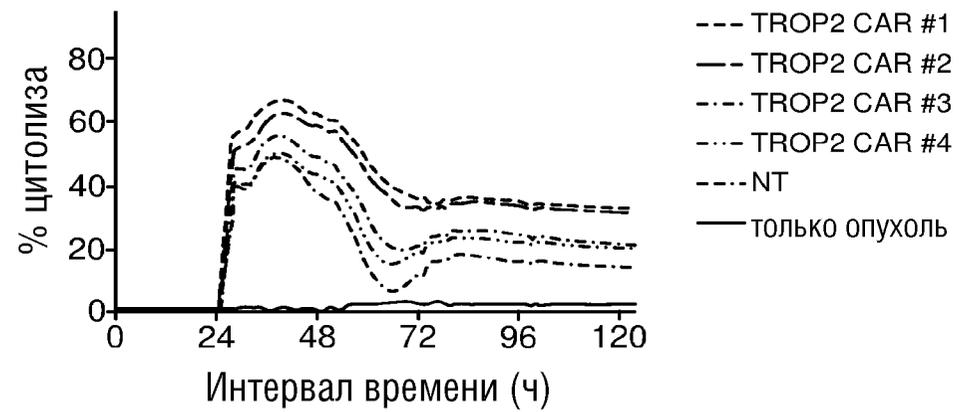


ФИГ.9А

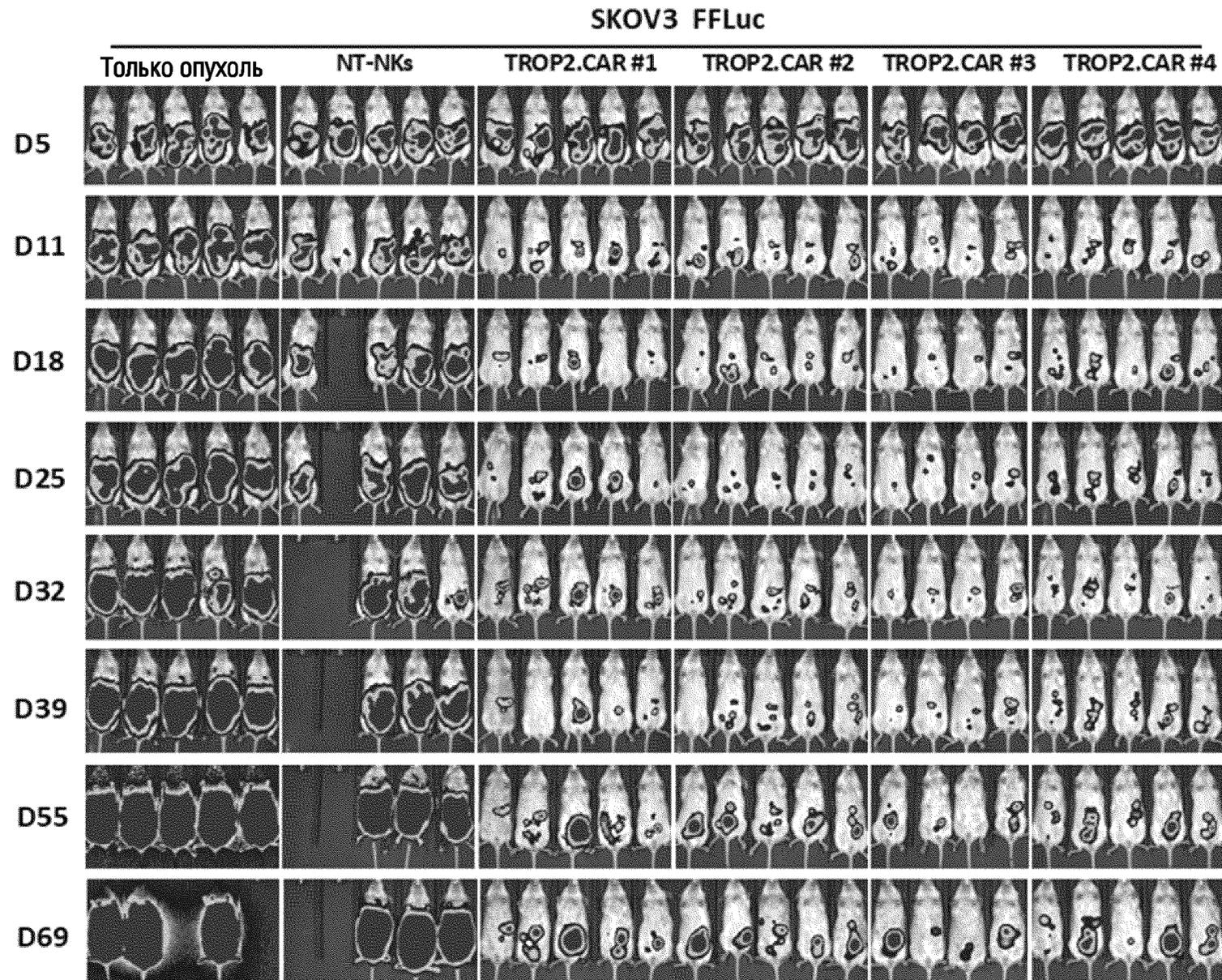


ФИГ.9В

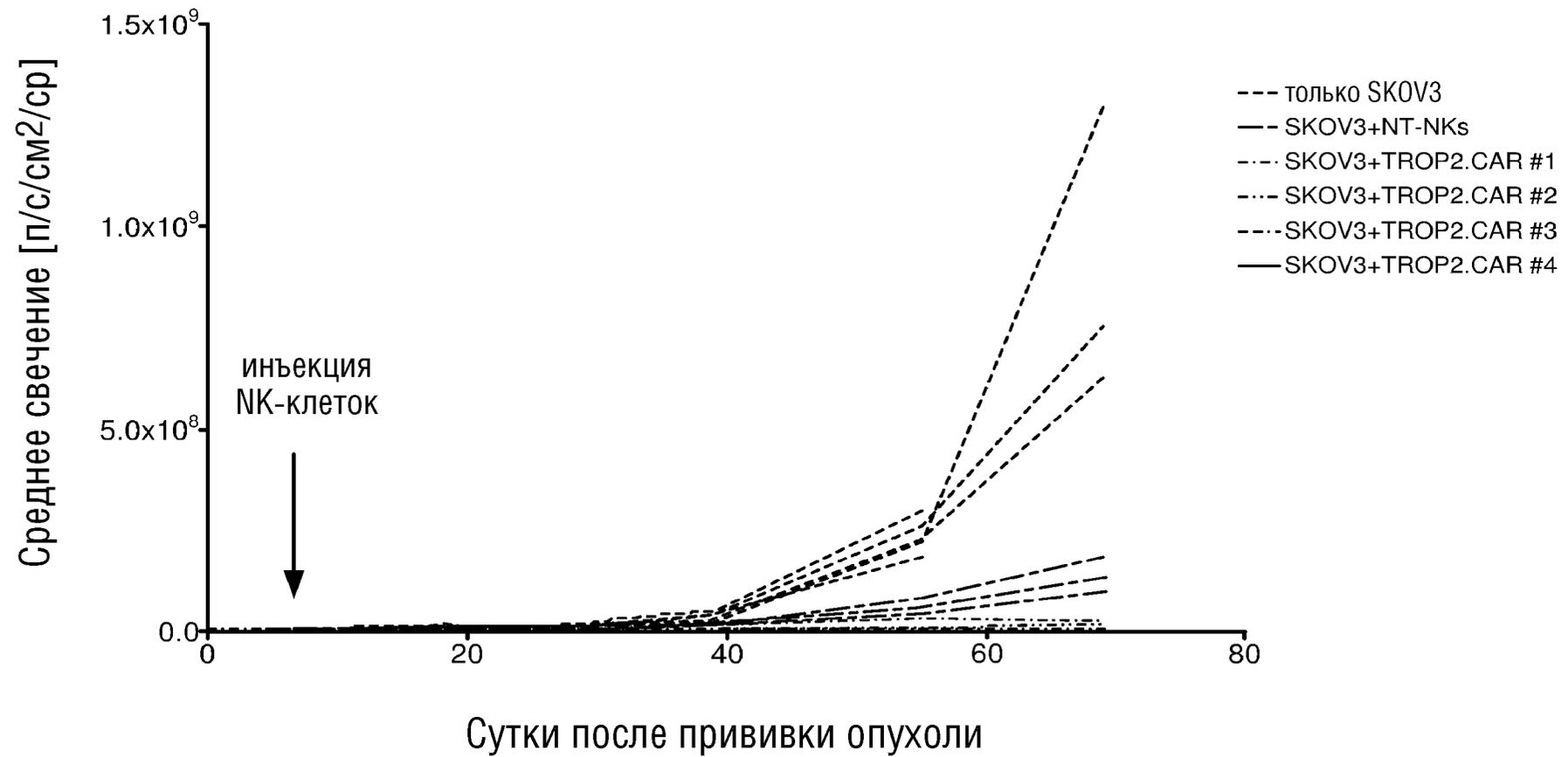
РКО (TROP2 -); CB60



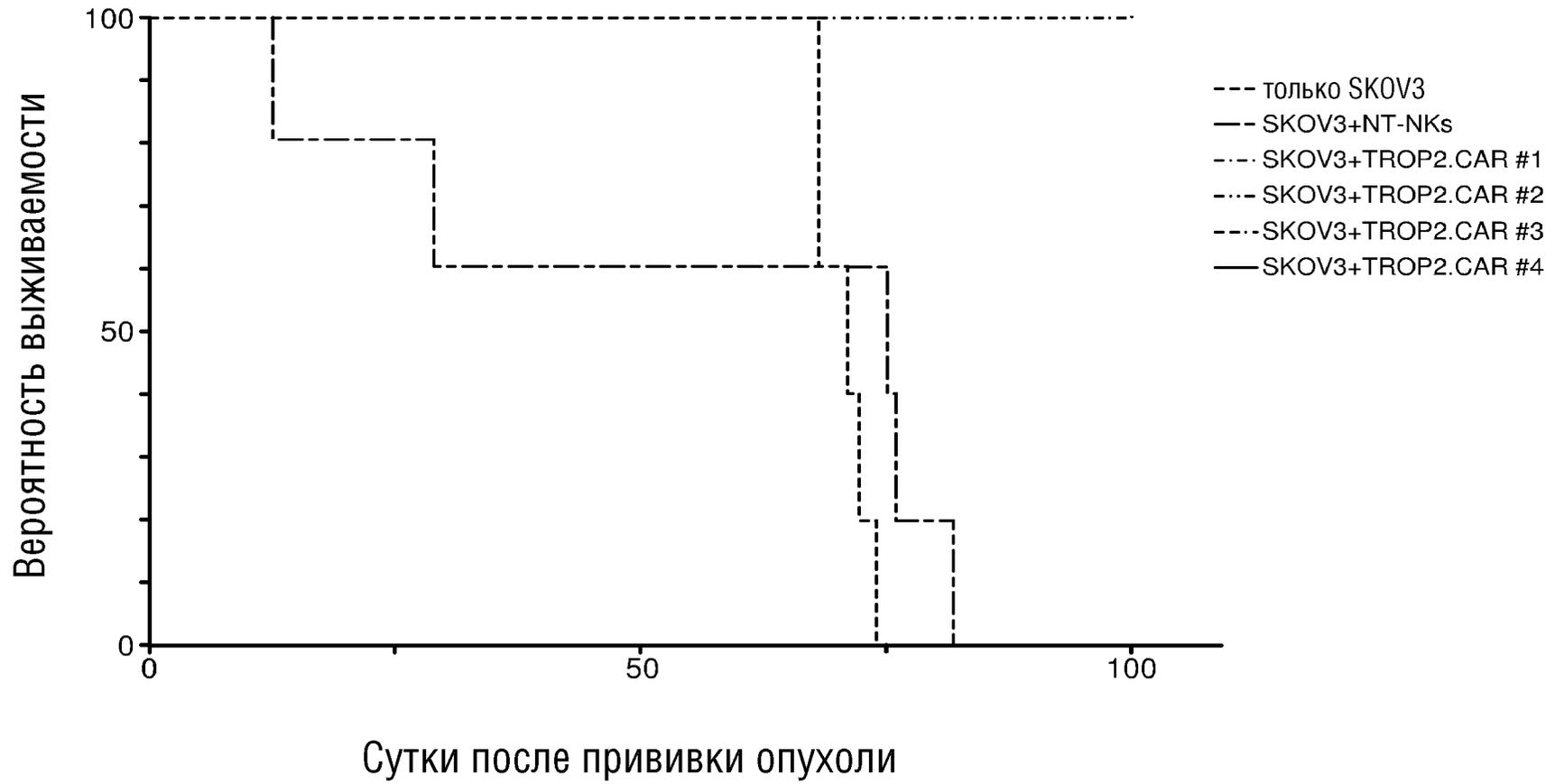
