

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202393559** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2024.04.27**

(22) Дата подачи заявки  
**2022.06.07**

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*C07K 16/30* (2006.01)  
*G01N 33/574* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)

---

(54) **МОЛЕКУЛЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ GPC3**

---

(31) **63/208,274**

(32) **2021.06.08**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/032455**

(87) **WO 2022/261061 2022.12.15**

(71) Заявитель:  
**КАЙТ ФАРМА, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Древер Мэттью, Ромэйн Габриэль М.,  
Уайман Сара К., Ин Чи (US)**

(74) Представитель:

**Нилова М.И. (RU)**

---

(57) Предложены антитела, их фрагменты, химерные антигенные рецепторы (CAR) и Т-клеточные рецепторы (TCR), содержащие один или более связывающих GPC3 доменов, описанных в настоящем документе. Предложены композиции, клетки и препараты для клеточной терапии, содержащие их. Дополнительно предложены способы лечения.

**A1**

**202393559**

**202393559**

**A1**

## **МОЛЕКУЛЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ GPC3**

### **ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[0001] Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета согласно предварительной заявке на патент США № 63/208,274, поданной 8 июня 202 г. под названием GPC3 Binding Molecules («Молекулы, связывающие GPC3»), которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

[0002] Настоящее изобретение относится к области клеточной терапии, и более конкретно, к антителам, CAR и/или TCR, которые нацелены на глипикан-3 (GPC3).

### **ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0003] Злокачественные опухоли человека по своей природе состоят из нормальных клеток, которые подверглись генетическому или эпигенетическому преобразованию, превратившись в аномальные раковые клетки. При этом раковые клетки начинают экспрессировать белки и другие антигены, которые отличаются от экспрессируемых нормальными клетками. Эти aberrантные опухолевые антигены могут быть использованы врожденной иммунной системой организма для специфического нацеливания и уничтожения раковых клеток. Однако раковые клетки используют различные механизмы для предупреждения успешного нацеливания на раковые клетки иммунных клеток, таких как Т- и В-лимфоциты.

[0004] Современные виды терапии на основе Т-клеток используют обогащенные или модифицированные Т-клетки человека для нацеливания и уничтожения раковых клеток у пациента. Чтобы повысить способность Т-клеток и НК-клеток нацеливаться на конкретную раковую клетку и уничтожить ее, были разработаны способы конструирования Т-клеток для экспрессии конструкторов, которые нацеливают Т-клетки или НК-клетки на конкретную раковую клетку-мишень. Химерные антигенные рецепторы (CAR) и сконструированные Т-клеточные рецепторы (TCR), которые содержат связывающие домены, способные взаимодействовать с конкретным опухолевым антигеном, позволяют Т-клеткам нацеливаться на раковые клетки, которые экспрессируют конкретный опухолевый антиген, и уничтожать их. Существует потребность в CAR и TCR для нацеливания и уничтожения раковых клеток и, в

частности, клеток, экспрессирующих глипикан-3 (GPC3), таких как клетки гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК).

### **КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0005] В данном описании представлено антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий связывающий GPC3 домен, причем связывающий GPC3 домен содержит последовательности трех определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR) переменной области тяжелой цепи (HCVR) с SEQ ID NO: 3 и последовательности трех CDR легкой цепи (LCDR) переменной области легкой цепи (LCVR) с SEQ ID NO: 14. В вариантах осуществления связывающий GPC3 домен содержит первый домен, содержащий три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и второй домен, содержащий три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), причем (i) HCDR1 имеет последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 5–7; (ii) HCDR2 имеет последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 8–10; (iii) HCDR3 имеет последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 11–13; (iv) LCDR1 имеет последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 16–18; (v) LCDR2 имеет последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 19–21; и (vi) LCDR3 имеет последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 22–24. В вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первый домен, содержащий три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), и второй домен, содержащий три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), причем HCDR и LCDR содержат: (i) HCDR1 в соответствии с любой из SEQ ID NO: 5–7; HCDR2 в соответствии с любой из SEQ ID NO: 8–10; HCDR3 в соответствии с любой из SEQ ID NO: 11–13; LCDR1 в соответствии с любой из SEQ ID NO: 16–18; LCDR2 в соответствии с любой из SEQ ID NO: 19–21; LCDR3 в соответствии с любой из SEQ ID NO: 22–24. В вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первый переменный домен тяжелой цепи, содержащий три HCDR, и переменный домен легкой цепи, содержащий три LCDR, причем (i) переменный домен тяжелой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 45; и (ii) переменный домен легкой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 47. В вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первый переменный домен тяжелой цепи, содержащий три HCDR, и переменный домен

легкой цепи, содержащий три LCDR, причем (i) переменный домен тяжелой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 3 и переменный домен легкой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 14; (ii) переменный домен тяжелой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 27 и переменный домен легкой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 29; (iii) переменный домен тяжелой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 33 и переменный домен легкой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 35; или (iv) переменный домен тяжелой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 39 и переменный домен легкой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 41; или (v) переменный домен тяжелой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 45 и переменный домен легкой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 47. В вариантах осуществления три HCDR и три LCDR состоят из одного полипептида. В вариантах осуществления его антигенсвязывающий фрагмент содержит scFv. В вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 25, 31, 37, 43 или 49.

**[0006]** В данном описании представлен химерный антигенный рецептор, содержащий описанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В вариантах осуществления химерный антигенный рецептор дополнительно содержит трансмембранный домен 4-1BB/CD137, альфа-цепь Т-клеточного рецептора, бета-цепь Т-клеточного рецептора, 2B4, CD3 эпсилон, CD4, CD5, CD8 альфа, CD9, CD16, CD19, CD22, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, NKG2D или дзета-цепь Т-клеточного рецептора или любую их комбинацию.

**[0007]** В данном описании представлена нуклеиновая кислота, кодирующая описанный химерный антигенный рецептор, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В данном описании представлен рекомбинантный вектор, содержащий описанную нуклеиновую кислоту. В вариантах осуществления нуклеиновая кислота и/или рекомбинантный вектор дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую доминантный негативный рецептор TGF $\beta$  (DN TGF $\beta$ R), содержащий: внеклеточный домен (ECD) рецептора TGF $\beta$  и трансмембранный домен (TMD), причем рекомбинантный полипептид не содержит аминокислотных остатков, ответственных за передачу сигналов и фосфорилирование, которые присутствуют в рецепторе TGF $\beta$  дикого типа.

**[0008]** В данном описании представлена клетка-хозяин, трансформированная описанной нуклеиновой кислотой или рекомбинантным вектором. В вариантах осуществления клетка-хозяин трансформируется с помощью нуклеиновой кислоты, кодирующей



описанный химерный антигенный рецептор, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и нуклеиновой кислоты, кодирующей доминантный негативный рецептор TGF $\beta$  (DN TGF $\beta$ R). В вариантах осуществления клетка-хозяин трансформируется с помощью нуклеиновой кислоты, кодирующей мембраносвязанный химерный рецептор суши-домена IL-15-IL-15R $\alpha$ . В вариантах осуществления клетка-хозяин содержит iPSC, Т-клетку или НК-клетку. В данном описании представлена фармацевтическая композиция, содержащая описанную Т-клетку и/или НК-клетку.

**[0009]** В данном описании представлен способ лечения заболевания у нуждающегося в этом пациента, включающий введение описанной Т-клетки и/или НК-клетки или фармацевтической композиции, содержащей раскрытую Т-клетку и/или НК-клетку. В вариантах осуществления заболевание представляет собой гепатоцеллюлярную карциному. В данном описании представлен способ индуцирования иммунного ответа у субъекта или иммунизации субъекта против гепатоцеллюлярной карциномы, причем способ включает введение субъекту описанной Т-клетки и/или НК-клетки или фармацевтической композиции, содержащей описанную Т-клетку и/или НК-клетку. В различных вариантах осуществления Т-клетка и/или НК-клетка является аллогенной для пациента.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

### **Термины**

**[0010]** Для лучшего понимания настоящего описания ниже приведены определения некоторых терминов. Дополнительные определения для следующих терминов и других терминов изложены в тексте описания.

**[0011]** В настоящем описании и в приложенных пунктах формулы изобретения формы единственного числа включают обозначения множественного числа, если иное четко не следует из контекста.

**[0012]** Если специально не указано или не очевидно из контекста, в данном документе термин «или» следует понимать как включающий и он охватывает как «или», так и «и».

**[0013]** Термин «и/или», используемый в настоящем документе, следует понимать как конкретное описание каждого из двух указанных характеристик или компонентов вместе с другим или без него. Таким образом, термин «и/или» в контексте такой фразы, как «А и/или В», в настоящем документе предназначен для включения А и В; А или В; А (отдельно); и В (отдельно). Аналогичным образом, термин «и/или», используемый в фразе, такой как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих

аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

**[0014]** Термины «например» в контексте настоящего документа используются исключительно в качестве примера, без ограничений, и не должны рассматриваться как относящиеся только к тем элементам, которые явно перечислены в описании.

**[0015]** Термины «или более», «по меньшей мере», «более чем» и т. п., например «по меньшей мере один», включают, без ограничения, по меньшей мере 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 или 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 или больше, чем указанное значение. Также включено любое большее количество или доля между ними.

**[0016]** И наоборот, термин «не более чем» включает в себя каждое значение, меньшее, чем указанное значение. Например, «не более чем 100 нуклеотидов» включает в себя 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 и 0 нуклеотидов. Также включено любое меньшее количество или доля между ними.

**[0017]** Термины «множество», «по меньшей мере два», «два или более», «по меньшей мере второй» и т. п. включают в себя, без ограничения, по меньшей мере 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 или 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 или больше. Также включено любое большее количество или доля между ними.

**[0018]** Следует понимать, что в тексте описания слово «содержащий» или варианты, такие как «содержит» или «который содержит», будут подразумевать включение

указанного элемента, целого числа или шага или группы элементов, целых чисел или шагов, но не исключение любого другого элемента, целого числа или шага или группы элементов, целых чисел или шагов. Следует понимать, что в тех случаях, когда аспекты описаны в данном документе с формулировкой «содержащий», в противном случае также предложены аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий по сути из».

**[0019]** Если специально не указано или не очевидно из контекста, термин «приблизительно» относится к значению или составу, которые находятся в пределах допустимого диапазона ошибки для конкретного значения или состава, как определено специалистом в данной области, что будет частично зависеть от того, как значение или состав измеряется или определяется, т. е. ограничений системы измерения. Например, «приблизительно» или «содержащий по сути» может означать в пределах одного или более одного стандартного отклонения при практическом применении в данной области. Термины «приблизительно» или «содержащий по сути» могут означать диапазон до 10% (*m. e.*  $\pm 10\%$ ). Таким образом, термин «приблизительно» можно понимать как в пределах больше или меньше 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% или 0,001% от указанного значения. Например, приблизительно 5 мг может включать любое количество от 4,5 мг до 5,5 мг. Кроме того, особенно в отношении биологических систем или процессов термины могут означать до порядка величины или до 5-кратного значения. Если определенные значения или композиции приведены в настоящем описании, если не указано иное, следует считать, что значение терминов «приблизительно» или «содержащий по сути» должно находиться в пределах приемлемого диапазона ошибок для этого определенного значения или состава.

**[0020]** В контексте настоящего документа любой диапазон концентраций, процентный диапазон, диапазон соотношений или целочисленный диапазон следует понимать как включающий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, при необходимости, части целого числа (например, одной десятой и одной сотой части целого числа), если не указано иное.

**[0021]** Единицы, префиксы и символы в контексте настоящего документа приведены в их общепринятой форме Международной системы единиц измерения (СИ). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон.

**[0022]** Все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, если не дано иное их определение, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в данной области, к которой имеет отношение настоящее изобретение. Например, Juo, “The Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology”, 2<sup>nd</sup> ed.,

(2001), CRC Press; “The Dictionary of Cell & Molecular Biology”, 5<sup>th</sup> ed., (2013), Academic Press; и “The Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology”, Cammack *et al.* eds., 2<sup>nd</sup> ed, (2006), Oxford University Press предоставляют специалистам в данной области общий словарь многих терминов, используемых в настоящем описании.

**[0023]** Термин «введение» относится к физическому введению субъекту агента, такого как модифицированная Т-клетка или НК-клетка, описанная в настоящем документе, с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Иллюстративные пути введения составов, описанных в настоящем документе, включают внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например путем инъекции или инфузии. Фраза «парентеральное введение» означает режимы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включают, но не ограничиваются ими, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления состав вводят непарентеральным путем, например перорально. Другие непарентеральные пути включают местное, эпидермальное или мукозальное введение, например интраназально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение можно осуществлять, например, один раз, множество раз и/или в течение одного или более длительных периодов времени.

**[0024]** Термины «активированный» и «активация» относятся к состоянию Т-клетки, которая была достаточно стимулирована для индуцирования обнаруживаемой клеточной пролиферации. В одном варианте осуществления активация может быть ассоциирована с индуцированным продуцированием цитокинов и обнаруживаемыми эффекторными функциями. Термин «активированные Т-клетки» относится, помимо прочего, к Т-клеткам, которые пролиферируют. Сигналы, генерируемые только TCR, могут быть недостаточными для полной активации Т-клетки, поэтому может потребоваться один или более вторичных или костимулирующих сигналов. Таким образом, активация Т-клеток включает в себя первичный стимулирующий сигнал через комплекс TCR/CD3 и один или более вторичных костимулирующих сигналов. Костимуляция может проявляться пролиферацией и/или выработкой цитокинов Т-клетками, которые получили первичный сигнал активации, такой как стимуляция через комплекс TCR/CD3.

**[0025]** Термин «агент» может относиться к молекуле или элементу любого класса, включающему, или к множеству молекул или элементов, любой из которых может представлять собой, например, полипептид, нуклеиновую кислоту, сахарид, липид, малую молекулу, металл, клетку (например, Т-клетку или НК-клетку или предшественник таких клеток, например iPSC) или организм (например, его фракцию или экстракт) или их компонент. В некоторых вариантах осуществления агент может быть использован в выделенной или чистой форме. В некоторых вариантах осуществления агент может быть использован в необработанной или неочищенной форме. В некоторых вариантах осуществления агент может быть представлен в виде популяции, коллекции или библиотеки, например, которая может быть подвергнута скринингу для идентификации или определения характеристик присутствующих в ней членов.

**[0026]** Термин «аллогенный» относится к любому материалу, полученному от одного индивидуума, который затем вводят другому индивидууму того же вида, например, трансплантация аллогенных Т-клеток или НК-клеток.

**[0027]** Термин «антитело» (Ab) включает, без ограничения, гликопротеиновый иммуноглобулин, который специфически связывается с антигеном. Как правило, антитело может содержать по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, или их антигенсвязывающие молекулы. Каждая цепь H содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно описанную в данном документе как VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три константных домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно описанную в данном документе как VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один константный домен: CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL содержат три CDR и четыре FR, расположенные от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторские клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. В целом, человеческие антитела представляют собой тетрамерные агенты с массой около 150 кД, состоящие из двух идентичных полипептидов

тяжелой (H) цепи (около 50 кД каждый) и двух идентичных полипептидов легкой (L) цепи (около 25 кД каждый), которые соединяются друг с другом в структуру, которую принято называть «Y-образной». Тяжелые и легкие цепи связаны или соединены друг с другом одной дисульфидной связью; две другие дисульфидные связи соединяют шарнирные области тяжелой цепи друг с другом, так что димеры соединяются друг с другом, и образуется тетрамер. Антитела естественного происхождения также гликозилированы, например, на домене С<sub>H2</sub>.

**[0028]** Термин «человеческое антитело» предназначен для обозначения антител, имеющих переменные и константные доменные последовательности, созданные, собранные или полученные из последовательностей иммуноглобулинов человека или последовательностей, неотличимых от них. В некоторых вариантах осуществления антитела (или компоненты антител) могут считаться «человеческими», даже если их аминокислотные последовательности содержат остатки или элементы, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, вариации, введенные в результате случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или введенные в результате соматической мутации *in vivo*). Термин «гуманизированные» предназначен для обозначения антител, имеющих переменный домен с последовательностью, полученной из переменного домена нечеловеческого вида (например, мыши), модифицированной таким образом, чтобы быть более похожей на последовательность, кодируемую зародышевой линией человека. В некоторых вариантах осуществления «гуманизированное» антитело содержит один или несколько каркасных доменов, имеющих по существу аминокислотную последовательность каркасного домена человека, и одну или несколько определяющих комплементарность областей, имеющих по существу ту же аминокислотную последовательность, что и у антитела, не относящегося к человеческому. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит по меньшей мере фрагмент константной области иммуноглобулина (Fc), обычно константного домена иммуноглобулина человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела могут содержать шарнирную область С<sub>H1</sub>, С<sub>H2</sub>, С<sub>H3</sub> и, необязательно, С<sub>H4</sub> константного домена тяжелой цепи человека.

**[0029]** Антитела могут включать, например, моноклональные антитела, рекомбинантно полученные антитела, моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (включая биспецифические антитела), человеческие антитела, сконструированные антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, содержащие две молекулы тяжелой цепи

и две молекулы легкой цепи, мономер легкой цепи антитела, мономер тяжелой цепи антитела, димер легкой цепи антитела, димер тяжелой цепи антитела, пару легкая цепь антитела-тяжелая цепь антитела, интратела, слитые антитела (иногда упоминаемые в настоящем документе как «конъюгаты антител»), гетероконъюгаты антител, однодоменные антитела, моновалентные антитела, одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fvs (scFv), верблюдоподобные антитела, аффитела, Fab-фрагменты, фрагменты F(ab')<sub>2</sub>, дисульфидно-связанные Fvs (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-анти-Id антитела), минитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые в настоящем документе «миметики антител») и антигенсвязывающие фрагменты любого из вышеперечисленного. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, относятся к популяциям поликлональных антител. Антитела также могут содержать, например, Fab'-фрагменты, Fd'-фрагменты, Fd-фрагменты, выделенные CDR, одноцепочечные Fv, слитые белки полипептид-Fc, однодоменные антитела (например, однодоменные антитела акулы, такие как IgNAR или их фрагменты, и одноцепочечные антитела, состоящие из тяжелых цепей, UniAb®), антитела верблюдовых, одноцепочечные или тандемные диатела (TandAb®), Anticalin®, минитела Nanobody®, BiTE®, белки с анкириновым повтором или DARPIN®, Avimer®, DART, TCR-подобные антитела, Adnectin®, Affilin®, Trans-body®, Affibody®, TrimerX®, микробелки, Fynommer®, Centyrin® и KALBITOR®.

**[0030]** Иммуноглобулин может быть получен из любого из общеизвестных изотипов, в том числе, без ограничения, IgA, секреторного IgA, IgG, IgE и IgM. Подклассы IgG также хорошо известны специалистам в данной области и включают, без ограничения, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека. «Изотип» относится к классу или подклассу антитела (например, IgM или IgG1), кодирующемуся генами константной области тяжелой цепи. Термин «антитело» включает в себя, в качестве примера, как встречающиеся в природе, так и не встречающиеся в природе Ab; моноклональные и поликлональные Ab; химерные и гуманизированные Ab; человеческие и отличные от человеческих Ab; полностью синтетические Ab; и одноцепочечные Ab. Отличное от человеческого Ab может быть гуманизировано рекомбинантными способами для снижения его иммуногенности у человека. Если явным образом не указано иное, а также если контекст не указывает иное, термин «антитело» также включает антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающую часть любого из вышеупомянутых иммуноглобулинов и включает моновалентный и бивалентный фрагмент или участок и одноцепочечное Ab.

**[0031]** «Антигенсвязывающая молекула», «антигенсвязывающая часть», «антигенсвязывающий фрагмент» или «фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий домен» относится к любой молекуле, которая содержит антигенсвязывающие части (например, CDR) антитела, из которого происходит молекула. Антигенсвязывающая молекула может включать антигенные определяющие комплементарность области (CDR). Примеры фрагментов антител включают, без ограничения, фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv, dAb, линейные антитела, антитела в виде scFv и мультиспецифические антитела, образованные из антигенсвязывающих молекул. Пептитела (т. е. слитые молекулы Fc, содержащие пептидные связывающие домены) представляют собой еще один пример подходящих антигенсвязывающих молекул. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с антигеном на опухолевой клетке. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с антигеном на клетке, участвующей в гиперпролиферативном заболевании, или с вирусным или бактериальным антигеном. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR) или сконструированный Т-клеточный рецептор (TCR). В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула или домен связывается с глипиканом-3 (GPC3). В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула или домен представляет собой фрагмент антитела, который специфически связывается с антигеном, включая его одну или более определяющих комплементарность областей (CDR). В дополнительных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула или домен содержит или состоит из авимеров.

**[0032]** В некоторых случаях CDR по существу идентична таковой в эталонном антителе (например, антителе по настоящему описанию) и/или последовательности CDR, представленной в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления CDR по существу идентична эталонной CDR (например, CDR, предложенной в настоящем описании) в том смысле, что она либо идентична последовательности, либо содержит 1, 2, 3, 4 или 5 (например, 1–5) аминокислотных замен по сравнению с эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления CDR по существу идентична эталонной CDR в том смысле, что она демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с эталонной CDR (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%). В некоторых вариантах осуществления CDR по существу идентична эталонной CDR в



том смысле, что она демонстрирует по меньшей мере 96%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления CDR по существу идентична эталонной CDR, в том смысле, что одна аминокислота в CDR удалена, добавлена или заменена по сравнению с эталонной CDR, при этом CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в остальном идентична последовательности эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления CDR по существу идентична эталонной CDR, в том смысле, что 2, 3, 4 или 5 (например, 2–5) аминокислот в CDR удалены, добавлены или заменены по сравнению с эталонной CDR, при этом CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в остальном идентична последовательности эталонной CDR. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент связывает один и тот же антиген в качестве эталонного антитела. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент перекрестно конкурирует с эталонным антителом, например, связываясь с по существу одним и тем же или идентичным эпитопом в качестве эталонного антитела.

**[0033]** Антигенсвязывающий фрагмент может быть получен любым способом. Например, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может быть получен ферментативно или химически путем фрагментации интактного антитела. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может быть получен рекомбинантно (например, путем экспрессии сконструированной последовательности нуклеиновой кислоты). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может быть получен полностью или частично синтетическим образом. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может иметь длину по меньшей мере около 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 аминокислот или более; в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 200 аминокислот (например, 50–100, 50–150, 50–200 или 100–200 аминокислот).

**[0034]** Термины «вариабельная область» или «вариабельный домен» используются взаимозаменяемо. Вариабельная область обычно относится к части антитела, как правило, к части легкой или тяжелой цепи, обычно к аминоконцу от 110 до 120 аминокислот в зрелой тяжелой цепи и от 90 до 115 аминокислот в зрелой легкой цепи, которые сильно отличаются по последовательности среди антител и используются для связывания и специфичности конкретного антитела для его конкретного антигена. Вариабельность последовательности концентрируется в тех областях, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), тогда как более высококонсервативные области в вариабельном домене называются каркасными областями (FR). Без ограничений, накладываемых каким-либо конкретным механизмом

или теорией, считается, что CDR легкой и тяжелой цепей главным образом отвечают за взаимодействие и специфичность антитела с антигеном. В определенных вариантах осуществления переменная область представляет собой переменную область человека. В определенных вариантах осуществления переменная область содержит CDR грызунов или мышей и каркасные области (FR) человека. В различных вариантах осуществления переменная область представляет собой переменную область примата (например, нечеловекообразного примата). В определенных вариантах осуществления переменная область содержит CDR грызунов или мышей и каркасные области (FR) примата.

**[0035]** Термины «VL» и «домен VL» используются взаимозаменяемо для обозначения переменной области легкой цепи антитела или его антигенсвязывающей молекулы.

**[0036]** Термины «VH» и «домен VH» используются взаимозаменяемо для обозначения переменной области тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающей молекулы.

**[0037]** Обычно используют ряд определений CDR: нумерация по Kabat, нумерация по Chothia, нумерация AbM или нумерация по контактному определению. Определение AbM является компромиссом между двумя определениями, используемыми в программе моделирования антител AbM компании Oxford Molecular. Контактное определение основано на анализе доступных сложных кристаллических структур.

Таблица 1. Нумерация CDR

<b>Петля</b>	<b>Kabat</b>	<b>AbM</b>	<b>Chothia</b>	<b>Контактное определение</b>
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B (нумерация по Kabat)	H26--H35B	H26--H32..34	H30--H35B
H1	H31--H35 (Нумерация по Chothia)	H26--H35	H26--H32	H30--H35
H2	H50--H65	H50--H58	H52--H56	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

**[0038]** Термин «нумерация по Kabat» и подобные термины признаны в данной области и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков в переменных областях тяжелой и легкой цепей антитела или их антигенсвязывающей молекулы. В определенных аспектах CDR антитела могут быть определены в соответствии с системой нумерации по

Kabat (см., например, Kabat EA & Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190: 382-391 and Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Согласно системе нумерации по Kabat CDR в молекуле тяжелой цепи антитела обычно присутствуют в аминокислотных положениях с 31 по 35, которые необязательно могут включать одну или две дополнительные аминокислоты, следующие за 35 (обозначаемые в схеме нумерации по Kabat как 35A и 35B) (CDR1), аминокислотных положениях с 50 по 65 (CDR2) и аминокислотных положениях с 95 по 102 (CDR3). Согласно системе нумерации по Kabat CDR в молекуле легкой цепи антитела обычно присутствуют в аминокислотных положениях с 24 по 34 (CDR1), аминокислотных положениях с 50 по 56 (CDR2) и аминокислотных положениях с 89 по 97 (CDR3). В конкретном варианте осуществления CDR антител, описанных в настоящем документе, были определены в соответствии со схемой нумерации по Kabat.

**[0039]** В определенных аспектах CDR антитела могут быть определены в соответствии со схемой нумерации по Chothia, которая относится к местоположению структурных петель иммуноглобулина (см., например, Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B *et al.*, (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C *et al.*, (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A *et al.*, (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82; и патент США № 7,709,226). Как правило, при использовании нумерации по Kabat петля Chothia CDR-H1 присутствует в аминокислотах тяжелой цепи от 26 до 32, 33 или 34, петля Chothia CDR-H2 присутствует в аминокислотах тяжелой цепи от 52 до 56, а петля Chothia CDR-H3 присутствует в аминокислотах тяжелой цепи от 95 до 102, в то время как петля Chothia CDR-L1 присутствует в аминокислотах легкой цепи от 24 до 34, петля Chothia CDR-L2 присутствует в аминокислотах легкой цепи от 50 до 56 и петля Chothia CDR-L3 присутствует в аминокислотах легкой цепи от 89 до 97. Конец петли Chothia CDR-H1 при нумерации с использованием подхода по Kabat варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что схема нумерации по Kabat имеет вставки в H35A и H35B; если как 35A, так и 35B отсутствуют, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствуют как 35A, так и 35B, петля заканчивается на 34). В конкретном варианте осуществления CDR антител, описанных в настоящем документе, были определены в соответствии со схемой нумерации по Chothia.

**[0040]** Термины «константная область» и «константный домен» являются взаимозаменяемыми и имеют значение, распространенное в данной области. Константная область представляет собой участок антитела, например карбоксильную концевую часть

легкой и/или тяжелой цепи, которая не участвует непосредственно в связывании антитела с антигеном, но может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Константная область молекулы иммуноглобулина обычно имеет более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с переменным доменом иммуноглобулина.

**[0041]** Термин «тяжелая цепь» при использовании в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, например альфа ( $\alpha$ ), дельта ( $\delta$ ), эpsilon ( $\epsilon$ ), гамма ( $\gamma$ ) и мю ( $\mu$ ), на основе аминокислотной последовательности константного домена, которая приводит к образованию классов антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно, включая подклассы IgG, например IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> и IgG<sub>4</sub>.

**[0042]** Термин «легкая цепь» при использовании в отношении антитела может относиться к любому отдельному типу, например каппа ( $\kappa$ ) или лямбда ( $\lambda$ ), на основе аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные последовательности легкой цепи хорошо известны в данной области. В конкретных вариантах осуществления легкая цепь представляет собой легкую цепь человека.

**[0043]** Термин «антиген» относится к соединению, композиции или веществу, которое может стимулировать выработку антител или Т-клеточный ответ у человека или животного, включая композиции (например, включающую опухолеспецифичный белок), которые вводят человеку или животному или которые абсорбируются организмом человека или животного. Антиген вступает в реакцию с продуктами конкретного гуморального или клеточного иммунитета, в том числе индуцированными гетерологичными антигенами, такими как описанные в настоящем документе антигены. «Антиген-мишень» или «представляющий интерес антиген-мишень» представляет собой антиген, который по существу не встречается на поверхности других нормальных (нужных) клеток и с которым должен связываться связывающий домен TCR или CAR, рассматриваемый в настоящем документе. Специалисту в данной области будет понятно, что любая макромолекула, в том числе практически все белки или пептиды, может выступать в качестве антигена. Антиген может быть эндогенно экспрессирован, т. е. экспрессирован геномной ДНК, или может быть рекомбинантно экспрессирован. Антиген может быть специфичным к определенной ткани, такой как раковая клетка, или может быть экспрессирован в широком смысле. Кроме того, фрагменты более крупных молекул могут функционировать в качестве антигенов. В одном варианте осуществления антигены представляют собой опухолевые антигены. В одном конкретном варианте осуществления антиген представляет собой весь глипикан-3 (GPC3) или его фрагмент. «Мишень» представляет собой любую молекулу, связанную связывающим доменом,

антигенсвязывающей системой, CAR или антигенсвязывающим агентом, например антителом.

**[0044]** Термин «антигенспецифическая область нацеливания» (ASTR) относится к области CAR, антитела или TCR, нацеленной на специфические антигены. Нацеленные на CAR или TCR области являются внеклеточными. В некоторых вариантах осуществления антигенспецифические области нацеливания содержат антитело или его функциональный эквивалент, или его фрагмент, или его производное, и каждая из областей нацеливания направлена на другой антиген. Области нацеливания могут содержать полноразмерные тяжелые цепи, фрагменты Fab, одноцепочечные фрагменты Fv (scFv), двухвалентные одноцепочечные антитела или диатела, каждое из которых специфично к целевому антигену. Однако существуют многочисленные альтернативы, такие как связанные цитокины (что приводит к распознаванию клеток, несущих рецептор цитокина), аффитела, лиганд-связывающие домены из рецепторов природного происхождения, растворимый белок/пептид-лиганд для рецептора (например, на опухолевой клетке), пептиды и вакцины для стимулирования иммунного ответа, которые могут быть использованы в различных вариантах осуществления настоящего описания. Фактически почти любая молекула, которая связывает данный антиген с высокой аффинностью, может быть использована в качестве антигенспецифической области нацеливания, как будет понятно специалистам в данной области.

**[0045]** Термин «антигенпрезентирующая клетка» или «APC» относится к клеткам, которые обрабатывают и представляют антигены Т-клеткам. Иллюстративные APC содержат дендритные клетки, макрофаги, В-клетки, определенные активированные эпителиальные клетки и другие типы клеток, способные к стимуляции TCR и соответствующей ко-стимуляции Т-клеток.

**[0046]** Термин «противоопухолевый эффект» относится к биологическому эффекту, который может присутствовать в форме снижения объема опухоли, уменьшения количества опухолевых клеток, снижения пролиферации опухолевых клеток, уменьшения числа метастазов, повышения общей выживаемости или выживаемости без прогрессирования, повышения продолжительности жизни или облегчения различных физиологических симптомов, ассоциированных с опухолью. Противоопухолевый эффект также может относиться к предупреждению возникновения опухоли.