ФИГ.10А



ФИГ.10В



ФИГ.10С



ФИГ.11А

Вариант #2: hRS7 | VL/VH

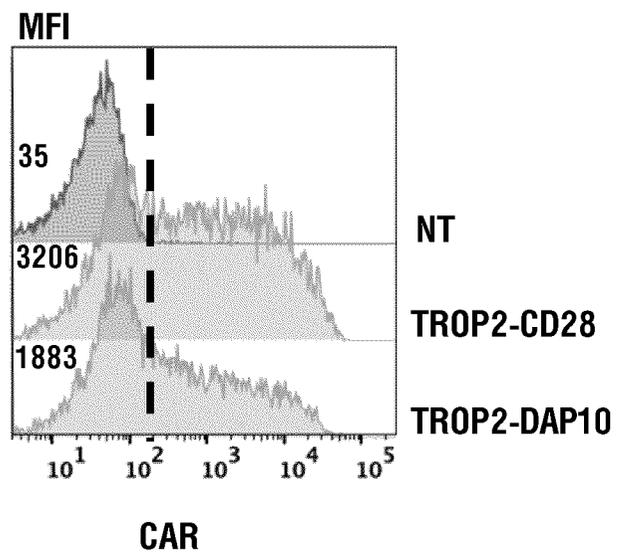
TROP2-CD28



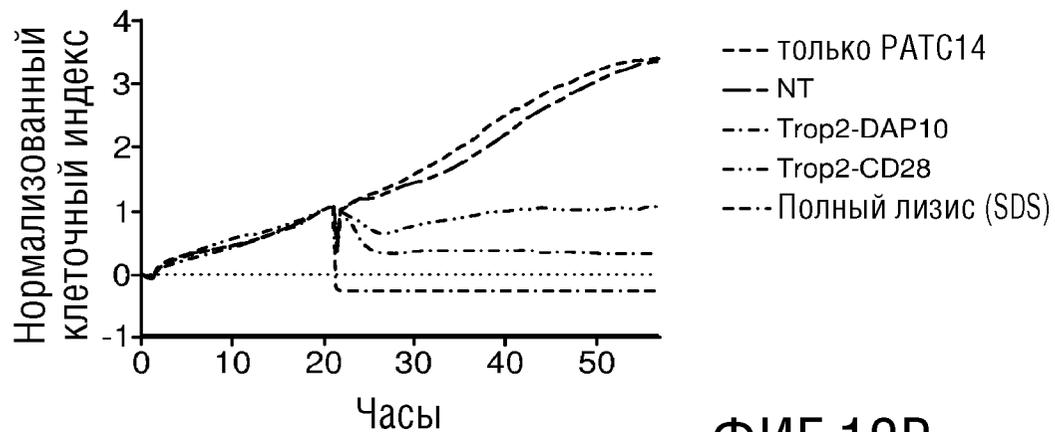
TROP2-DAP10