**[0047]** Два события или объекта «ассоциированы» друг с другом, если присутствие, уровень и/или форма одного коррелирует с этими же характеристиками другого. Например, объект (например, полипептид, генетическая сигнатура, метаболит, микроорганизм и т. д.) считается ассоциированным с заболеванием, расстройством или

состоянием, если его присутствие, уровень и/или форма коррелируют с частотой встречаемости и/или восприимчивостью к заболеванию, расстройству или состоянию (например, в соответствующей популяции). Например, два или более объектов физически «ассоциированы» друг с другом, если они взаимодействуют, прямо или косвенно, таким образом, что они находятся и/или остаются в физической близости друг от друга (например, связываются). В дополнительных примерах два или более объектов, физически ассоциированных друг с другом, ковалентно связаны или соединены друг с другом или нековалентно связаны, например, посредством водородных связей, взаимодействия Ван-дер-Ваальса, гидрофобных взаимодействий, магнетизма и их комбинаций.

**[0048]** Термин «аутологичный» относится к любому материалу, полученному от того же субъекта, которому он позднее должен быть повторно введен. Например, способ терапии на основе сконструированных аутологичных клеток (eACT™), описанный в настоящем документе, включает сбор лимфоцитов у пациента, которые затем конструируют для экспрессии, например, конструкции CAR, а затем вводят обратно тому же пациенту.

**[0049]** «Аффинность связывания» относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антителом) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное «аффинность связывания» относится к собственной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1 : 1 между членами пары связывания (например, антитело и антиген). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y обычно может быть представлена константой диссоциации ( $K_D$ ). Аффинность может быть измерена и/или выражена рядом способов, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ) и равновесную константу ассоциации ( $K_A$ ).  $K_D$  рассчитывают из коэффициента  $k_{off}/k_{on}$ , а  $K_A$  — из коэффициента  $k_{on}/k_{off}$ .  $k_{on}$  относится к константе скорости ассоциации, например, антитела с антигеном, а  $k_{off}$  — к диссоциации, например, антитела с антигеном.  $k_{on}$  и  $k_{off}$  можно определить способами, известными специалисту в данной области, такими как BIACORE® или KinExA.

**[0050]** Термин « $K_D$ » (M) относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитела с антигеном или равновесной константе диссоциации антитела или антителосвязывающего фрагмента, связывающегося с антигеном. Существует обратная взаимосвязь между  $K_D$  и аффинностью связывания, следовательно, чем меньше значение  $K_D$ , тем больше, т. е. сильнее, аффинность. Таким образом, термины «более высокая аффинность» или «более сильная аффинность» относятся к более высокой способности вступать во взаимодействие и, следовательно, меньшему значению  $K_D$ , и

наоборот, термины «более низкая аффинность» или «более слабая аффинность» относятся к более низкой способности вступать во взаимодействие и, следовательно, большему значению  $K_D$ . В некоторых случаях более высокая аффинность связывания (или  $K_D$ ) конкретной молекулы (например, антитела) с ее интерактивной партнерской молекулой (например, антигеном X) по сравнению с аффинностью связывания молекулы (например, антитела) с другой интерактивной партнерской молекулой (например, антигеном Y) может быть выражена в виде соотношения связывания, определяемого путем деления большего значения  $K_D$  (более низкая, или более слабая, аффинность) на меньшее значение  $K_D$  (более высокая, или более сильная, аффинность), например, выраженного в виде 5-кратного или 10-кратного увеличения аффинности связывания, в зависимости от обстоятельств.

**[0051]** Термин « $k_d$ » ( $s^{-1}$  или  $1/s$ ) относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитела с антигеном или константе скорости диссоциации антитела или антителосвязывающего фрагмента. Указанное значение также называют значением  $k_{off}$ .

**[0052]** Термин « $k_a$ » ( $M^{-1} \times s^{-1}$  или  $1/M$ ) относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитела с антигеном или константе скорости ассоциации антитела или антителосвязывающего фрагмента.

**[0053]** Термин « $K_A$ » ( $M^{-1}$  или  $1/M$ ) относится к равновесной константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитела с антигеном или равновесной константе ассоциации антитела или антителосвязывающего фрагмента. Равновесную константу ассоциации получают путем деления  $k_a$  на  $k_d$ .

**[0054]** Термин «связывание» обычно относится к нековалентной связи между двумя или более объектами. Прямое связывание включает физический контакт между объектами или функциональными группами. «Непрямое связывание» включает физическое взаимодействие посредством физического контакта с одним или более промежуточными объектами. Связывание двух или более объектов может быть оценено в любом из множества контекстов, например, где взаимодействующие объекты или функциональные группы изучают по отдельности или в контексте более сложных систем (например, когда они ковалентно или иным образом связаны с объектом-носителем и/или в биологической системе, такой как клетка).

**[0055]** Термины «иммуноспецифически связывается», «иммуноспецифически распознает», «специфически связывается» и «специфически распознает» являются аналогичными терминами в контексте антител и относятся к молекулам, которые связываются с антигеном (например, эпитоп или иммунный комплекс), и такое

связывание понятно специалисту в данной области. Например, молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, по существу, с более низкой аффинностью, что определяется, например, с помощью иммуноанализов, BIACORE®, прибора KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, г. Бойсе, штат Айдахо) или других анализов, известных в данной области. В конкретном варианте осуществления молекулы, которые специфически связываются с антигеном, связываются с ним с  $K_d$ , который составляет по меньшей мере  $2 \log$ ,  $2,5 \log$ ,  $3 \log$ ,  $4 \log$  или больше по сравнению с  $K_d$ , когда молекулы связываются с другим антигеном. Связывание может включать преимущественную ассоциацию связывающего домена, антитела или антигенсвязывающей системы с мишенью связывающего домена, антитела или антигенсвязывающей системы по сравнению с ассоциацией связывающего домена, антитела или антигенсвязывающей системы с объектом, который не является мишенью (т. е. нецелевое связывание). В некоторых вариантах осуществления связывающий домен, антитело или антигенсвязывающая система избирательно связывается с мишенью, если связывание между связывающим доменом, антителом или антигенсвязывающей системой и мишенью больше чем в 2 раза, больше чем в 5 раз, больше чем в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или больше чем в 100 раз по сравнению со связыванием связывающего домена, антитела или антигенсвязывающей системы и объекта, не являющегося мишенью. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен, антитело или антигенсвязывающая система селективно связываются с мишенью, если аффинность связывания составляет менее чем около  $10^{-5}$  М, менее чем около  $10^{-6}$  М, менее чем около  $10^{-7}$  М, менее чем около  $10^{-8}$  М или менее чем около  $10^{-9}$  М.

**[0056]** В другом варианте осуществления молекулы, которые специфически связываются с антигеном, связываются с константой диссоциации ( $K_d$ ) около  $1 \times 10^{-7}$  М. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула специфически связывается с антигеном с «высокой аффинностью», когда  $K_d$  составляет от около  $1 \times 10^{-9}$  М до около  $5 \times 10^{-9}$  М. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула специфически связывается с антигеном с «очень высокой аффинностью», когда  $K_d$  составляет от  $1 \times 10^{-10}$  М до около  $5 \times 10^{-10}$  М. В одном варианте осуществления антигенсвязывающая молекула имеет  $K_d$   $10^{-9}$  М. В одном варианте осуществления коэффициент отклонения составляет менее приблизительно  $1 \times 10^{-5}$ . В вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с GPC3 с  $K_d$  от около  $1 \times 10^{-10}$  М до около  $5 \times 10^{-10}$  М.

**[0057]** В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предложено антитело или его антигенсвязывающая молекула, которая связывается с целевым



антигеном человека, например, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула связывается с GPC3 с 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% или более высокой аффинностью по сравнению с другими видами целевого антигена при измерении, например, с помощью радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или анализа кинетического исключения. В конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающая молекула, описанные в настоящем документе, которые связываются с целевым антигеном человека, будут связываться с другим видом целевого антигена менее чем на 10%, 15% или 20% от связывания антитела или антигенсвязывающей молекулы с антигеном человека, как измерено, например, с помощью радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или анализа кинетического исключения.

**[0058]** Термин «рак» относится к широкой группе различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводит к образованию злокачественных опухолей, которые инвазируют соседние ткани и могут также метастазировать к удаленным частям тела через лимфатическую систему или кровотоки. «Рак» или «раковая ткань» может включать опухоль. В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему описанию могут быть использованы для уменьшения размера опухоли, возникшей, например, в результате рака печени (включая гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК)), рака простаты, рака костей, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи, кожной или внутриглазной злокачественной меланомы, цервикальной интраэпителиальной неоплазии 3 степени цервикальной сквамозной карциномы, рака матки, рак яичников, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака яичек, рака матки, карциномы фаллопиевых труб, карциномы эндометрия, карциномы шейки матки, карциномы влагалища, карциномы вульвы, множественной миеломы, болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы (НХЛ), первичной медиастинальной крупноклеточной В-лимфомы (PMBC), диффузной крупноклеточной В-лимфомы (DLBCL), фолликулярной лимфомы (FL), трансформированной фолликулярной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны селезенки (SMZL), рака пищевода (адено- и плоскоклеточной карциномы), рака молочной железы (например, инвазивной карциномы молочной железы), рака желудка (например, альфа-фетопротеин продуцирующего рака желудка), липосаркомы, шванномы, рака тонкой кишки, рака эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы, рака надпочечников, саркомы мягких тканей, рака уретры, рака легкого (включая сквамозный немелкоклеточный рак легкого),

рака толстой кишки, рака полового члена, хронического или острого лейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза (ALL) (включая не Т-клеточный ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), солидных опухолей детского возраста, лимфоцитарной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака почки или мочеточника, карциномы почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичной лимфомы ЦНС, опухолевого ангиогенеза, опухоли оси позвоночника, глиомы ствола мозга, аденомы гипофиза, саркомы Капоши, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака, Т-клеточной лимфомы, экологически индуцированных видов рака, в том числе индуцированных асбестом, мезотелиомы, холангиокарциномы, других В-клеточных злокачественных опухолей, множественной миеломы и комбинации указанных видов рака. Конкретный вид рака может реагировать на химио- или лучевую терапию, или рак может быть рефрактерным. Рефрактерный рак относится к раку, который не подвергается воздействию хирургического вмешательства, а также рак либо изначально не реагирует на химио- или лучевую терапию, либо рак становится нечувствительным с течением времени.

**[0059]** «Хемокины» представляют собой тип цитокина, который опосредует хемотаксис клеток или направленное перемещение. Примеры хемокинов включают, без ограничения, IL-8, IL-16, эотаксин, эотаксин-3, макрофагальный хемокин (MDC или CCL22), моноцитарный хемотаксический белок 1 (MCP-1 или CCL2), MCP-4, макрофагальный воспалительный белок 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1a), MIP-1 $\beta$  (MIP-1), гамма-индуцированный белок 10 (IP-10) и хемокин, регулируемый тимусом и активацией (TARC или CCL17).

**[0060]** Термин «химерный антигенный рецептор» или «CAR» относится к молекуле, сконструированной таким образом, чтобы включать домен связывания и средство активации иммунных клеток (например, Т-клеток, таких как наивные Т-клетки, Т-клетки центральной памяти, эффекторные Т-клетки памяти, НК-клетки или их комбинации) при связывании антигена. CAR также известны как искусственные Т-клеточные рецепторы, химерные Т-клеточные рецепторы или химерные иммунорецепторы. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит связывающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен, один или более костимулирующих доменов и внутриклеточный сигнальный домен. Т-клетка, которая была генетически сконструирована для экспрессии химерного антигенного рецептора, может называться CAR Т-клеткой. Аналогичным образом НК-клетка, которая была генетически сконструирована для экспрессии химерного антигенного рецептора, может называться CAR НК-клеткой.

**[0061]** Под терминами «уменьшать», или «снижать», или «смягчать», или «понижать», или «ослаблять» в целом понимается способность композиции, рассматриваемой в

настоящем документе, производить, вызывать или инициировать меньший физиологический ответ (т. е. снижающийся эффект) по сравнению с ответом, вызванным либо только носителем (т. е. активным фрагментом), либо контрольной молекулой/композицией. «Уменьшенное» или «сниженное» количество обычно является «статистически значимым» и может включать снижение в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 30 или более раз (например, 500, 1000 раз) (включая все целые числа и десятичные точки между и выше 1, например 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.) по сравнению с ответом (эталонным ответом), вызванным носителем, контрольной композицией.

**[0062]** «Внеклеточный домен» (или «ECD») относится к части полипептида, которая, когда полипептид присутствует в клеточной мембране, находится вне клеточной мембраны, во внеклеточном пространстве.

**[0063]** Используемый в настоящем документе термин «внеклеточный лиганд-связывающий домен» относится к олиго- или полипептиду, способному связывать лиганд, например молекулу клеточной поверхности. Например, внеклеточный лиганд-связывающий домен может быть выбран для распознавания лиганда, который действует как маркер клеточной поверхности на клетках-мишенях, связанных с конкретным болезненным состоянием (например, раком). Примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут действовать как лиганды, включают те, которые связаны с вирусными, бактериальными и паразитарными инфекциями, аутоиммунными заболеваниями и раковыми клетками.

**[0064]** За связывающим доменом CAR может следовать «спейсер» или «шарнир», который обозначает область, отодвигающую антигенсвязывающий домен от поверхности эффекторной клетки, чтобы обеспечить надлежащий контакт между клетками, связывание антигена и активацию (Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419). Шарнирная область в CAR по существу находится между трансмембранным (ТМ) и связывающим доменом. В определенных вариантах осуществления шарнирная область представляет собой шарнирную область иммуноглобулина и может представлять собой шарнирную область иммуноглобулина дикого типа или измененную шарнирную область иммуноглобулина дикого типа. Другие примеры шарнирных областей, используемых в CAR, описанных в настоящем документе, включают шарнирную область, полученную из внеклеточных областей мембранных белков типа 1, таких как CD8альфа, CD4, CD28 и CD7, которые могут представлять собой шарнирные области дикого типа из этих молекул или могут быть изменены.

**[0065]** «Трансмембранная» область или домен представляет собой часть CAR, которая прикрепляет внеклеточную связывающую часть к плазматической мембране иммунной эффекторной клетки и облегчает связывание связывающего домена с целевым антигеном. Трансмембранный домен может представлять собой трансмембранный домен CD3 дзета, однако могут использоваться и другие трансмембранные домены, полученные из CD8 альфа, CD4, CD28, CD45, CD9, CD16, CD22, CD33, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, NKG2D, 2B4 и CD154. В определенных вариантах осуществления трансмембранный домен является синтетическим, в этом случае он будет содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин.

**[0066]** «Внутриклеточный сигнальный домен» или «сигнальный домен» относится к части белка химерного антигенного рецептора, который участвует в трансдукции сообщения эффективного связывания CAR с целевым антигеном во внутреннюю часть иммунной эффекторной клетки, чтобы вызвать эффекторную клеточную функцию, например активацию, продукцию цитокинов, пролиферацию и цитотоксическую активность, включая высвобождение цитотоксических факторов в клетку-мишень, связанную с CAR, или другие клеточные ответы, вызванные связыванием антигена с внеклеточным доменом CAR. Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность, или помощь, или активность, включая секрецию цитокина. Таким образом, термины «внутриклеточный сигнальный домен» или «сигнальный домен», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к части белка, которая трансдуцирует сигнал эффекторной функции и направляет клетку для выполнения специализированной функции. Хотя обычно можно использовать весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать его полностью. В той степени, в которой используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может быть использована вместо всего домена при условии, что она трансдуцирует сигнал эффекторной функции. Термин «внутриклеточный сигнальный домен» включает в себя любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для трансдукции сигнала эффекторной функции. Внутриклеточный сигнальный домен также известен как «домен сигнальной трансдукции» и обычно происходит из участков цепей CD3 или FcR $\gamma$  человека.