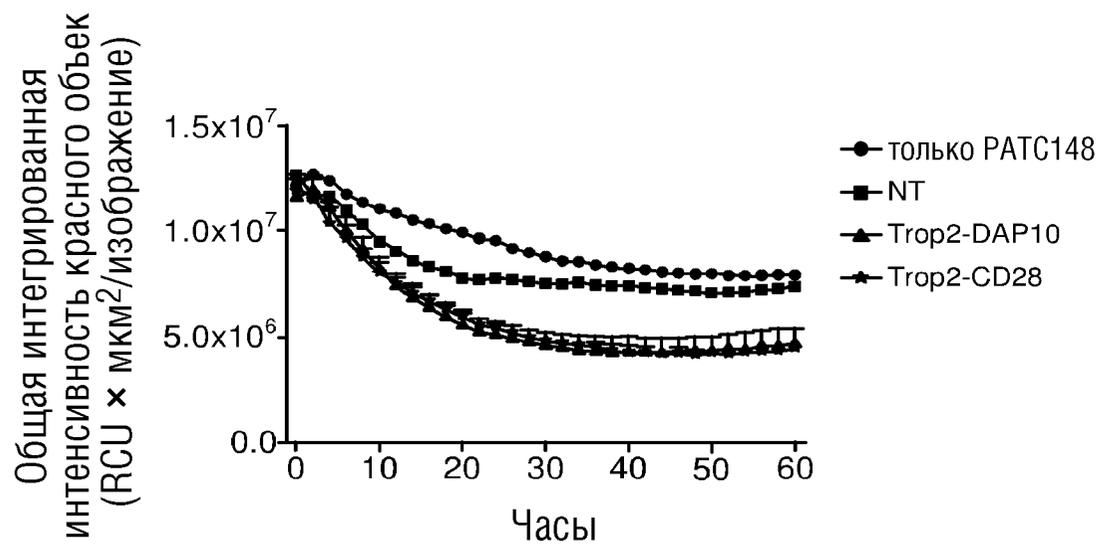
ФИГ.11В



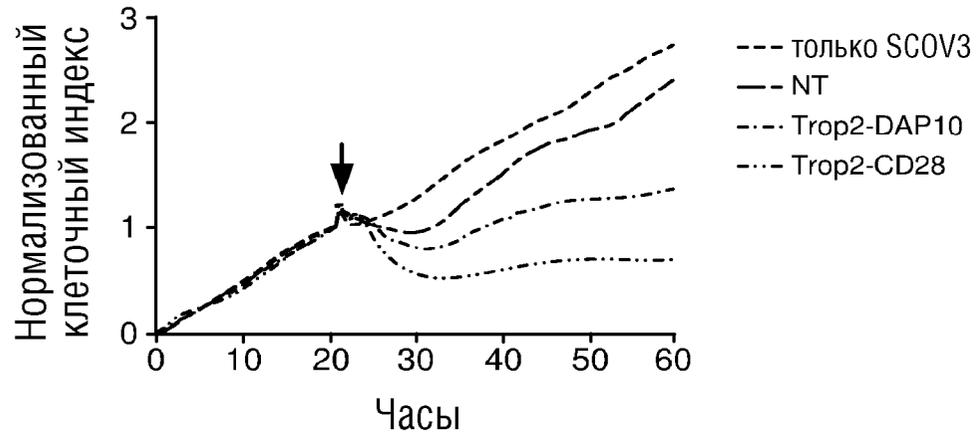
ФИГ.12А



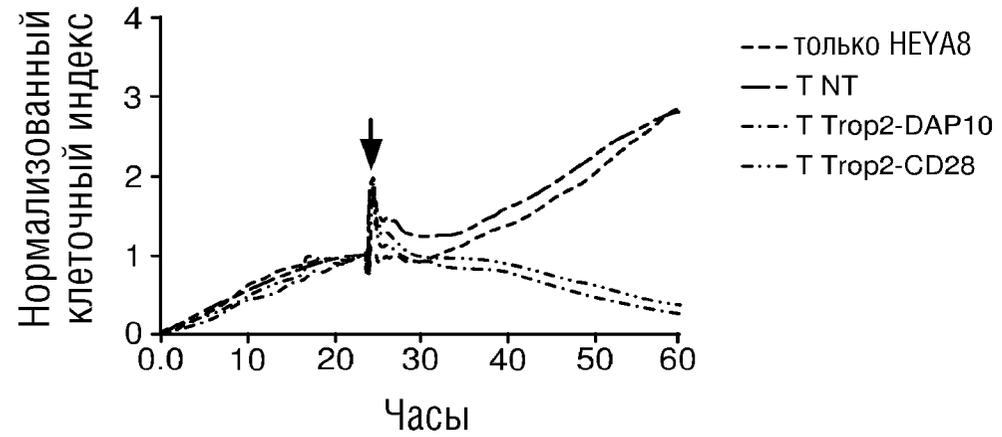
ФИГ.12В



ФИГ.13А

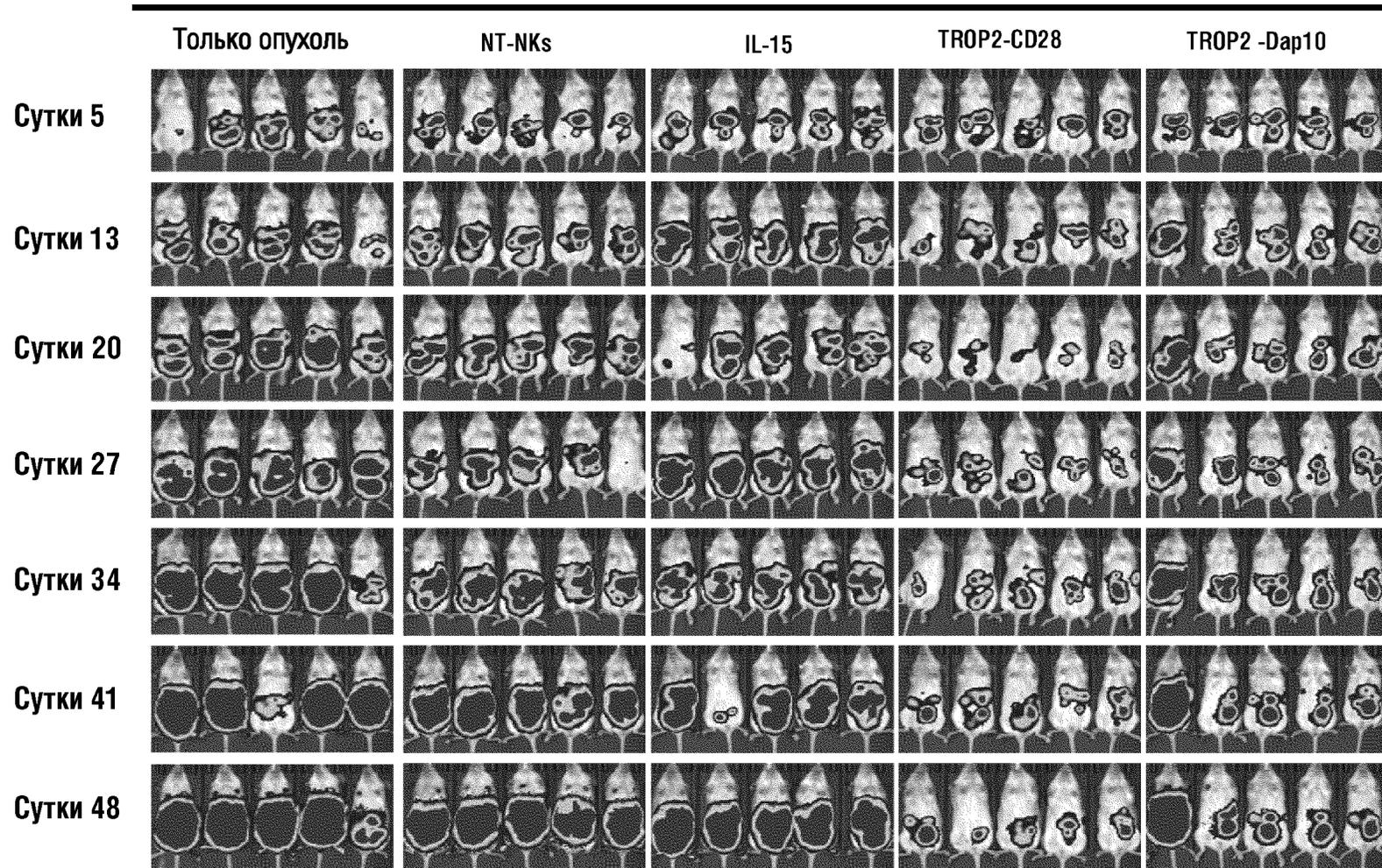


ФИГ.13В

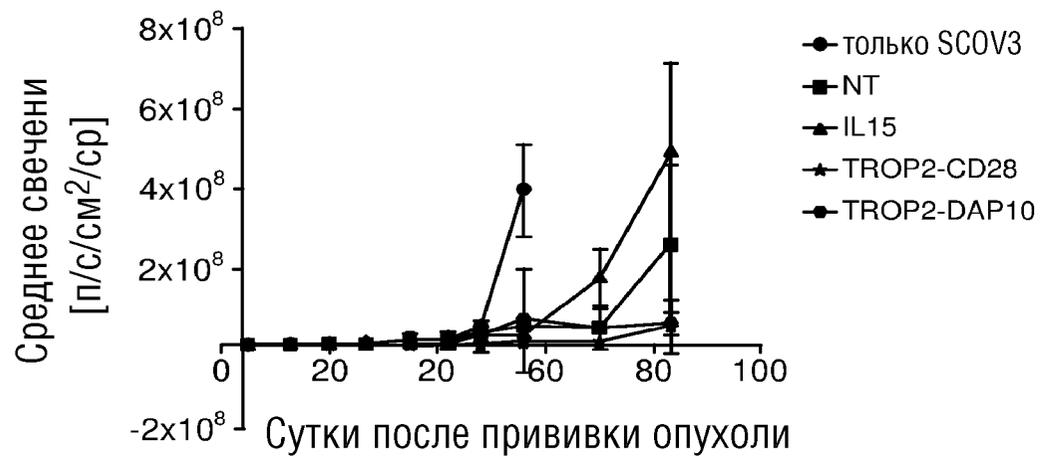


ФИГ.14А

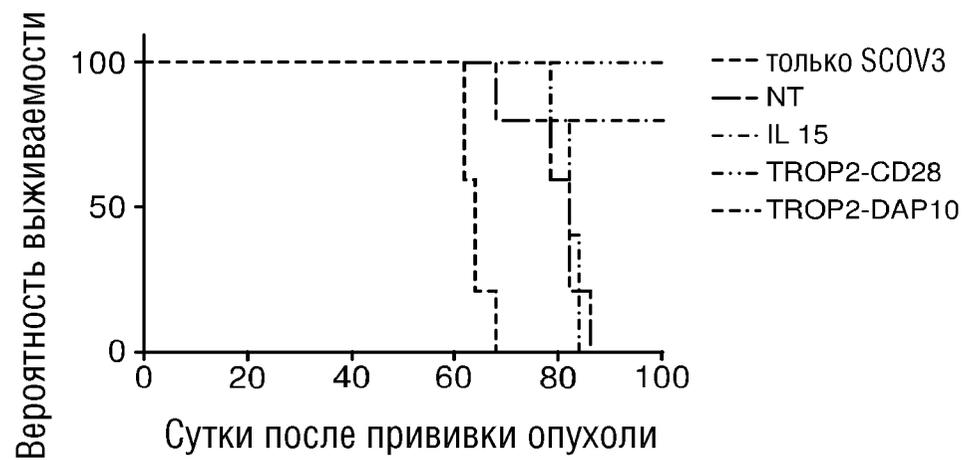
SKOV3 FFluc



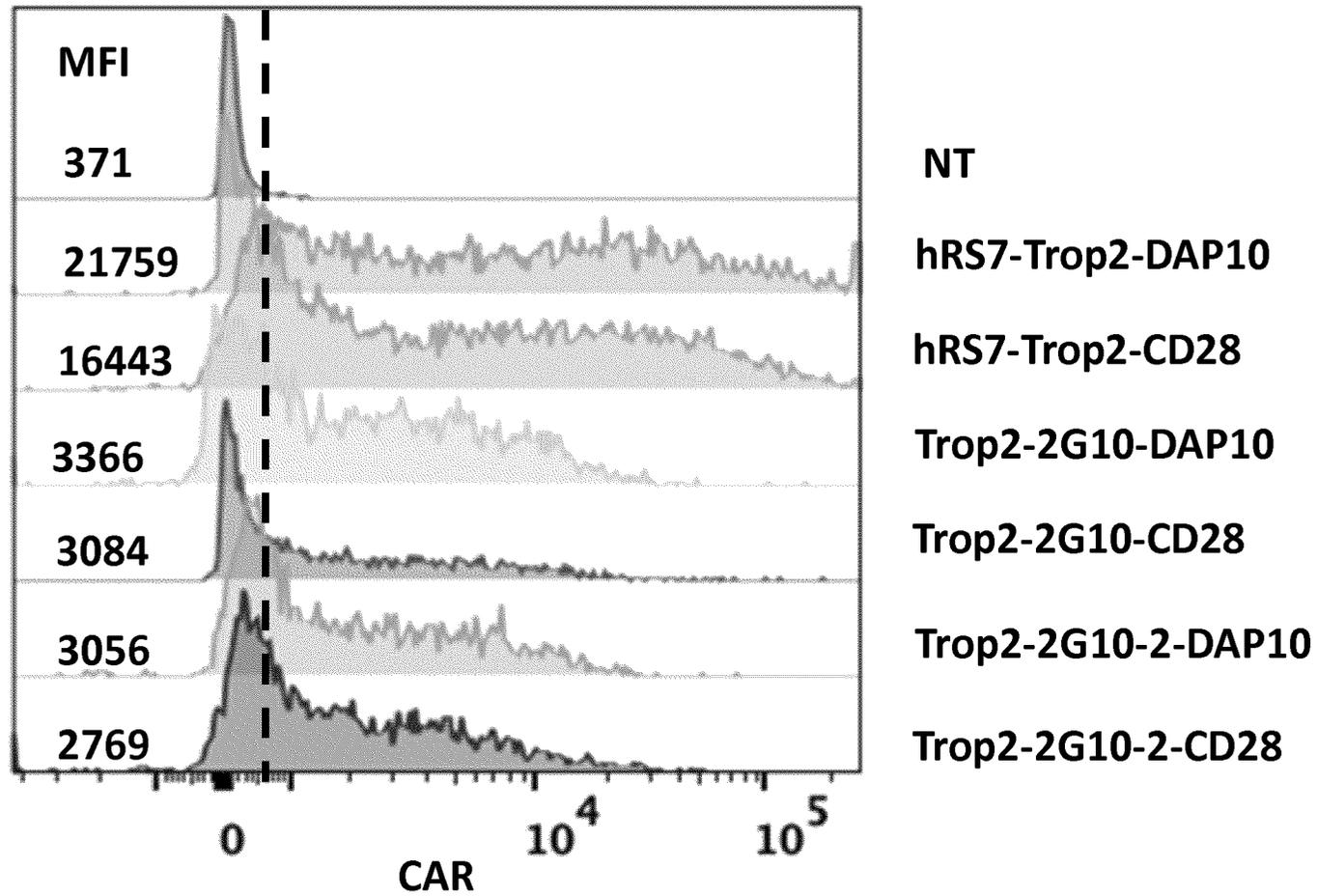
ФИГ.14В