**[0067]** Известно, что сигналы, генерируемые только Т-клеточным рецептором, недостаточны для полной активации Т-клетки и что необходим также вторичный или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация Т-клеток

опосредована двумя различными классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: теми, которые инициируют антигензависимую первичную активацию через Т-клеточный рецептор (первичные цитоплазматические сигнальные последовательности), и теми, которые действуют независимо от антигена для обеспечения вторичного или костимулирующего сигнала (вторичные цитоплазматические сигнальные последовательности). Цитоплазматические сигнальные последовательности, которые действуют костимулирующим образом, могут содержать сигнальные домены, которые известны как иммунорецепторный тирозиновый активирующий домен или ITAM. Примеры ITAM-содержащих первичных цитоплазматических сигнальных последовательностей, которые имеют особое применение в настоящем изобретении, включают те, которые получены из DAP10, DAP12, TCR дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 дзета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

**[0068]** Используемый в настоящем документе термин «костимулирующий сигнальный домен» или «костимулирующий домен» относится к части CAR, содержащей внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от антигенных рецепторов или Fc-рецепторов, которые обеспечивают второй сигнал, необходимый для эффективной активации и функционирования Т-лимфоцитов при связывании с антигеном. Примеры таких костимулирующих молекул включают CD27, CD28, 4-1 BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS (CD278), LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, NKD2C, 2B4, CD137, DAP12, B7-H2 и лиганд, который специфически связывает CD83. Соответственно, хотя в настоящем описании представлены примерные костимулирующие домены, полученные из CD28, другие костимулирующие домены могут быть использованы с CAR, описанными в настоящем документе. Включение одного или более костимулирующих сигнальных доменов может повысить эффективность и экспансию Т-клеток и NK-клеток, экспрессирующих рецепторы CAR. Внутриклеточный сигнальный и костимулирующий сигнальный домены могут быть связаны в любом порядке в тандеме с карбоксильным концом трансмембранного домена.

**[0069]** Хотя было показано, что CAR на основе scFv, сконструированные для включения сигнального домена из CD3 или FcR гамма, демонстрируют сильный сигнал для активации Т-клеток и эффекторной функции, их недостаточно, чтобы вызвать сигналы, способствующие выживанию и экспансии Т-клеток в отсутствие сопутствующего костимулирующего сигнала. Другие CAR, содержащие связывающий домен, шарнир, трансмембранный и сигнальный домен, полученный из CD3 дзета или FcR гамма, вместе с одним или несколькими костимулирующими сигнальными доменами (например,

внутриклеточные костимулирующие домены, происходящие от 4-1BB, CD28, CD134 и CD278) могут более эффективно направлять противоопухолевую активность, а также увеличивать секрецию цитокинов, литическую активность, выживаемость и пролиферацию CAR-экспрессирующих Т-клеток *in vitro* в животных моделях и у больных раком (Milone et al., *Molecular Therapy*, 2009; 17: 1453-1464; Zhong et al., *Molecular Therapy*, 2010; 18: 413-420; Carpenito et al., *PNAS*, 2009; 106:3360-3365).

**[0070]** Термин «костимулирующий сигнал» относится к сигналу, который в комбинации с первичным сигналом, таким как лигирование TCR/CD3, приводит к Т-клеточной реакции, такой как, без ограничения, пролиферация и/или повышение экспрессии или снижение экспрессии ключевых молекул.

**[0071]** Термин «костимулирующий лиганд» включает молекулу на антигенпрезентирующей клетке, которая специфически связывается с когнатной костимулирующей молекулой на Т-клетке. Связывание костимулирующего лиганда обеспечивает сигнал, который опосредует Т-клеточный ответ, включая, без ограничения, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п. Костимулирующий лиганд индуцирует сигнал, дополнительный к первичному сигналу, обеспечиваемому стимулирующей молекулой, например, путем связывания комплекса Т-клеточного рецептора (TCR)/CD3 с молекулой главного комплекса гистосовместимости (МНС), нагруженной пептидом. Костимулирующий лиганд может включать, без ограничения, лиганд 3/TR6, лиганд 4-1BB, агонист или антитело, которые связываются с рецептором лиганда Toll, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), лиганд CD30, CD40, CD7, CD70, CD83, медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), ILT4, иммуноглобулин-подобный транскрипт (ILT) 3, индуцируемый костимулирующий лиганд (ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (ICAM), лиганд, который специфически связывается с B7-H3, бета-рецептор лимфотоксина, белок A, связанный с цепью МНС класса I (MICA), белок B, связанный с цепью МНС класса I (MICB), лиганд OX40, PD-L2 или L1 белка запрограммированной клеточной смерти (PD). Костимулирующий лиганд включает, без ограничения, антитело, которое специфически связывается с костимулирующей молекулой, присутствующей на Т-клетке, такой как, без ограничения, 4-1BB, B7-H3, CD2, CD27, CD28, CD30, CD40, CD7, ICOS, лиганд, которое специфически связывается с CD83, лимфоцитарный функциональный антиген-1 (LF1), рецептор естественных клеток-киллеров С (NKG2C), OX40, PD-1 или члена 14 суперсемейства фактора некроза опухоли (TNFSF14 или LIGHT). Костимулирующий лиганд также может связывать когнатную костимулирующую молекулу на NK-клетке.

**[0072]** «Костимулирующая молекула» представляет собой когнатного партнера по связыванию на Т-клетке (и в некоторых случаях на НК-клетке), который специфически связывается с костимулирующим лигандом, тем самым опосредуя костимулирующий ответ Т-клеткой, такой как, без ограничения, пролиферация. Костимулирующие молекулы включают, без ограничения, «костимулирующую молекулу», которая представляет собой когнатного партнера по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, тем самым опосредуя костимулирующий ответ Т-клеткой, такой как, без ограничения, пролиферация. Костимулирующие молекулы включают, без ограничения, 4-1BB/CD137, B7-H3, BAFFR, BLAME (SLAMF8), BTLA, CD 33, CD 45, CD100 (SEMA4D), CD103, CD134, CD137, CD154, CD16, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD19a, CD2, CD22, CD247, CD27, CD276 (B7-H3), CD28, CD29, CD3 (альфа; бета; дельта; эпсилон; гамма; дзета), CD30, CD37, CD4, CD4, CD40, CD49a, CD49D, CD49f, CD5, CD64, CD69, CD7, CD80, лиганд CD83, CD84, CD86, CD8 альфа, CD8 бета, CD9, CD96 (Tactile), CD1-1a, CD1-1b, CD1-1c, CD1-1d, CDS, CEACAM1, CRT AM, DAP-10, DNAM1 (CD226), Fc-гамма-рецептор, GADS, GITR, HVEM (LIGHTR), IA4, ICAM-1, ICAM-1, ICOS, Ig альфа (CD79a), IL2R бета, IL2R гамма, IL7R альфа, интегрин, ITGA4, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB2, ITGB7, ITGB1, KIRDS2, LAT, LFA-1, LFA-1, LIGHT, LIGHT (член 14 суперсемейства фактора некроза опухоли; TNFSF14), LTBR, Ly9 (CD229), лимфоцитарный функциональный антиген-1 (LFA-1 (CD1 1a/CD18), молекулу МНС класса I, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), OX40, PAG/Cbp, PD-1, PSGL1, SELPLG (CD162), сигнальную молекулу активации лимфоцитов, SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3), SLAMF4 (CD244; 2B4), SLAMF6 (NTB-A; Lyl08), SLAMF7, SLP-76, TNF, TNFr, TNFR2, рецептор лиганда Toll, TRANCE/RANKL, VLA1 или VLA-6 или их фрагменты, усечения или комбинации.

**[0073]** «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, в которой аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. В данной области были определены семейства аминокислотных остатков, имеющих боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В определенных вариантах осуществления

один или более аминокислотных остатков в CDR или в пределах каркасной области (областей) антитела или его антигенсвязывающей молекулы могут быть заменены аминокислотным остатком с аналогичной боковой цепью. Как правило, две последовательности считаются «по существу сходными», если они содержат консервативную аминокислотную замену в соответствующих положениях. Например, определенные аминокислоты, как правило, классифицируются как «гидрофобные» или «гидрофильные» аминокислоты и/или имеют «полярные» или «неполярные» боковые цепи. Замена одной аминокислоты на другую того же типа можно рассматривать как консервативную замену. Примеры классификаций аминокислот приведены в таблицах 2 и 3 ниже:

Таблица 2

Аминокислота	3-буквен. обозначение	1-буквен. обозначение	Свойство	Свойство	Индекс гидропатии
Аланин	Ala	A	неполярная	нейтральная	1,8
Аргинин	Arg	R	полярная	положительная	-4,5
Аспарагин	Asn	N	полярная	нейтральная	-3,5
Аспарагиновая кислота	Asp	D	полярная	отрицательная	-3,5
Цистеин	Cys	C	неполярная	нейтральная	2,5
Глутаминовая кислота	Glu	E	полярная	отрицательная	-3,5
Глутамин	Gln	Q	полярная	нейтральная	-3,5
Глицин	Gly	G	неполярная	нейтральная	-0,4
Гистидин	His	H	полярная	положительная	-3,2
Изолейцин	Ile	I	неполярная	нейтральная	4,5
Лейцин	Leu	L	неполярная	нейтральная	3,8
Лизин	Lys	K	полярная	положительная	-3,9
Метионин	Met	M	неполярная	нейтральная	1,9
Фенилаланин	Phe	F	неполярная	нейтральная	2,8
Пролин	Pro	P	неполярная	нейтральная	-1,6
Серин	Ser	S	полярная	нейтральная	-0,8
Треонин	Thr	T	полярная	нейтральная	-0,7
Триптофан	Trp	W	неполярная	нейтральная	-0,9
Тирозин	Tyr	Y	полярная	нейтральная	-1,3
Валин	Val	V	неполярная	нейтральная	4,2



Таблица 3

Двойственные аминокислоты	3-буквен. обозначение	1-буквен. обозначение
Аспарагин или аспарагиновая кислота	Asx	B
Глутамин или глутаминовая кислота	Glx	Z
Лейцин или изолейцин	Xle	J
Неуказанная или неизвестная аминокислота	Xaa	X

**[0074]** Термин «комбинированная терапия» относится к тем случаям, в которых субъект одновременно подвергается воздействию двух или более терапевтических схем (например, двух или более терапевтических соединений). В некоторых вариантах осуществления две или более схем можно вводить одновременно; в некоторых вариантах осуществления такие схемы можно вводить последовательно (например, все «дозы» первой схемы вводят до введения любых доз второй схемы); в некоторых вариантах осуществления такие агенты вводят в перекрывающихся режимах дозирования. В некоторых вариантах осуществления «введение» комбинированной терапии может включать введение одного или более агента(ов) или модальности(-ей) субъекту, получающему другой агент(ы) или модальность(и) в комбинации. Для ясности, комбинированная терапия не требует, чтобы отдельные агенты вводились вместе в одной композиции (или даже обязательно в одно и то же время), хотя в некоторых вариантах осуществления два или более агента или их активные фрагменты могут вводиться вместе в комбинированной композиции или даже в комбинированном соединении (например, как часть одного химического комплекса или ковалентного соединения).

**[0075]** Термин «соответствующий» может быть использован для обозначения положения/идентичности структурного элемента в молекуле или композиции путем сравнения с соответствующей эталонной молекулой или композицией. Например, в некоторых вариантах осуществления мономерный остаток в полимере (например, аминокислотный остаток в полипептиде или остаток нуклеиновой кислоты в полинуклеотиде) может быть идентифицирован как «соответствующий» остатку в соответствующем эталонном полимере. Например, в целях упрощения остатки в полипептиде могут быть обозначены с использованием канонической системы нумерации на основе эталонного полипептида, так что аминокислота «соответствующая» остатку в положении 100, например, не обязательно должна быть 100-й аминокислотой в

аминокислотной цепи при условии, что она соответствует остатку, обнаруженному в положении 100 в эталонном полипептиде. Существуют различные стратегии выравнивания последовательностей, включающие такие программы, как, например, BLAST, CS-BLAST, CUDASW++, DIAMOND, FASTA, GGSEARCH/GLSEARCH, Genoogle, HMMER, HHpred/HHsearch, IDF, Infernal, KLAST, USEARCH, parasail, PSI-BLAST, PSI-Search, ScalaBLAST, Sequilab, SAM, SSEARCH, SWAPHI, SWAPHI-LS, SWIMM или SWIPE, которые могут быть использованы, например, для идентификации «соответствующих» остатков в полипептидах и/или нуклеиновых кислотах в соответствии с настоящим описанием.

**[0076]** Антигенсвязывающая молекула, такая как антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, CAR или TCR, «перекрестно конкурирует» с эталонной связывающей молекулой, такой как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, если взаимодействие между антигеном и первым блоком антигенсвязывающих молекул ограничивает, ингибирует или иным образом снижает способность эталонной связывающей молекулы взаимодействовать с антигеном. Перекрестная конкуренция может быть полной, например связывание антигенсвязывающей молекулы с антигеном полностью блокирует способность эталонной связывающей молекулы связывать антиген, или частичной, например связывание антигенсвязывающей молекулы с антигеном снижает способность эталонной антигенсвязывающей молекулы связывать антиген. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула, которая перекрестно конкурирует с эталонной антигенсвязывающей молекулой, связывает тот же или перекрывающийся эпитоп, что и эталонная антигенсвязывающая молекула. В других вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула, которая перекрестно конкурирует с эталонной антигенсвязывающей молекулой, связывает другой эпитоп по сравнению с эталонной антигенсвязывающей молекулой. Для определения того, конкурирует ли одна антигенсвязывающая молекула с другой, можно использовать множество типов анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммунный анализ (РИА); твердофазный прямой или непрямой иммуоферментный анализ (ИФА); конкурентный сэндвич-анализ (Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); твердофазный прямой биотин-авидин ИФА (Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619); твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением (Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный РИА с прямым мечением с использованием 1–125 меток (Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15); твердофазный

прямой биотин-авидин ИФА (Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-552); и РИА с прямым мечением (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82).

**[0077]** Термин «цитокин» относится к отличному от антитела белку, который высвобождается одной клеткой в ответ на приведение в контакт с конкретным антигеном, при этом цитокин взаимодействует со второй клеткой для опосредования ответа во второй клетке. Цитокин может быть эндогенно экспрессирован клеткой или введен субъекту. Цитокины могут высвобождаться иммунными клетками, в том числе макрофагами, В-клетками, Т-клетками и тучными клетки для распространения иммунного ответа. Цитокины могут индуцировать различные ответы в клетке реципиента. Цитокины могут включать гомеостатические цитокины, хемокины, провоспалительные цитокины, эффекторы и белки острой фазы. Например, гомеостатические цитокины, в том числе интерлейкин (IL) 7 и IL-15, способствуют выживанию и пролиферации иммунных клеток, а провоспалительные цитокины могут способствовать воспалительному ответу. Примеры гомеостатических цитокинов включают, без ограничения, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-15 и интерферон гамма (IFN). Примеры провоспалительных цитокинов включают, без ограничения, IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-13, IL-17a, фактор некроза опухоли (TNF)-альфа, TNF-бета, фибробластический фактор роста (FGF) 2, гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), растворимую молекулу межклеточной адгезии 1 (sIAM-1), растворимую молекулу адгезии сосудистого эндотелия 1 (sVCAM-1), фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), VEGF-C, VEGF-D и плацентарный фактор роста (PLGF). Примеры эффекторов включают, без ограничения, гранзим А, гранзим В, растворимый лиганд Fas (sFasL) и перфорин. Примеры белков острой фазы включают, без ограничения, С-реактивный белок (CRP) и сывороточный амилоид А (SAA).

**[0078]** Термин «домен» относится к части объекта. В некоторых вариантах осуществления «домен» связан со структурным и/или функциональным признаком субъекта, например, таким образом, что при физическом отделении домена от остальной части его исходного объекта он по существу или полностью сохраняет структурный и/или функциональный признак. В некоторых вариантах осуществления домен может содержать часть объекта, которая, будучи отделенной от этого (родительского) объекта и связанной или соединенной с другим (получающим) объектом, по существу сохраняет и/или придает получающему объекту одну или несколько структурных и/или функциональных особенностей, например таких, которые характеризовали ее в родительском объекте. В некоторых вариантах осуществления домен представляет собой часть молекулы (например, малой молекулы, углевода, липида, нуклеиновой кислоты или

полипептида). В некоторых вариантах осуществления домен представляет собой секцию полипептида; в некоторых таких вариантах осуществления домен характеризуется структурным элементом (например, аминокислотной последовательностью или доменом последовательности,  $\alpha$ -спиралью, символом  $\beta$ -листа, символом биспиральной катушки, символом случайной спирали и т. д.) и/или функциональной характеристикой (например, активностью связывания, ферментативной активностью, активностью складывания, сигнальной активностью и т. д.).