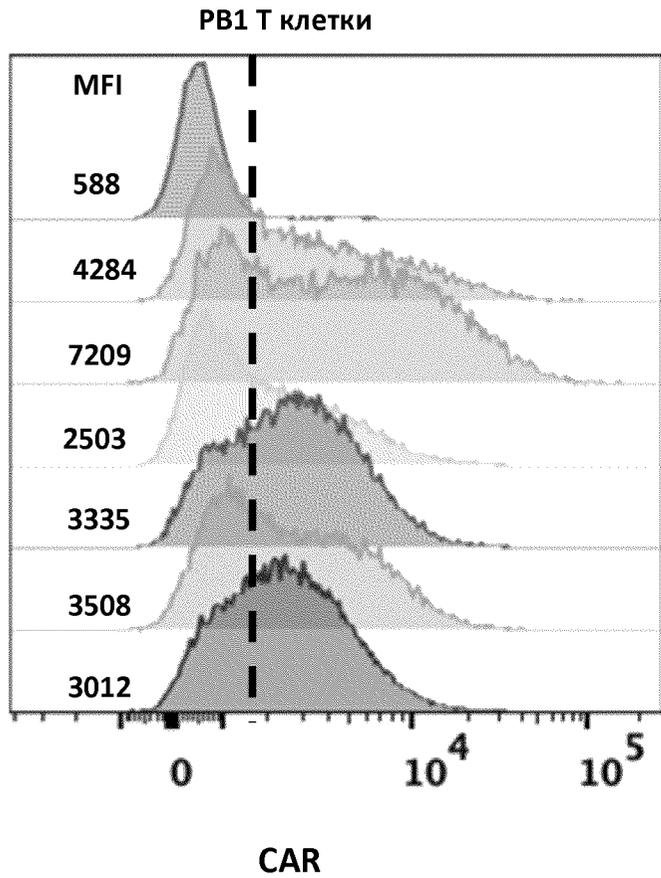
ФИГ.14С



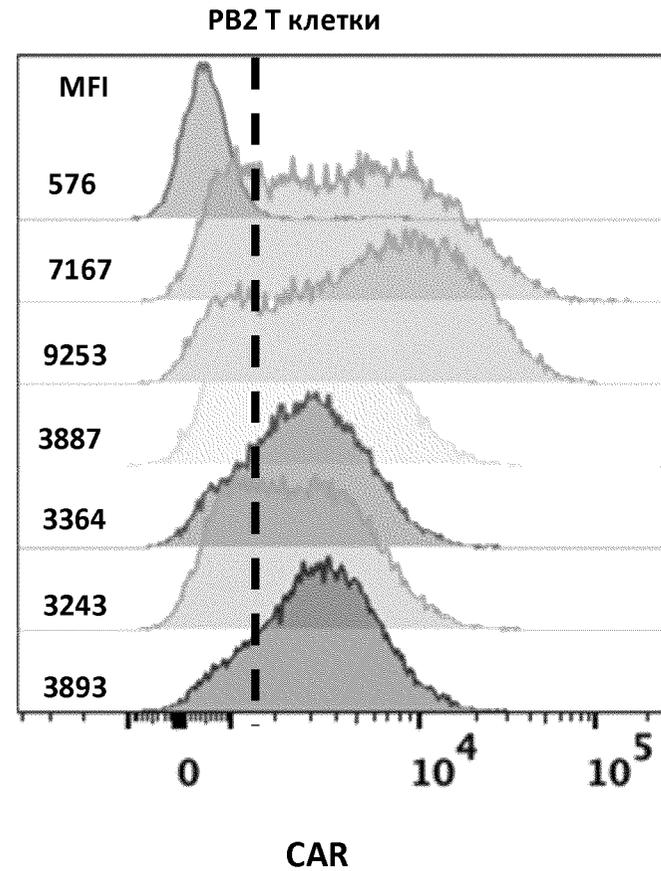
Фиг.15



ФИГ.16

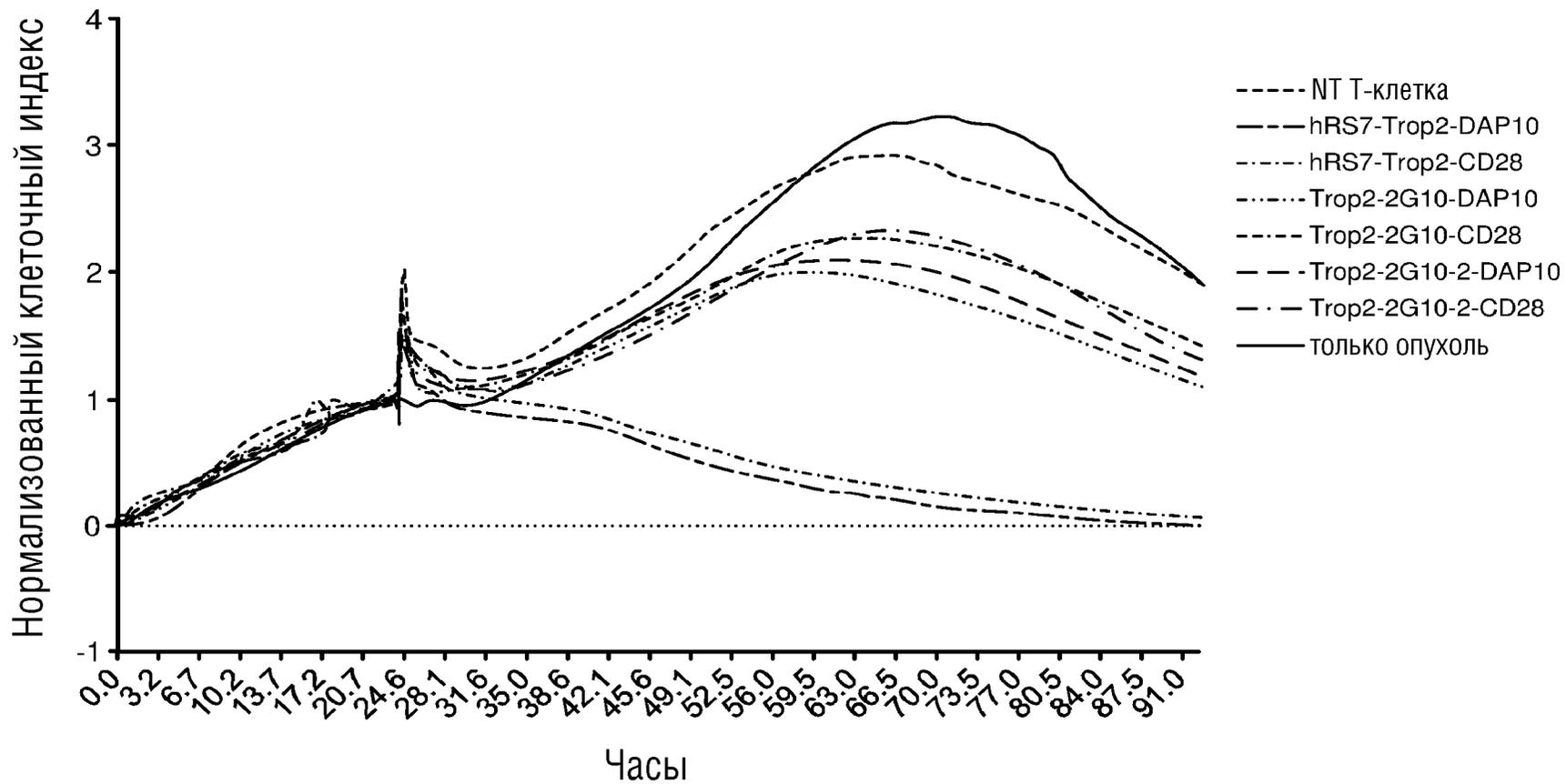


NT
hRS7-Trop2-DAP10
hRS7-Trop2-CD28
TROP2-2G10-DAP10
TROP2-2G10-CD28
TROP2-2G10-2-DAP10
TROP2-2G10-2-CD28

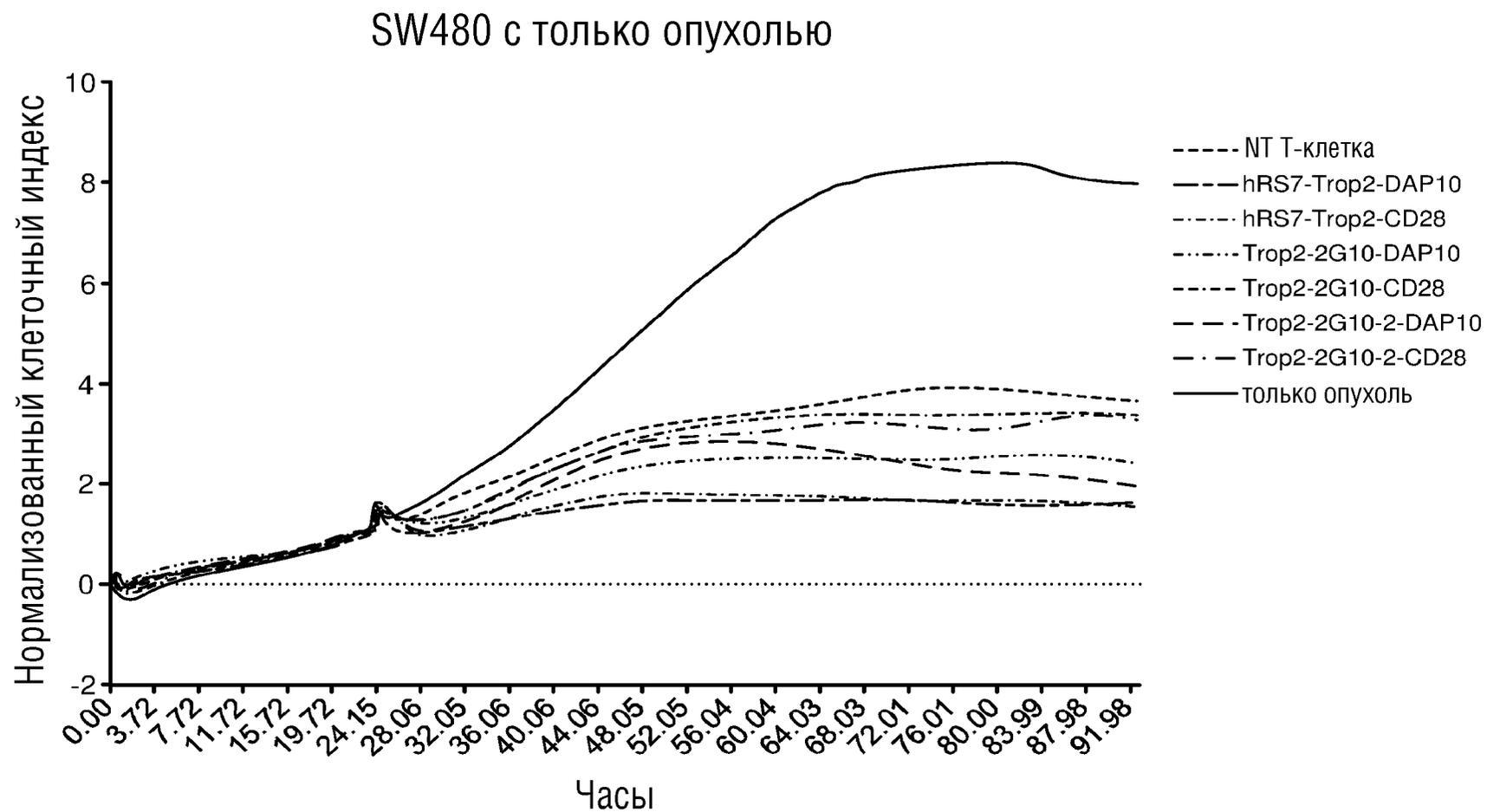


ФИГ.17

Клеточная линия рака яичника HEYB

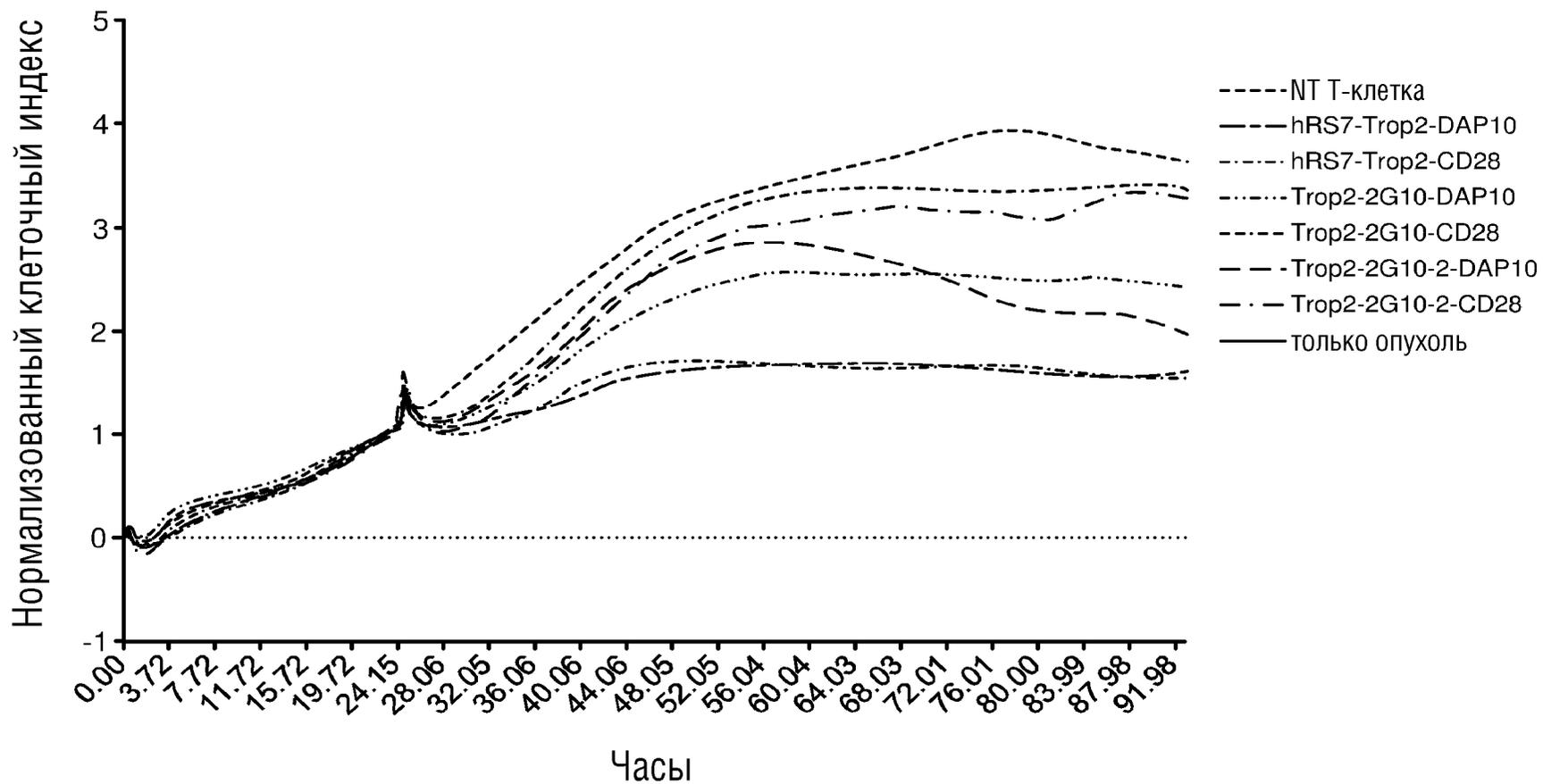


ФИГ.18А