**[0079]** Термин «лекарственная форма» может использоваться для обозначения физически дискретной единицы активного агента (например, системы связывания антигенов или антител) для введения субъекту. Как правило, каждая такая единица содержит заданное количество активного агента. В некоторых вариантах осуществления такое количество представляет собой стандартную дозу (или ее целую фракцию), подходящую для введения в соответствии с режимом дозирования, который, как было определено, коррелирует с требующимся или благоприятным результатом при введении соответствующей популяции. Общее количество терапевтической композиции или агента, вводимого субъекту, определяется одним или более медицинскими работниками и может включать введение более чем одной лекарственной формы.

**[0080]** Термин «режим дозирования» может использоваться для обозначения набора одной или более единичных доз, которые вводят индивидуально субъекту. В некоторых вариантах осуществления данный терапевтический агент имеет рекомендованный режим дозирования, который может включать одну или более доз. В некоторых вариантах осуществления режим дозирования включает множество доз, каждая из которых отделена от других доз во времени. В некоторых вариантах осуществления режим дозирования включает множество доз, а последовательные дозы отделены друг от друга временными интервалами равной длины; в некоторых вариантах осуществления режим дозирования включает множество доз, а последовательные дозы отделены друг от друга временными интервалами по меньшей мере двумя разными по длительности. В некоторых вариантах осуществления все дозы в пределах режима дозирования имеют одинаковое количество единиц. В некоторых вариантах осуществления различные дозы в пределах режима дозирования имеют разное количество. В некоторых вариантах осуществления режим дозирования включает первую дозу в первом количестве дозы, а затем одну или более дополнительных доз во втором количестве дозы, отличном от количества первой дозы. В некоторых вариантах осуществления режим дозирования периодически регулируется для достижения желаемого или благоприятного результата.

**[0081]** «Эффекторная клетка» относится к клетке иммунной системы, которая экспрессирует один или более Fc-рецепторов и опосредует одну или более эффекторных функций. В некоторых вариантах осуществления эффекторные клетки могут содержать, без ограничений, один или более из моноцитов, макрофагов, нейтрофилов, дендритных клеток, эозинофилов, тучных клеток, тромбоцитов, больших гранулярных лимфоцитов, клеток Лангерганса, естественных киллеров (NK), Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов. Эффекторные клетки могут принадлежать любому организму, включая, без ограничения, людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян.

**[0082]** «Эффекторная функция» относится к биологическому результату взаимодействия Fc-области антитела с Fc-рецептором или лигандом. Эффекторные функции включают, без ограничений, антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточный опосредованный фагоцитоз (ADCP) и опосредованную комплементом цитотоксичность (СМС). Эффекторная функция может быть зависимой от связывания антигена, независимой от связывания антигена или обеими. АЗКЦ относится к лизису связанных с антителами клеток-мишеней иммунными эффекторными клетками. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, как правило, под АЗКЦ подразумевают, что эффекторные клетки, несущие Fc-рецептор (FcR), распознают и впоследствии уничтожают клетки-мишени, покрытые антителом (например, клетки, которые экспрессируют на своей поверхности антигены, с которыми связывается антитело). Эффекторные клетки, которые опосредуют АЗКЦ, могут содержать иммунные клетки, которые, без ограничений, включают одно или более из естественных клеток-киллеров (NK), макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов.

**[0083]** Термин «терапия на основе сконструированных аутологичных клеток», который может быть сокращен до «eACT™», также известный как адоптивный клеточный перенос, представляет собой способ, посредством которого собирают собственные клетки пациента, такие как Т-клетки, а затем генетически изменяют для распознавания и нацеливания на один или несколько антигенов, экспрессируемых на клеточной поверхности одной или нескольких специфических опухолевых клеток или злокачественных новообразований. Иммунные клетки могут быть сконструированы для экспрессии, например, химерных антигенных рецепторов (CAR) или Т-клеточного рецептора (TCR). CAR-положительные (+) иммунные клетки могут быть сконструированы для экспрессии внеклеточного одноцепочечного переменного фрагмента (scFv) со специфичностью к определенному опухолевому антигену, связанному с внутриклеточной сигнальной частью, содержащей по меньшей мере один костимулирующий домен и по меньшей мере один активирующий домен.

Костимулирующий домен может быть получен из природного костимулирующего домена или его варианта, например варианта, имеющего усеченный шарнирный домен («ТНД»), а активирующий домен может быть получен из, например, CD3 дзета. В определенных вариантах осуществления CAR разработан так, чтобы содержать два, три, четыре или более костимулирующих доменов. ScFv CAR может быть разработан для нацеливания на, например, GPC3, который представляет собой трансмембранный белок, экспрессируемый на различных раковых клетках.

**[0084]** В некоторых вариантах осуществления CAR сконструирован таким образом, что костимулирующий домен экспрессируется в виде отдельной полипептидной цепи. Примеры видов терапии и конструкций на основе CAR+ Т-клеток описаны в патентных публикациях США №№ 2013/0287748, 2014/0227237, 2014/0099309 и 2014/0050708, которые включены посредством ссылки в полном объеме. «Адоптивная клеточная терапия» или «АСТ» включает перенос иммунных клеток с противоопухолевой активностью в организм субъекта, например больного раком пациента. В некоторых вариантах осуществления АСТ представляет собой подход к лечению, который включает применение лимфоцитов (например, сконструированных лимфоцитов) с противоопухолевой активностью.

**[0085]** Термин «эпитоп» обозначает локализованную область антигена, с которой может специфически связываться антитело. Эпитопом могут быть, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или смежный эпитоп), или эпитоп может, например, состоять из двух или более несмежных областей полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или несмежный эпитоп). В некоторых вариантах осуществления эпитоп, с которым связывается антитело, может быть определен, например, с помощью спектроскопии ЯМР, рентгеновской дифракционной кристаллографии, анализов методами ИФА, водородного/дейтериевого обмена в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографией с электрораспылением), анализов сканирования олигопептидов на основе массива и/или картирования мутагенеза (например, картирования сайт-направленного мутагенеза). Для рентгеновской кристаллографии кристаллизация может быть осуществлена с использованием любого из известных способов в данной области (например, Giegé R *et al.*, (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303). Кристаллы антитело:антиген могут быть изучены с помощью хорошо известных методов рентгеновской дифракции и уточнены с помощью компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992,

distributed by Molecular Simulations, Inc.; см., например, Meth Enzymol (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW *et al.*; U.S. 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G (1993) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) Meth Enzymol 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P *et al.*, (2000) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56(Pt 10): 1316-1323). Исследования по картированию мутагенеза могут быть выполнены с помощью любого метода, известного специалистам в данной области. Описания методик мутагенеза, включая методы аланинового сканирования мутагенеза, см., например, в Champe M *et al.*, (1995) J Biol Chem 270: 1388-1394 и Cunningham BC & Wells JA (1989) Science 244: 1081-1085.

**[0086]** Термин «эндогенный» в отношении гена, белка и/или нуклеиновой кислоты означает естественное присутствие этого гена, белка и/или нуклеиновой кислоты в клетке, например иммунной клетке.

**[0087]** Термин «экзогенный» относится к вводимому в клетку агенту, такому как нуклеиновая кислота, ген или белок, например, из внешнего источника. Нуклеиновая кислота, вводимая в клетку, экзогенна, даже если она кодирует белок, который естественным образом встречается в клетке. Такое экзогенное введение нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, можно использовать для увеличения экспрессии белка на уровне, который естественным образом обнаруживается в клетке в аналогичных условиях, например, без введения экзогенной нуклеиновой кислоты.

**[0088]** Термин «вспомогательное вещество» относится к агенту, который может содержаться в композиции, например, для обеспечения желаемой консистенции или стабилизирующего эффекта. В некоторых вариантах осуществления подходящее вспомогательное вещество может содержать, например, крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол или т. п.

**[0089]** «Фрагмент» или «часть» материала или объекта, как описано в настоящем документе, имеет структуру, которая содержит дискретную часть целого, например, физического объекта или абстрактного объекта. В некоторых вариантах осуществления фрагмент не содержит одного или более фрагментов, присутствующих в целом. В некоторых вариантах осуществления фрагмент состоит из или содержит характерный структурный элемент, домен или фрагмент, встречающийся в целом. В некоторых вариантах осуществления полимерный фрагмент содержит или состоит из по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230,

240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или более мономерных единиц (например, остатков), встречающихся в целом полимере. В некоторых вариантах осуществления полимерный фрагмент содержит или состоит из по меньшей мере около 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 25%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более мономерных единиц (например, остатков), встречающихся в целом полимере (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%). В некоторых вариантах осуществления весь материал или объект может быть назван «родителем» фрагмента.

**[0090]** Термин «слитый полипептид» или «слитый белок» обычно относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере два сегмента. Как правило, полипептид, содержащий по меньшей мере два таких сегмента, считается слитым полипептидом, если два сегмента представляют собой фрагменты, которые (1) не содержатся в природе в одном и том же пептиде, и/или (2) не были связаны ранее или соединены друг с другом в одном полипептиде, и/или (3) были связаны или соединены друг с другом посредством вмешательства человека. В различных вариантах осуществления CAR представляет собой слитый белок. В различных вариантах осуществления TCR представляет собой слитый белок. В различных вариантах осуществления доминантно-негативный рецептор TGF бета представляет собой слитый белок.

**[0091]** Термин «генный продукт» или «продукт экспрессии» обычно относится к РНК, транскрибируемой из гена (до и/или после обработки), или к полипептиду (до и/или после модификации), кодируемому РНК, транскрибируемой из гена.

**[0092]** Термин «генетически сконструированный» или «сконструированный» относится к способу модификации генома клетки, в том числе, без ограничения, делеции кодирующей или некодирующей области или ее части или вставке кодирующей области или ее части. В некоторых вариантах осуществления клетка, которую модифицируют, представляет собой лимфоцит, например Т-клетку, НК-клетку, который может быть получен от пациента или донора. В некоторых вариантах осуществления модифицируемая клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC), которая может быть дифференцирована в лимфоцит, например Т-клетку или НК-клетку. Клетка может быть модифицирована для экспрессии экзогенной конструкции, такой как, например, химерный антигенный рецептор (CAR) или Т-клеточный рецептор (TCR), которые включают в геном клетки. Также можно редактировать и другие гены, например, для уменьшения отторжения и/или повышения пригодности клеток. Конструирование обычно включает манипуляции, производимые человеком. Например, полинуклеотид считается «сконструированным», когда две или более последовательностей, которые в



природе не связаны или не соединяются в таком порядке, изменяются человеком с целью их непосредственного связывания или соединения друг с другом в сконструированном полинуклеотиде. В контексте манипуляций с клетками с помощью методов молекулярной биологии клетка или организм считаются «сконструированными», если они подверглись манипуляциям, в результате которых их генетическая информация была изменена (например, был введен новый генетический материал, которого ранее не было, например, путем трансформации, соматической гибридизации, трансфекции, трансдукции или другого механизма, или ранее присутствующий генетический материал был изменен или удален, например, путем замены или делеционной мутации, или с помощью других протоколов). В некоторых вариантах осуществления агент связывания представляет собой измененный лимфоцит, например Т-клетку, НК-клетку, который может быть получен от пациента или донора. Сконструированная клетка может быть модифицирована для экспрессии экзогенной конструкции, такой как, например, химерного антигенного рецептора (CAR) или Т-клеточного рецептора (TCR), которые включают в геном клетки. Потомство сконструированного полинуклеотида или агента связывания обычно называют «сконструированным», даже если фактические манипуляции проводили на предшествующем объекте. В некоторых вариантах осуществления «сконструированный» относится к объекту, который был разработан и получен. Термин «сконструированный» относится к агенту (i), структура которого выбирается или была выбрана человеком; (ii) агент получен способом, требующим вмешательства человека; и/или (iii) агент отличается от природных веществ и других известных агентов.

**[0093]** «Т-клеточный рецептор» или «TCR» относится к антигенраспознающим молекулам, присутствующим на поверхности Т-клеток. Во время нормального развития Т-клеток каждый из четырех генов TCR,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\delta$ , может перестраиваться, что приводит к появлению самых разнообразных белков TCR.

**[0094]** Термин «гетерологичный» означает из любого источника, отличного от встречающихся в природе последовательностей. Например, гетерологичная последовательность, включенная в качестве части костимулирующего белка, представляет собой аминокислоты, которые не встречаются в природе, т. е. не совмещаются с костимулирующим белком человека дикого типа. Например, гетерологичная нуклеотидная последовательность относится к нуклеотидной последовательности, отличной от последовательности, кодирующей костимуляторный белок человека дикого типа.

**[0095]** Термин «идентичность» означает общее родство между полимерными молекулами, например между молекулами нуклеиновых кислот (например, молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между полипептидными молекулами. Известны способы расчета процентной идентичности между двумя представленными полипептидными последовательностями. Расчет процентной идентичности двух последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов, например, может быть выполнен путем выравнивания двух последовательностей для целей оптимального сравнения (например, пробелы могут быть введены в одну или обе из первой и второй последовательностей для оптимального выравнивания, а неидентичные последовательности могут быть проигнорированы для целей сравнения). Затем сравнивают нуклеотиды или аминокислоты в соответствующих положениях. Если положение в первой последовательности занято тем же остатком (например, нуклеотидом или аминокислотой), что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы идентичны в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от количества идентичных положений, разделяемых последовательностями, при этом дополнительно учитывается количество пробелов и длина каждого пробела, которые могут быть введены для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение или выравнивание последовательностей и определение процентной идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с помощью математического алгоритма, такого как BLAST (базовый инструмент поиска локального выравнивания). В некоторых вариантах осуществления полимерные молекулы считаются «гомологичными» друг другу, если их последовательности составляют по меньшей мере 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%).

**[0096]** Чтобы рассчитать процент идентичности, сравниваемые последовательности обычно выравнивают таким образом, чтобы получить наибольшее совпадение между ними. Одним из примеров компьютерной программы, которая может быть использована для определения процентной идентичности, является пакет программ GCG, который включает в себя GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.). Компьютерный алгоритм GAP используют для выравнивания двух полипептидов или полинуклеотидов, для которых необходимо определить процент идентичности последовательностей. Последовательности выравнивают для оптимального совпадения их соответствующих аминокислот или нуклеотидов («совпадающий участок», как определено алгоритмом). В определенных

вариантах осуществления стандартная сравнительная матрица (см. Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 for the PAM 250 comparison matrix; Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919 для матрицы сравнения BLOSUM 62) также используют алгоритм. Для сравнения последовательностей аминокислот или нуклеиновых кислот существуют и другие алгоритмы, в том числе те, которые доступны в коммерческих компьютерных программах, таких как BLASTN для нуклеотидных последовательностей и BLASTP, BLAST с пробелами и PSI-BLAST для аминокислотных последовательностей. Примеры таких программ описаны в Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs," Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., Bioinformatics : A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999. Помимо идентификации аналогичных последовательностей, упомянутые выше программы по существу обеспечивают индикацию степени сходства. В некоторых вариантах осуществления две последовательности считаются по существу аналогичными, если по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более соответствующих остатков являются аналогичными и/или идентичными по сравнению с соответствующим участком остатков (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100% ). В некоторых вариантах осуществления соответствующий участок представляет собой полную последовательность. В некоторых вариантах осуществления соответствующий участок составляет по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60, по меньшей мере 65, по меньшей мере 70, по меньшей мере 75, по меньшей мере 80, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 100, по меньшей мере 125, по меньшей мере 150, по меньшей мере 175, по меньшей мере 200, по меньшей мере 225, по меньшей мере 250, по меньшей мере 275, по меньшей мере 300, по меньшей мере 325, по меньшей мере 350, по меньшей мере 375, по меньшей мере 400, по меньшей мере 425, по меньшей мере 450, по меньшей мере 475, по меньшей мере 500 или

более остатков. Последовательности, имеющие значительное сходство, могут быть гомологами друг друга.