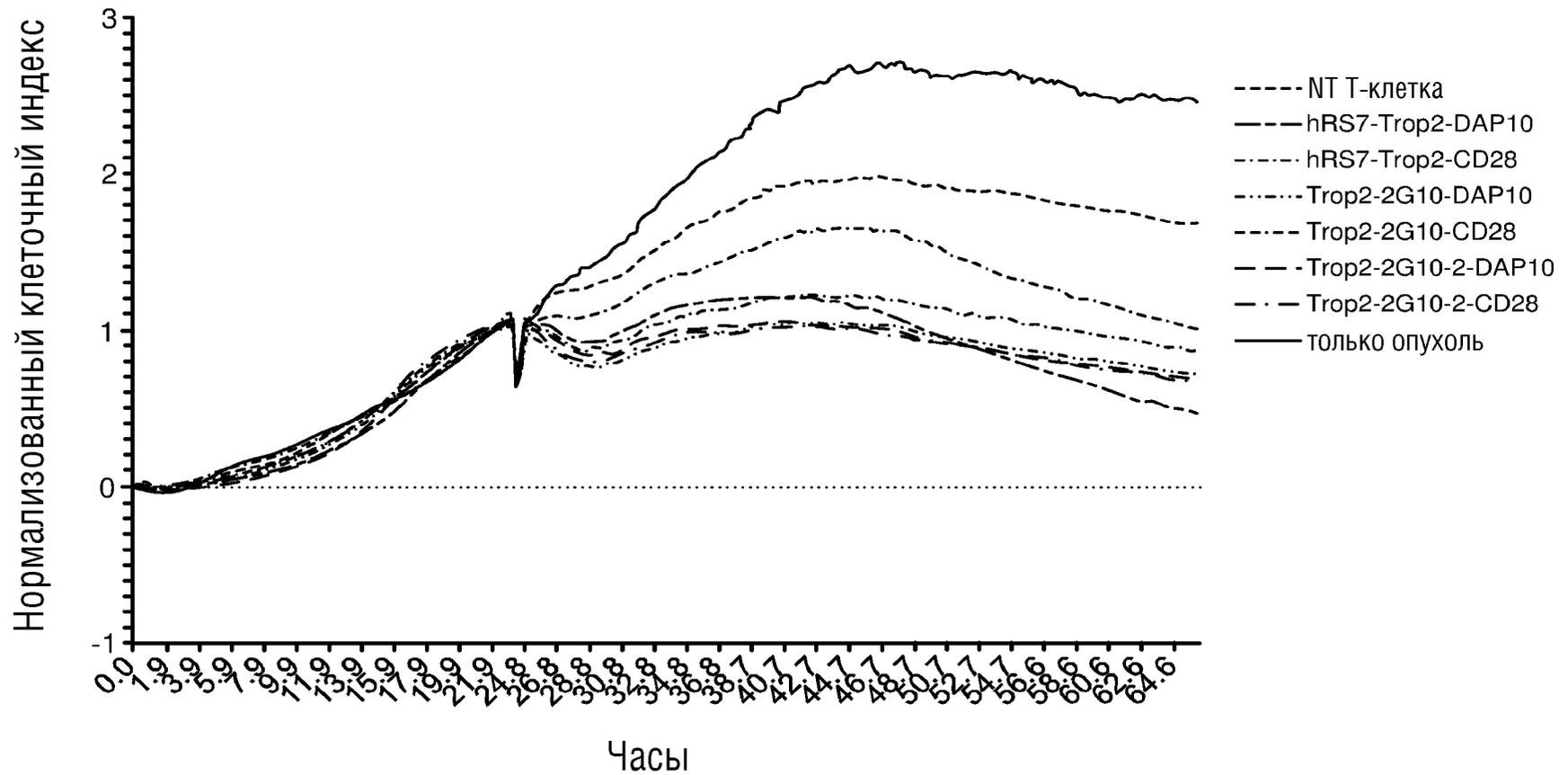
ФИГ.18В

SW480 без только опухоли



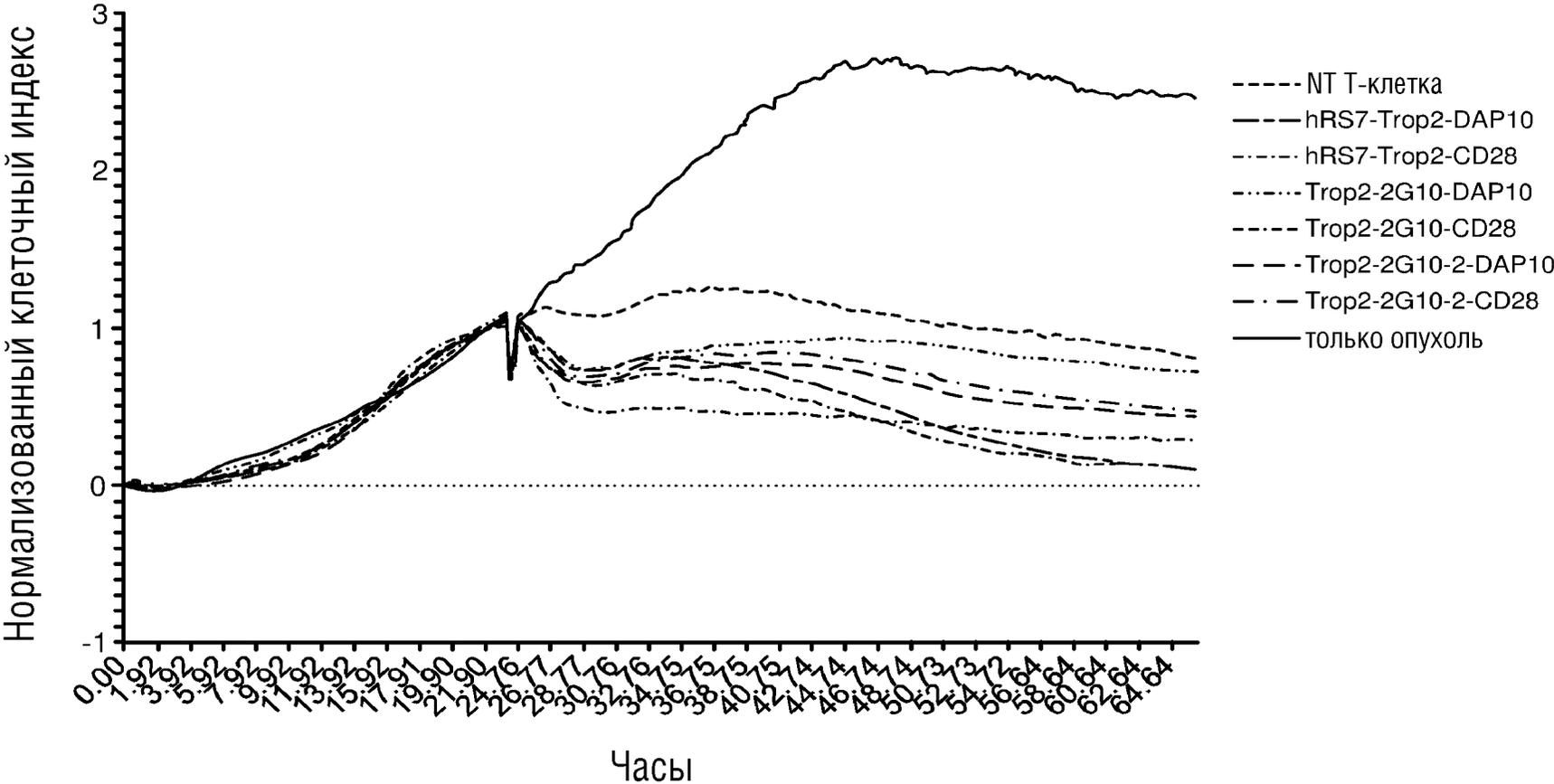
ФИГ.19А

РАТС148 Донор 1

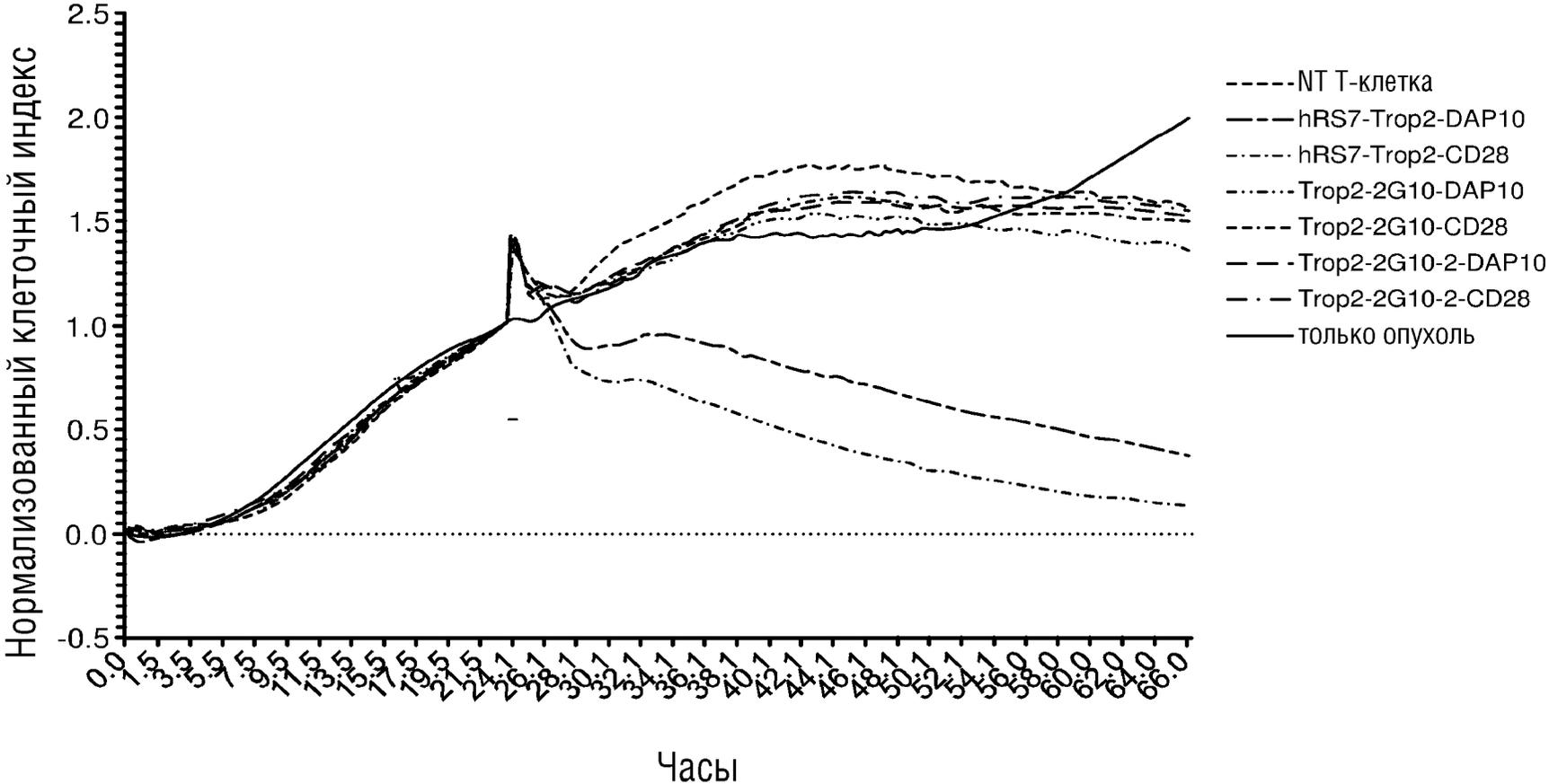