**[0097]** Термин «существенная идентичность» или «по существу идентичный», когда речь идет о нуклеиновой кислоте или ее фрагменте, означает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной нитью) наблюдается идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере примерно в 95%, а более предпочтительно по меньшей мере примерно в 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью любого известного алгоритма идентификации последовательности, такого как FASTA, BLAST или Gap, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая значительную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, в некоторых случаях может кодировать полипептид, имеющий ту же или практически аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

**[0098]** Применительно к полипептидам термин «существенная идентичность» или «по существу идентичный» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафа за делецию по умолчанию, имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности, еще более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичности. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, могут отличаться консервативными аминокислотными заменами.

**[0099]** Термины «улучшать», «увеличивать», «ингибировать» и «уменьшать» указывают на значения, которые относятся к исходному уровню или другому эталонному измерению. В некоторых вариантах осуществления соответствующее эталонное измерение может включать измерение в определенной системе (например, у одного индивидуума) в сопоставимых условиях без присутствия (например, до и/или после) агента или лекарственного средства или в присутствии соответствующего сопоставимого эталонного агента. В некоторых вариантах осуществления соответствующее эталонное измерение может включать в себя измерение в сопоставимой системе, которая, как известно или ожидается, будет реагировать сопоставимым образом в присутствии соответствующего агента или лечения.

**[0100]** «Иммунный ответ» относится к действию клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, естественных клеток-киллеров (NK), макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, дендритных клеток и нейтрофилов) и растворимых макромолекул, продуцируемых любой из этих клеток, или печенью (в том числе Ab,

цитокинов и комплемента), которое приводит к избирательному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или устранению из организма позвоночного инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых или других аномальных клеток, или в случаях аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека.

**[0101]** Термин «иммуноterapia» относится к лечению субъекта, страдающего или подверженного риску развития заболевания или страдающего рецидивом заболевания, с помощью способа, включающего индуцирование, усиление, подавление или иным образом модификацию иммунного ответа. Примеры иммунотерапии включают, без ограничения, терапию НК-клетками и Т-клетками. Т-клеточная терапия может включать адаптивную Т-клеточную терапию, иммуноterapia инфильтрующими опухоль лимфоцитами (TIL), аутологичную клеточную терапию, модифицированную аутологичную клеточную терапию (eACT™) и аллогенную Т-клеточную трансплантацию. Однако специалисту в данной области будет понятно, что способы кондиционирования, раскрытые в настоящем документе, повысят эффективность любой терапии на основе трансплантированных Т-клеток. Примеры Т-клеточных терапий описаны в патентных публикациях США № 2014/0154228 и 2002/0006409, патенте США № 5,728,388 и международной публикации № WO2008/081035.

**[0102]** Т-клетки или НК-клетки для иммунотерапии могут быть получены из любого источника, известного в данной области. Например, Т-клетки и НК-клетки могут быть дифференцированы *in vitro* из популяции гематопозитических стволовых клеток (например, iPSC) или могут быть получены от субъекта. Т-клетки и НК-клетки могут быть получены, например, из мононуклеарных клеток периферической крови (МНКП), костного мозга, ткани лимфатического узла, пуповинной крови, ткани тимуса, ткани из очага инфекции, асцитной жидкости, плеврального выпота, ткани селезенки и опухолей. Кроме того, Т-клетки могут быть получены из одной или нескольких Т-клеточных линий, доступных в данной области. Т-клетки также могут быть получены из единицы крови, собранной у субъекта, с использованием любого количества методик, известных специалисту в данной области, таких как разделение с помощью FICOLL™ и/или аферез. Дополнительные способы выделения Т-клеток для Т-клеточной терапии описаны в патентной публикации США № 2013/0287748, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

**[0103]** Термин «*in vitro*» относится к событиям, происходящим в искусственной среде, например в пробирке, реакционном сосуде, культуре клеток и т. д., а не в многоклеточном организме. Термин «клетка *in vitro*» относится к любой клетке, которая

культивируется *ex vivo*. В частности, клетка *in vitro* может включать Т-клетку или НК-клетку. Термин «*in vivo*» относится к событиям, которые происходят в многоклеточном организме, таком как человек или животное, не являющееся человеком.

**[0104]** Термин «выделенный» относится к веществу, которое (1) было отделено от по меньшей мере некоторых компонентов, с которыми оно было связано в более ранний момент времени или с которым в противном случае вещество было бы связано, и/или (2) присутствует в композиции, которая содержит ограниченное или определенное количество или концентрацию одной или более известных или неизвестных загрязнителей. Выделенное вещество в некоторых вариантах осуществления может быть отделено от около 10%, около 20%, около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или более чем около 99% (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) других компонентов, не относящихся к веществам, с которыми вещество было связано в более ранний момент времени, например другими компонентами или загрязняющими веществами, с которыми вещество было ранее или иным образом связано. В некоторых случаях вещество является выделенным, если оно присутствует в композиции, которая содержит ограниченное или сниженное количество или концентрацию молекул одного и того же или аналогичного типа. Например, в некоторых случаях вещество-нуклеиновая кислота, ДНК или РНК-вещество является выделенным, если оно присутствует в композиции, которая содержит ограниченное или сниженное количество или концентрацию молекул нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, отличных от вещества. Например, в некоторых случаях полипептидное вещество является выделенным, если оно присутствует в композиции, которая содержит ограниченное или сниженное количество или концентрацию молекул полипептида, отличного от вещества. В определенных вариантах осуществления количество может представлять собой, например, количество, измеренное относительно количества необходимого вещества, присутствующего в композиции. В определенных вариантах осуществления ограниченное количество может представлять собой количество, которое составляет не более 100% количества вещества в композиции, например не более 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% количества вещества в композиции (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%). В некоторых случаях композиция является чистой или по существу чистой по отношению к выбранному веществу. В некоторых вариантах осуществления выделенное вещество имеет чистоту около 80%, около 85%, около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99%

или более чем около 99% (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%). Вещество является «чистым», если оно по существу не содержит других компонентов или загрязняющих веществ. В некоторых вариантах осуществления вещество по-прежнему можно рассматривать как «выделенное» или даже «чистое» после объединения с определенными другими компонентами, такими как, например, один или более носителей или вспомогательных веществ (например, буфер, растворитель, вода и т. д.); в таких вариантах осуществления процент выделения или чистоты вещества рассчитывают без учета таких носителей или вспомогательных веществ.

**[0105]** Термин «линкер» (L) или «линкерный домен» или «линкерная область» относится к олиго- или полипептидной области длиной от около 1 до 100 аминокислот, которая, например, связывает любые домены/области CAR, TCR, доминантно-негативного рецептора TGF $\beta$  и/или scFv или даже одного из этих полипептидов. Линкеры могут состоять из гибких остатков, таких как глицин и серин, так что смежные белковые домены могут свободно перемещаться относительно друг друга. Более длинные линкеры могут использоваться, когда желательно, чтобы два соседних домена не мешали друг другу в пространстве. Линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Примеры расщепляемых линкеров включают в себя 2A линкеры (например, T2A), 2A-подобные линкеры или их функциональные эквиваленты, а также их комбинации. В некоторых вариантах осуществления линкеры включают пикорнавирусный 2A-подобный линкер, CHYSEL (SEQ ID NO: 1) последовательности свиного тешовируса (P2A), вируса (T2A) или их комбинации, варианты и функциональные эквиваленты. В других вариантах осуществления линкерные последовательности могут содержать домен Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly<sup>(2A)</sup>-Pro<sup>(2B)</sup> (SEQ ID NO: 2), что приводит к расщеплению между 2A глицином и 2B пролином. В некоторых примерах расщепляемый линкер используют для соединения CAR или TCR с доминантно-негативным рецептором TGF $\beta$ . Специалистам в данной области известны другие линкеры, которые могут быть использованы в контексте этого описания. Линкер может представлять собой часть многоэлементного агента, который соединяет друг с другом различные элементы. Например, полипептид, состоящий из двух или более функциональных или структурных доменов, может включать участок аминокислот между такими доменами, который связывает их друг с другом. В некоторых вариантах осуществления полипептид, включающий линкерный элемент, имеет общую структуру вида S1-L-S2, где S1 и S2 могут быть одинаковыми или разными и представляют собой два домена, связанных друг с другом линкером. Линкер может соединять или связывать друг с другом любой из доменов/областей CAR или TCR. В некоторых вариантах осуществления полипептидный линкер имеет длину по меньшей

мере 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, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более аминокислот (например, длину от 1 до 10, от 1 до 20, от 1 до 30, от 1 до 40, от 1 до 50, от 1 до 60, от 1 до 70, от 1 до 80, от 1 до 90, от 1 до 100, от 10 до 20, от 10 до 30, от 10 до 40, от 10 до 50, от 10 до 60, от 10 до 70, от 10 до 80, от 10 до 90 или от 10 до 100 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления линкер характеризуется тем, что он не имеет жесткой трехмерной структуры, а вместо этого обеспечивает гибкость полипептида. В другом примере он может использоваться для соединения с несколькими экспрессируемыми полипептидами, такими как CAR или TCR и TGF $\beta$ -DNR. В некоторых примерах CAR или TGF $\beta$ -DNR соединены расщепляемым линкером.

**[0106]** Другие линкеры включают нерасщепляемые линкеры. Ряд линкеров используют для реализации настоящего изобретения, в том числе «гибкие линкеры». Последние богаты глицином. Klein et al., *Protein Engineering, Design & Selection* Vol. 27, No. 10, pp. 325–330, 2014; Priyanka et al., *Protein Sci.*, 2013 Feb; 22(2): 153–167.

**[0107]** В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой синтетический линкер. Синтетический линкер может иметь длину от около 10 аминокислот до около 200 аминокислот, например от 10 до 25 аминокислот, от 25 до 50 аминокислот, от 50 до 75 аминокислот, от 75 до 100 аминокислот, от 100 до 125 аминокислот, от 125 до 150 аминокислот, от 150 до 175 аминокислот или от 175 до 200 аминокислот. Синтетический линкер может иметь длину от 10 до 30 аминокислот, например 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот. Синтетический линкер может иметь длину от 30 до 50 аминокислот, например от 30 до 35 аминокислот, от 35 до 40 аминокислот, от 40 до 45 аминокислот или от 45 до 50 аминокислот.

**[0108]** В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гибкий линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер богат остатками глицина (Gly или G). В некоторых вариантах осуществления линкер богат остатками серина (Ser или S). В некоторых вариантах осуществления линкер богат остатками глицина и серина.

**[0109]** Термин «лимфоцит» включает естественные клетки-киллеры (NK), Т-клетки или В-клетки. NK-клетки представляют собой тип цитотоксических (токсичных для клеток) лимфоцитов, которые представляют собой компонент врожденной иммунной системы. NK-клетки отторгают опухоли и клетки, инфицированные вирусами. Они действуют через процесс апоптоза или запрограммированной клеточной смерти. Их назвали «естественными киллерами», поскольку они не требуют активации для уничтожения клеток. Т-клетки играют важную роль в клеточноопосредованном иммунитете (без участия антител). Т-клеточные рецепторы (TCR) дифференцируются самостоятельно из



других типов лимфоцитов. Тимус, специализированный орган иммунной системы, отвечает главным образом за созревание Т-клеток. Также существует несколько типов Т-клеток, а именно: Т-клетки-хэлперы (например, CD4<sup>+</sup> клетки), цитотоксические Т-клетки (также известные как ТС, цитотоксический Т-лимфоцит, CTL, Т-киллерная клетка, цитолитическая Т-клетка, CD8<sup>+</sup> Т-клетки или Т-клетка-киллер), Т-клетки памяти ((i) стволовые T<sub>SCM</sub> клетки памяти, подобные наивным клетки, представляют собой CD45RO<sup>-</sup>, CCR7<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup> (L-селектин), CD27<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> и IL-7Rα<sup>+</sup>, но они также экспрессируют значительные количества CD95, IL-2Rβ, CXCR3 и LFA-1, и демонстрируют многочисленные функциональные особенности клеток памяти); (ii) центральные T<sub>CM</sub> клетки памяти экспрессируют L-селектин и CCR7, они секретируют IL-2, но не IFNγ или IL-4, и (iii) эффекторные T<sub>EM</sub> клетки памяти, однако, они не экспрессируют L-селектин или CCR7, но продуцируют эффекторные цитокины, такие как IFNγ и IL-4), регуляторные Т-клетки (Treg, Т-клетки-супрессоры или CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> регуляторные Т-клетки), естественные Т-клетки-киллеры (NKT) и гамма-дельта Т-клетки. В-клетки, с другой стороны, играют роль в гуморальном иммунитете (с участием антител). Они вырабатывают антитела и антигены, выполняют роль антигенпрезентирующих клеток (APC) и превращаются в В-клетки памяти после активации в результате взаимодействия с антигенами. У млекопитающих незрелые В-клетки образуются в костном мозге, откуда и произошло их название.

**[0110]** Термин «нейтрализующий» относится к антигенсвязывающей молекуле, scFv, антителу или ее фрагменту, которые связываются с лигандом и предупреждают или ослабляют биологический эффект этого лиганда. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула, scFv, антитело или ее фрагмент непосредственно блокируют сайт связывания на лиганде или иным образом изменяют способность лиганда связываться косвенными средствами (такими как структурные или энергетические изменения лиганда). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая молекула, scFv, антитело или ее фрагмент препятствует выполнению белком, с которым они связаны, своей биологической функции.

**[0111]** «Нуклеиновая кислота» относится к любой полимерной цепи нуклеотидов. Нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК, РНК или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит один или более остатков природных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит один или более аналогов нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты получают одним или более из выделения из природного источника, ферментативного синтеза путем полимеризации на

основе комплементарного шаблона (*in vivo* или *in vitro*), размножения в рекомбинантной клетке или системе, а также химического синтеза. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 или более остатков в длину (например, от 20 до 100, от 20 до 500, от 20 до 1000, от 20 до 2000 или от 20 до 5000 или более остатков). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является частично или полностью одноцепочечной; в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота является частично или полностью двуцепочечной. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота имеет нуклеотидную последовательность, включающую по меньшей мере один элемент, который кодирует или является компонентом последовательности, которая кодирует полипептид.

**[0112]** Термин «функционально связанный» относится к смежному расположению, где описанные компоненты находятся в отношениях, позволяющих им функционировать по назначению. Например, элемент управления «функционально связанный» с функциональным элементом, связан таким образом, что экспрессия и/или активность функционального элемента достигается в условиях, совместимых с элементом управления. В различных вариантах осуществления промотор функционально связан с нуклеиновыми кислотами.

**[0113]** Термин «пациент» включает любого человека, страдающего от рака (например, множественной миеломы). В настоящем документе термины «субъект» и «пациент» используются взаимозаменяемо.

**[0114]** Термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и относятся к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид содержит по меньшей мере две аминокислоты, и не ограничивается максимальным количеством аминокислот, которые могут содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. В настоящем документе этот термин относится как к коротким цепочкам, которые также обычно называют пептидами, олигопептидами и олигомерами, например, так и к более длинным цепочкам, которые обычно называют белками, которых существует множество типов. «Полипептиды» включают, например, среди прочего биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные

полипептиды, производные, аналоги, слитые белки. Полипептиды включают природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их комбинацию.