ФИГ.19В

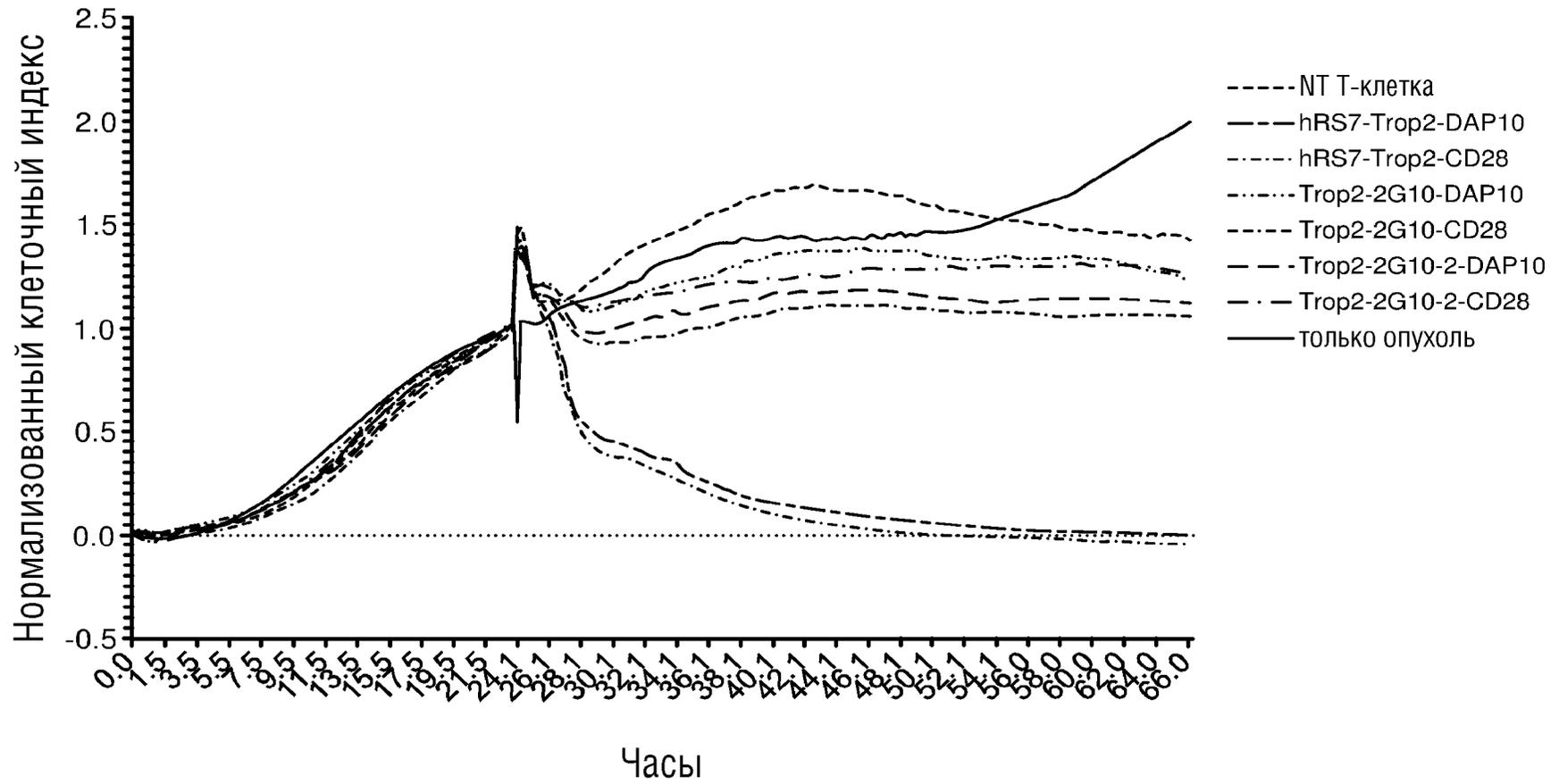
РАТС148 Донор 2



SCOV3 Донор 1

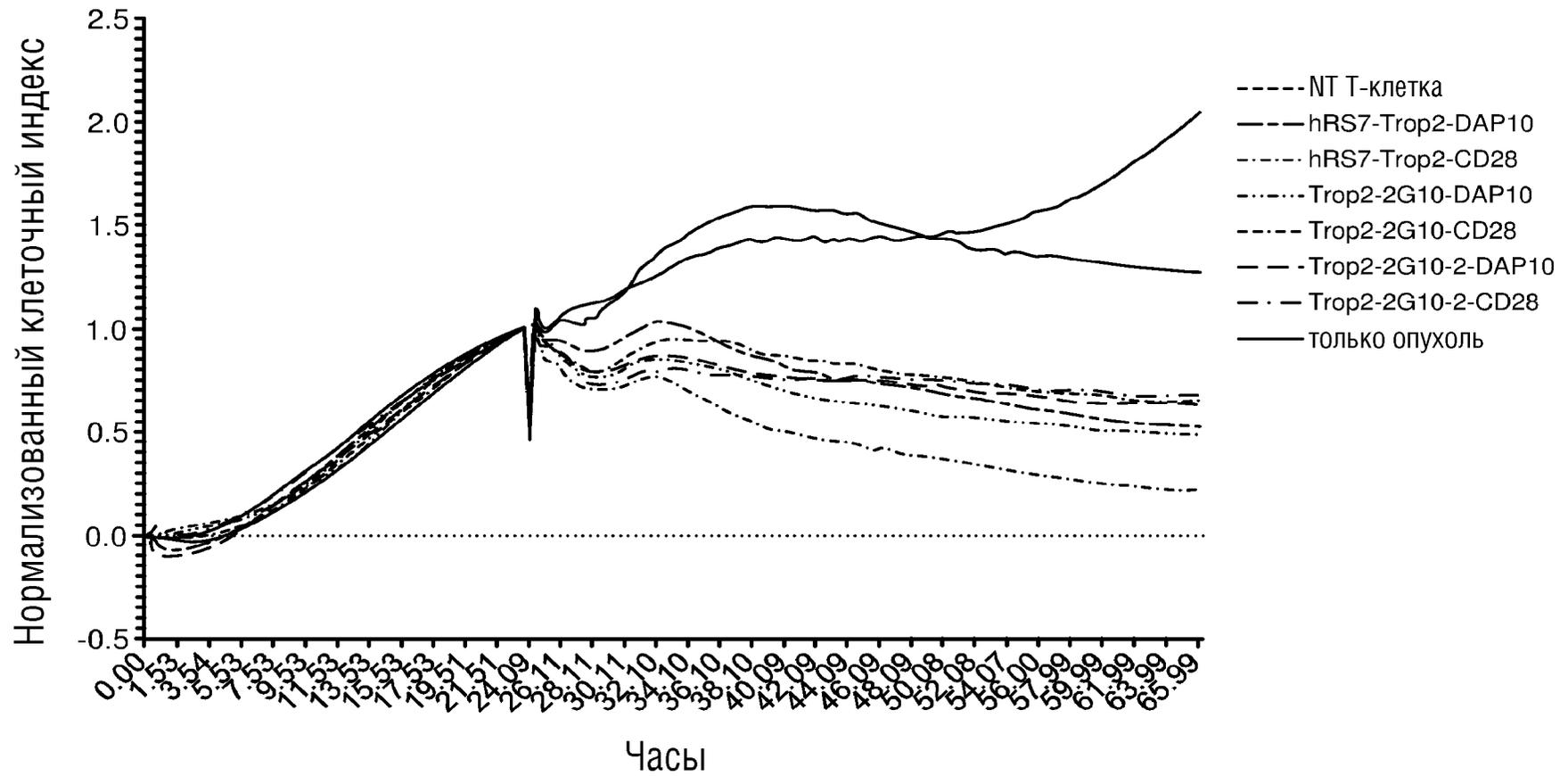


SKOV3 Донор 2



ФИГ.21А

OVCAR5 Донор 1



ФИГ.21В

OVCAR5 Донор 2