**[0115]** Термин «фармацевтически приемлемый» относится к молекуле или композиции, которая при введении реципиенту не оказывает вредного воздействия на него, или любое вредное воздействие перевешивается пользой для реципиента. Что касается носителя, разбавителя или вспомогательного вещества, используемого для составления композиции, описанной в настоящем документе, фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество должны быть совместимы с другими ингредиентами композиции и не быть вредным для ее реципиента, или любой вредный эффект должен быть перевешен пользой для реципиента. Термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, например жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество или инкапсулирующий материал, участвующий в переносе или транспортировке агента из одной части тела в другую (например, из одного органа в другой). Каждый носитель, присутствующий в фармацевтической композиции, должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами композиции и не оказывать вредного воздействия на пациента, либо любое вредное воздействие должно быть перевешено пользой для реципиента. Некоторые примеры материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетатцеллюлоза; порошковую трагакантовую камедь; солод; желатин; тальк; эксципиенты, такие как масло какао и свечные воски; масла, такие как растительное арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; pH-буферные растворы; полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; и другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

**[0116]** Термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции, в которой активное вещество содержится вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. В некоторых вариантах осуществления активный агент присутствует в количестве разовой дозы, подходящей для введения в терапевтической

схеме, которая показывает статистически значимую вероятность достижения заранее определенного терапевтического эффекта при введении соответствующему субъекту или популяции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть составлена для введения в твердой или жидкой форме, включая, без ограничения, форму, приспособленную для следующего: пероральный прием, например жидкая лекарственная форма для перорального введения (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, например предназначенные для буккального, сублингвального и системного всасывания, болюсы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык; парентеральное введение, например путем подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидуральной инъекции в виде, например, стерильного раствора или суспензии или препарата с замедленным высвобождением; местное применение, например в виде крема, мази, пластыря или спрея с контролируемым высвобождением, применяемого на коже, легких или ротовой полости; интравагинальное или внутривлагалищное введение, например в виде пессария, крема или пены; сублингвальное введение; окулярное введение; трансдермальное введение; или назальное, легочное введение и введение через другие слизистые оболочки.

**[0117]** Термин «пролиферация» относится к повышению деления клеток, симметричному или асимметричному делению клеток. В некоторых вариантах осуществления «пролиферация» относится к симметричному или асимметричному делению Т-клеток. «Повышенная пролиферация» возникает при увеличении количества клеток в обработанном образце по сравнению с клетками в необработанном образце.

**[0118]** Термин «эталон» описывает стандарт или контроль, относительно которого выполняется сравнение. Например, в некоторых вариантах осуществления исследуемый агент, животное, индивидуум, популяцию, образец, последовательность или значение сравнивают с эталоном или контролем, который представляет собой агент, животное, индивидуум, популяцию, образец, последовательность или значение. В некоторых вариантах осуществления эталон или контроль тестируют, измеряют и/или определяют по существу одновременно с тестированием, измерением или определением исследуемого объекта. В некоторых вариантах осуществления эталон или контроль является архивным эталоном или контролем, необязательно воплощенным в материальном носителе. Как правило, эталон или контроль определяют или характеризуются в условиях или обстоятельствах, сопоставимых с оцениваемыми. При наличии достаточного сходства можно обосновать использование и/или сравнение с выбранным эталоном или контролем.

**[0119]** «Регуляторные Т-клетки» («Treg» «Treg-клетки» или «клетки Treg») относятся к линии CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, которые участвуют в контроле определенной иммунной

активности, например аутоиммунитета, аллергии и ответа на инфекцию. Регуляторные Т-клетки могут регулировать активность популяций Т-клеток, а также влиять на некоторые типы клеток врожденной иммунной системы. Tregs можно определить по экспрессии биомаркеров CD4, CD25 и Foxp3, а также по низкой экспрессии CD127. Встречающиеся в природе Treg-клетки обычно составляют около 5–10% периферических CD4+ Т-лимфоцитов. Однако Treg-клетки в опухолевом микроокружении (т. е. Treg-клетки, инфильтрующие опухоль), Treg-клетки могут составлять до 20–30% от общей популяции CD4+ Т-лимфоцитов.

**[0120]** Термин «образец» обычно относится к аликвоте материала, полученного или происходящего из представляющего интерес источника. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес источник представляет собой биологический источник или источник окружающей среды. В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес источник может содержать клетку или организм, например популяцию клеток, ткань или животное (например, человека). В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес источник содержит биологическую ткань или жидкость. В некоторых вариантах осуществления биологическая ткань или жидкость может включать амниотическую жидкость, внутриглазную жидкость, асцит, желчь, костный мозг, кровь, грудное молоко, спинномозговую жидкость, серу, хилус, эякулят, эндолимфу, экссудат, фекалии, желудочную кислоту, желудочный сок, лимфу, слизь, перикардальную жидкость, перилимфу, перитонеальную жидкость, плевральную жидкость, гной, слизистые выделения, слюну, кожное сало, сперму, сыворотку, смегму, мокроту, синовиальную жидкость, пот, слезы, мочу, вагинальный секрет, жидкость стекловидного тела, рвотные массы и/или их комбинации или компонент(ы). В некоторых вариантах осуществления биологическая жидкость может содержать внутриклеточную жидкость, внеклеточную жидкость, внутрисосудистую жидкость (плазму крови), интерстициальную жидкость, лимфатическую жидкость и/или внутриклеточную жидкость. В некоторых вариантах осуществления биологическая жидкость может содержать растительный экссудат. В некоторых вариантах осуществления биологическая ткань или образец могут быть получены, например, путем аспирации, биопсии (например, тонкоигольной или тканевой биопсии), мазка (например, орального, назального, кожного или вагинального мазка), соскоба, операции, промывания или лаважа (например, бронхоальвеолярного, дуктального, назального, глазного, орального, маточного, вагинального или другого промывания или лаважа). В некоторых вариантах осуществления биологический образец содержит клетки, полученные от субъекта. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой «первичный образец»,

полученный непосредственно из источника, представляющего интерес, любым подходящим способом. В некоторых вариантах осуществления, как будет очевидно из контекста, термин «образец» относится к препарату, который получают путем обработки (например, путем удаления одного или более компонентов и/или путем добавления одного или более агентов к) первичному образцу. Такой «обработанный образец» может содержать, например, нуклеиновые кислоты или белки, экстрагированные из образца или полученные путем воздействия на первичный образец одной или более методиками, такими как амплификация или обратная транскрипция нуклеиновой кислоты, выделение и/или очистка определенных компонентов и т. д.

**[0121]** «Одноцепочечный вариабельный фрагмент», «одноцепочечные вариабельные фрагменты антитела» или «scFv антитела» относятся к формам антител, содержащих вариабельные области только тяжелой и легкой цепей, соединенных линкерным пептидом.

**[0122]** Термин «стадия рака» относится к качественной или количественной оценке уровня прогрессирования рака. В некоторых вариантах осуществления критерии, используемые для определения стадии рака, могут включать, без ограничения, один или более из следующих: локализация рака в организме, размер опухоли, распространение рака на лимфатические узлы, распространение рака на одну или несколько различных частей тела и т. д. В некоторых вариантах осуществления определение стадии рака может быть выполнено с использованием так называемой системы TNM, согласно которой T означает размер и распространенность основной опухоли, обычно называемой первичной опухолью; N относится к количеству расположенных рядом лимфатических узлов, пораженных раком; и M относится к наличию или отсутствию метастазов. В некоторых вариантах осуществления рак может быть отнесен к 0-й стадии (присутствуют аномальные клетки, не распространившиеся на близлежащие ткани, также называемый карциномой *in situ* или CIS; CIS не является раком, хотя может стать раком), стадиям I-III (рак присутствует; чем выше число, тем больше опухоль и тем больше она распространилась в близлежащие ткани) или стадии IV (рак распространился в отдаленные части тела). В некоторых вариантах осуществления рак может быть отнесен к стадии, выбранной из группы, состоящей из следующего: *in situ*; локализованный (рак ограничен местом его начала, без признаков распространения); региональный (рак распространился в ближайшие лимфатические узлы, ткани или органы); отдаленный (рак распространился на удаленные части тела); и неизвестный (недостаточно информации для определения стадии).

**[0123]** Термин «стимуляция» относится к первичному ответу, индуцированному связыванием стимулирующей молекулы с ее когнатным лигандом, при этом связывание опосредует явление трансдукции сигнала. «Стимулирующая молекула» представляет собой молекулу на Т-клетке, например, комплекс Т-клеточного рецептора (TCR)/CD3, который специфически связывается с когнатным стимулирующим лигандом, присутствующим на антигенпрезентирующей клетке. «Стимулирующий лиганд» представляет собой лиганд, который при присутствии на антигенпрезентирующей клетке (например, APC, дендритной клетке, В-клетке и т. п.) может специфически связываться со стимулирующей молекулой на Т-клетке, за счет чего опосредуется первичный ответ Т-клеткой, включая, без ограничения, активацию, инициацию иммунного ответа, пролиферацию и т.п. Стимулирующие лиганды включают, но не ограничиваются ими, антитело к CD3 (такое как ОКТ3), молекулу МНС класса I, нагруженную пептидом, суперагонистическое антитело к CD2 и суперагонистическое антитело к CD28.

**[0124]** Фраза «терапевтический агент» может относиться к любому агенту, который вызывает желаемый фармакологический эффект при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления агент считается терапевтическим агентом, если он демонстрирует статистически значимый эффект в соответствующей популяции. В некоторых вариантах осуществления соответствующая популяция может представлять собой популяцию моделей организмов или людей. В некоторых вариантах осуществления соответствующая популяция может быть определена по различным критериям, таким как определенная возрастная группа, пол, генетический фон, предшествующие клинические состояния, в соответствии с наличием или отсутствием биомаркера и т. д. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой вещество, которое может быть использовано для облегчения, смягчения, снижения, подавления, предотвращения, отсрочки начала, уменьшения тяжести и/или снижения частоты проявления одного или более симптомов или признаков заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой агент, который был или должен быть одобрен государственным органом до его продажи для введения людям. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой агент, для которого для введения человеку требуется медицинское назначение.

**[0125]** «Терапевтически эффективное количество», «эффективная доза», «эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» терапевтического агента, например сконструированных CAR Т-клеток или NK-клеток, — это любое количество, которое при использовании отдельно или в комбинации с другим терапевтическим агентом защищает

субъекта от начала заболевания или способствует регрессу заболевания, о чем свидетельствует уменьшение выраженности симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания или предотвращение ухудшения состояния или инвалидности вследствие поражения болезнью. Способность терапевтического агента стимулировать регрессию заболевания может быть оценена с помощью различных способов, известных специалисту по клиническим испытаниям, таких как у субъектов-людей во время клинических испытаний, в животных модельных системах, прогнозирующих эффективность у людей, или путем анализа активности средства в анализах *in vitro*.

**[0126]** Термины «трандукция» и «трандуцированный» относятся к процессу, посредством которого чужеродная ДНК вводится в клетку посредством вирусного вектора (см. Jones et al., “Genetics: principles and analysis,” Boston: Jones & Bartlett Publ. (1998)). В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой ретровирусный вектор, ДНК-вектор, РНК-вектор, аденовирусный вектор, бакуловирусный вектор, вектор на основе вируса Эпштейна-Барра, вектор на основе паповавируса, вектор на основе осповакцины, вектор на основе вируса простого герпеса, аденовирусный вектор, лентивирусный вектор или любую их комбинацию.

**[0127]** «Трансформация» относится к любому процессу, посредством которого экзогенная ДНК вводится в клетку-хозяина. Трансформация может происходить в естественных или искусственных условиях с использованием различных способов. Трансформация может быть достигнута с использованием любого известного способа введения чужеродных последовательностей нуклеиновых кислот в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина. В некоторых вариантах осуществления некоторые методики трансформации выбирают в зависимости от трансформируемой клетки-хозяина и/или вводимой нуклеиновой кислоты. Способы трансформации могут включать, но не ограничиваются ими, вирусную инфекцию, электропорацию и липофекцию. В некоторых вариантах осуществления «трансформированная» клетка стабильно трансформирована, так как вставленная ДНК способна реплицироваться либо как автономно реплицирующаяся плазида, либо как часть хромосомы хозяина. В некоторых вариантах осуществления трансформированная клетка может экспрессировать введенные нуклеиновой кислоты.

**[0128]** «Лечение» или «осуществление лечения» субъекта относится к любому типу вмешательства или процессу, выполняемому в отношении субъекта, или введению активного агента субъекту с целью обращения, облегчения, нормализации, ингибирования, замедления или предупреждения возникновения, прогрессирования,



развития, тяжести или повторного проявления симптома, осложнения или состояния или биохимических показателей, ассоциированных с заболеванием. В одном варианте осуществления «лечение» или «осуществление лечения» включает частичную ремиссию. В другом варианте осуществления «лечение» или «осуществление лечения» включает полную ремиссию. В некоторых вариантах осуществления лечение может проводиться по отношению к субъекту, у которого отсутствуют признаки соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния, и/или по отношению к субъекту, у которого наблюдаются только ранние признаки заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления такое лечение может проводиться по отношению к субъекту, который имеет один или несколько установленных признаков соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение может проводиться по отношению к субъекту, у которого диагностировано соответствующее заболевание, расстройство и/или состояние, или который страдает от соответствующего заболевания, расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение может проводиться по отношению к субъекту, о котором известно, что он имеет один или несколько факторов восприимчивости, которые статистически коррелируют с повышенным риском развития соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния.

**[0129]** Термин «вектор» относится к реципиентной молекуле нуклеиновой кислоты, модифицированной таким образом, чтобы включать в себя предусмотренную последовательность нуклеиновой кислоты. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая относится к кольцевой двухцепочечной молекуле ДНК, в которую может быть лигирована дополнительная ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, при этом дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицироваться вместе с геномом хозяина. Более того, определенные векторы содержат последовательности, которые направляют экспрессию вставленных генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в настоящем документе называют «векторами экспрессии». Для конструирования векторов могут использоваться стандартные методики, например, как показано в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A*

Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), содержание которой включено в настоящий документ путем ссылки.

**[0130]** Термин «последовательность» относится к нуклеотидной последовательности любой длины, которая может представлять собой ДНК или РНК; может быть линейной, кольцевой или разветвленной и может быть одноцепочечной или двухцепочечной. Термин «донорная последовательность» относится к нуклеотидной последовательности, которая вставлена в геном. Донорная последовательность может иметь любую длину, например от 2 до 10 000 нуклеотидов (или любое целое число между ними или выше), предпочтительно от около 100 до 1000 нуклеотидов (или любое целое число между ними), более предпочтительно от около 200 до 500 нуклеотидов.

**[0131]** «Ген» для целей настоящего описания включает область ДНК, кодирующую генный продукт (см. далее), а также все области ДНК, которые регулируют продукцию генного продукта, независимо от того, примыкают ли такие регуляторные последовательности к кодирующим и/или транскрибируемым последовательностям или нет. Соответственно, ген включает, но не обязательно ограничивается ими, промоторные последовательности, терминаторы, трансляционные регуляторные последовательности, такие как сайты связывания рибосом и внутренние сайты входа рибосом, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы, граничные элементы, точки начала репликации, сайты прикрепления матрицы и области контроля локуса.

**[0132]** «Трансмембранный домен» представляет собой домен полипептида, который включает по меньшей мере одну смежную аминокислотную последовательность, которая пересекает липидный бислой, когда присутствует в соответствующем эндогенном полипептиде при экспрессии в клетке млекопитающего. Например, трансмембранный домен может включать одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять смежных аминокислотных последовательностей, каждая из которых пересекает липидный бислой, когда присутствует в соответствующем эндогенном полипептиде при экспрессии в клетке млекопитающего. Трансмембранный домен может, например, включать по меньшей мере одну (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять) смежную аминокислотную последовательность (которая пересекает липидный бислой, когда присутствует в соответствующем эндогенном полипептиде при экспрессии в клетке млекопитающего), которая имеет  $\alpha$ -спиральную вторичную структуру в липидном бислое. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может включать две или более смежных аминокислотных последовательностей (каждая из которых пересекает липидный бислой, когда присутствует в соответствующем эндогенном полипептиде при экспрессии в клетке млекопитающего), которые образуют

вторичную структуру  $\beta$ -цилиндра в липидном бислое. В настоящем документе описаны неограничивающие примеры трансмембранных доменов. В данной области известны дополнительные примеры трансмембранных доменов.

**[0133]** Фраза «внеклеточная сторона плазматической мембраны» при описании расположения полипептида означает, что полипептид включает по меньшей мере один трансмембранный домен, проходящий через плазматическую мембрану, и по меньшей мере один домен (например, по меньшей мере один антигенсвязывающий домен), расположенный во внеклеточном пространстве.

**[0134]** В настоящем описании могут использоваться, если специально не указано обратное, методы химии, биохимии, органической химии, молекулярной биологии, микробиологии, методы рекомбинантной ДНК, генетики, иммунологии и клеточной биологии, доступные специалистам в данной области, многие из которых описаны ниже в иллюстративных целях. Такие методы подробно описаны в литературе. См., например, Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001); Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, updated July 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley–Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology* Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*; а также монографии в журналах, таких как *Advances in Immunology*.

**[0135]** В настоящем изобретении предложены антигенсвязывающие агенты, такие как антитела, химерные антигенные рецепторы (CAR) и Т-клеточные рецепторы (TCR), содержащие по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, который связывается с глипиканом 3 (GPC3), именуемый здесь как GPC3-связывающий домен. Помимо прочего, в настоящем описании представлены способы и композиции, полезные для лечения рака и/или для инициирования или модулирования иммунных реакций. В различных вариантах осуществления домен связывания GPC3 представляет собой scFv. Иллюстративные аминокислотные последовательности домена связывания GPC3 и последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие их, представлены в настоящем документе, например, в таблицах 4–8. В некоторых вариантах осуществления домен связывания GPC3 по

настоящему изобретению содержится в химерном антигенном рецепторе (CAR). В некоторых вариантах осуществления домен связывания GPC3 по настоящему изобретению содержится в Т-клеточном рецепторе (TCR). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий агент по настоящему изобретению представляет собой сконструированный Т-клеточный рецептор (TCR). В некоторых вариантах осуществления CAR и/или TCR экспрессируются доминантно-негативным рецептором TFG $\beta$  R (DN TFG $\beta$  R). В некоторых вариантах осуществления CAR и/или TCR экспрессируются мембранносвязанным интерлейкином 15 (IL-15), химерным рецептором суши-домена IL-15R $\alpha$ . Раскрыты антитела и их фрагменты, включающие домен связывания GPC3, такие как представленные в таблицах 4–8.

**[0136]** В различных вариантах осуществления настоящего описания представлен вектор, кодирующий домен связывания GPC3 или агент связывания GPC3, представленный в настоящем документе, такой как вектор, кодирующий GPC3-связывающий CAR или TCR. В различных вариантах осуществления настоящего описания предложен вектор, кодирующий DN TFG $\beta$  R, например вектор, кодирующий GPC3-связывающий CAR и DN TFG $\beta$  R. В некоторых вариантах осуществления DN TFG $\beta$  R кодируется в отдельном векторе, отличном от вектора, кодирующего GPC3-связывающий CAR или TCR. В некоторых вариантах осуществления DN TFG $\beta$  R кодируется в том же векторе, кодирующем GPC3-связывающий CAR или TCR. В различных вариантах осуществления настоящего описания предложен вектор, кодирующий химерный рецептор суши-домена IL-15-IL-15R $\alpha$ , например вектор, кодирующий GPC3-связывающий CAR и химерный рецептор суши-домена IL-15-IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор суши-домена IL-15-IL-15R $\alpha$  кодируется в отдельном векторе, отличном от вектора, кодирующего GPC3-связывающий CAR или TCR. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор суши-домена IL-15-IL-15R $\alpha$  кодируется в том же векторе, кодирующем GPC3-связывающий CAR или TCR.

**[0137]** Различные варианты осуществления настоящего описания предлагают GPC3-связывающий агент, который представляет собой клетку, кодирующую или экспрессирующую GPC3-связывающий CAR или TCR, например Т-клетку или НК-клетку, сконструированную для кодирования или экспрессии GPC3-связывающего CAR или TCR. В настоящем описании предложены иммунные клетки, генетически модифицированные интегрированным геном, например нуклеотидной последовательностью, кодирующей GPC3-связывающий CAR или TCR (например, конструкция для конститутивной экспрессии и/или конструкция для индуцибельной экспрессии, включающая такую нуклеотидную последовательность). Согласно некоторым

вариантам осуществления иммунные клетки дополнительно сконструированы для экспрессии DN TFG $\beta$  R. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунные клетки дополнительно сконструированы для экспрессии химерного рецептора сушидомена IL-15-IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложены способы лечения субъекта, имеющего опухоль, такую как ГЦК, включающие введение субъекту терапевтического агента, связывающего GPC3, описанного в настоящем документе, и/или терапевтического белка, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают введение одного или более дополнительных терапевтических средств (например, второго связывающего агента (например, CAR T-клетки, CAR-NK-клетки, TCR-T-клетки, TIL-клетки, аллогенной NK-клетки и аутологичной NK-клетки), конъюгата антителолекарство, антитела, биспецифического антитела, биспецифического антитела, задействующего T-клетки, сконструированного антитела и/или полипептида, описанного в настоящем документе).

**[0138]** Связывающий GPC3 домен по настоящему описанию может содержать антигенсвязывающие последовательности, встречающиеся в антителе, описанном в настоящем документе, например mAb1-5, как описано в таблицах 4–8. В некоторых случаях связывающий GPC3 домен по настоящему описанию содержит GPC3-связывающий домен, описанный в настоящем документе, такой как scFv. Если не указано иное, следует понимать, что ссылки на GPC3 в настоящем описании относятся к GPC3 человека.

**[0139]** Глипикан 3 (GPC3, NCBI Gene ID No. 2719, обновленный 10 апреля 2021 года, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте) является членом семейства интегральных мембранных протеогликанов, связанных с глипиканом (GRIPS). GPC3 содержит основной белок, прикрепленный к цитоплазматической мембране с помощью гликозилфосфатидилинозитольной связи. GPC3 экспрессируется в ряде видов рака, включая гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК) и плоскоклеточную карциному легкого (SCC).

**[0140]** В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему описанию включает по меньшей мере одну CDR тяжелой цепи (HCDR), представленную в настоящем документе, например по меньшей мере одну HCDR, раскрытую в таблице 4. В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему описанию включает две HCDR, представленные в настоящем документе, например по меньшей мере две HCDR, раскрытые в таблице 4. В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему описанию включает по меньшей мере три

HCDR, представленные в настоящем документе, например три HCDR, раскрытые в таблице 4. В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему описанию включает по меньшей мере одну CDR легкой цепи (LCDR), представленную в настоящем документе, например по меньшей мере одну LCDR, раскрытую в таблице 4. В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему описанию включает две LCDR, представленные в настоящем документе, например по меньшей мере две LCDR, раскрытые в таблице 4. В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему описанию включает по меньшей мере три LCDR, представленные в настоящем документе, например три LCDR, раскрытые в таблице 4.

**[0141]** В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему описанию включает по меньшей мере одну HCDR, представленную в настоящем документе, например по меньшей мере одну HCDR, раскрытую в таблице 4, и по меньшей мере одну LCDR, представленную в настоящем документе, например по меньшей мере одну LCDR, раскрытую в таблице 4. В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему описанию включает две HCDR, предложенные в настоящем документе, например по меньшей мере две HCDR, раскрытые в таблице 4, и две LCDR, представленные в настоящем документе, например по меньшей мере две LCDR, раскрытые в таблице 4. В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему описанию включает три HCDR, предложенные в настоящем документе, например по три HCDR, раскрытые в таблице 4, и три LCDR, представленные в настоящем документе, например три LCDR, раскрытые в таблице 4.

**[0142]** В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему описанию включает по меньшей мере одну каркасную область тяжелой цепи (FR тяжелой цепи) переменного домена тяжелой цепи, описанного в настоящем документе, например по меньшей мере одну FR тяжелой цепи переменного домена тяжелой цепи, раскрытого в одной из таблиц 4–8. В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему описанию включает две FR тяжелой цепи переменного домена тяжелой цепи, описанного в настоящем документе, например по меньшей мере две FR тяжелой цепи переменного домена тяжелой цепи, раскрытого в одной из таблиц 4–8. В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему описанию включает три FR тяжелой цепи переменного домена тяжелой цепи, описанного в настоящем документе, например три FR тяжелой цепи переменного домена тяжелой цепи, раскрытого в одной из таблиц 4–8.



цепи, описанного в настоящем документе, например полученные из той же таблицы из таблиц 4–8, что и FR тяжелой цепи. В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему изобретению включает три FR тяжелой цепи переменного домена тяжелой цепи, описанного в настоящем документе, например три FR тяжелой цепи переменного домена тяжелой цепи, раскрытого в любой из таблиц 4–8, и три FR легкой цепи переменного домена легкой цепи, описанного в настоящем документе, например три FR легкой цепи переменного домена легкой цепи, раскрытого в любой из таблиц 4–8. В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему изобретению включает три FR тяжелой цепи переменного домена тяжелой цепи, описанного в настоящем документе, например три FR легкой цепи переменного домена легкой цепи, раскрытого в любой из таблиц 4–8, и три FR легкой цепи, полученные из той же таблицы из таблиц 4–8, что и FR тяжелой цепи.

**[0145]** Иллюстративные последовательности антител, представленные в таблицах 4–8, подходят для использования в любом формате антител, включая, например, тетрамерное антитело, моноспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент или домен связывания. Переменные домены тяжелой цепи и переменные домены легкой цепи и их части, представленные в таблицах 4–8, могут содержаться в GPC3-связывающем домене.

**[0146]** В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему изобретению включает одну, две или три FR, которые вместе или каждая по отдельности имеют по меньшей мере 75% идентичности (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%, например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) с соответствующей (-ими) FR переменного домена тяжелой цепи переменного домена тяжелой цепи, описанного в любой из таблиц 4–8. В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему изобретению включает одну, две или три FR, которые вместе или каждая по отдельности имеют по меньшей мере 75% идентичности (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%) с соответствующей (-ими) FR переменного домена легкой цепи переменного домена легкой цепи, описанного в любой из таблиц 4–8.

**[0147]** В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему изобретению включает по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом тяжелой цепи, описанным в любой из таблиц 4–8 (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%



идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100% ). В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему изобретению включает два переменных домена тяжелой цепи, каждый из которых имеет по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом тяжелой цепи, описанным в таблицах 4–8 (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100% ), при этом переменные домены тяжелой цепи могут быть одинаковыми или разными.

**[0148]** В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему изобретению включает по меньшей мере один переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом легкой цепи, описанным в любой из таблиц 4–8 (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100% ). В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему изобретению включает два переменных домена легкой цепи, каждый из которых имеет по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом легкой цепи, описанным в любой из таблиц 4–8 (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100% ), при этом переменные домены легкой цепи могут быть одинаковыми или разными.

**[0149]** В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему изобретению включает по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом тяжелой цепи, описанным в любой из таблиц 4–8 (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100% ), и по меньшей мере один переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом легкой цепи, описанным в любой из таблиц 4–8 (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100% ). В определенных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему изобретению включает один переменный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом тяжелой цепи, описанным в любой из

таблиц 4–8 (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%), и один переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом легкой цепи, описанным в любой из таблиц 4–8 (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%), причем переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи обязательно получены из одной и той же таблицы из таблиц 4–8.

**[0150]** В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему изобретению включает два переменных домена тяжелой цепи, каждый из которых имеет по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом тяжелой цепи, описанным в таблицах 4–8 (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%), и два переменных домена легкой цепи, имеющие по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом легкой цепи, описанным в таблицах 4–8 (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%), причем в различных вариантах осуществления (i) каждый из переменных доменов тяжелой цепи может быть одинаковым или разным; (ii) каждый из переменных доменов легкой цепи может быть одинаковым или разным; (iii) по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи и по меньшей мере один переменный домен легкой цепи могут быть получены из одной и той же таблицы из таблиц 4–8; или (iv) два переменных домена тяжелой цепи и два переменных домена легкой цепи все получены из одной и той же таблицы из таблиц 4–8.

**[0151]** Каждая из таблиц 4–8 представляет последовательности переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи иллюстративного антитела, содержащие (i) переменный домен тяжелой цепи иллюстративного антитела; (ii) последовательность ДНК, кодирующую переменный домен тяжелой цепи; (iii) три CDR переменного домена тяжелой цепи переменного домена тяжелой цепи в соответствии с нумерацией IMGT, Kabat и Chothia; (iv) переменный домен легкой цепи иллюстративного антитела; (v) последовательность ДНК, кодирующую переменный домен легкой цепи; и (vi) три CDR переменного домена легкой цепи переменного домена легкой цепи в соответствии с нумерацией IMGT, Kabat и Chothia. Информация,

представленная в каждой таблице, содержит каркасные аминокислотные последовательности, а также нуклеотидные последовательности, кодирующие каждую аминокислотную последовательность CDR, и нуклеотидные последовательности, кодирующие соответствующую аминокислотную последовательность FR.

**[0152]** В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен может содержать переменный домен тяжелой цепи по настоящему описанию (например, имеющий по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом тяжелой цепи любого из таблиц 4–8, например по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%), и переменный домен легкой цепи по настоящему описанию (например, имеющий по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом легкой цепи, описанным в любой из таблиц 4–8, например, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%), и линкер (например, линкер в соответствии с SEQ ID NO: 59). В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен может содержать лидерную последовательность, переменный домен тяжелой цепи по настоящему описанию (например, имеющий по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом тяжелой цепи любого из таблиц 4–8, например по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%), и переменный домен легкой цепи по настоящему описанию (например, имеющий по меньшей мере 75% идентичности последовательности с переменным доменом легкой цепи, описанным в любой из таблиц 4–8, например, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%), и линкер. При наличии аминокислотной или нуклеотидной последовательности GPC3-связывающего домена, содержащего переменный домен тяжелой цепи по настоящему описанию и переменный домен легкой цепи по настоящему изобретению, линкер, соединяющий два переменных домена, будет очевиден из последовательности с учетом настоящего описания. При наличии аминокислотной или нуклеотидной последовательности GPC3-связывающего домена, содержащего переменный домен тяжелой цепи по настоящему описанию и переменный домен легкой цепи по настоящему описанию, лидерная последовательность будет очевидна с учетом настоящего описания. Во избежание сомнений, переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи по настоящему описанию могут присутствовать в любой ориентации, например в ориентации, в которой переменный домен тяжелой цепи представляет собой C-конец переменного домена легкой цепи или

в котором переменный домен тяжелой цепи представляет собой N-конец переменного домена легкой цепи. В различных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен может содержать линкер в соответствии с SEQ ID NO: 59.

**[0153]** В определенных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему описанию содержит GPC3-связывающий домен, который содержит переменный домен тяжелой цепи по настоящему описанию, переменный домен легкой цепи по настоящему описанию и линкер, имеющий по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 59 (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100% ). В определенных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему описанию содержит GPC3-связывающий домен, который содержит линкер в соответствии с SEQ ID NO: 59. В определенных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему описанию содержит GPC3-связывающий домен, который содержит переменный домен тяжелой цепи по настоящему описанию, переменный домен легкой цепи по настоящему описанию и лидерную последовательность, имеющую по меньшей мере 75% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 79 (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100% ). В определенных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему описанию содержит GPC3-связывающий домен, который содержит лидерную последовательность CSF2RA в соответствии с SEQ ID NO: 79 (MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP; SEQ ID NO: 79). В вариантах осуществления лидерная последовательность может быть закодирована последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 75% идентична ATGCTGTTATTAGTGACCTCTTTACTGCTGTGTGAGCTGCCCCACCCCGCTTTCCTCC TCATCCCG (SEQ ID NO: 82) (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100% ). В определенных вариантах осуществления GPC3-связывающий домен по настоящему описанию содержит GPC3-связывающий домен, который содержит переменный домен тяжелой цепи по настоящему описанию, переменный домен легкой цепи по настоящему описанию, линкер по настоящему описанию и лидерную последовательность по настоящему описанию.

[0154] Связывающий агент по настоящему описанию, который основан на примере антитела, предложенного в настоящем документе, таком как Ab1–5, может быть представлен в любом фрагменте или формате, содержащем переменный домен тяжелой цепи в соответствии с указанным примером антитела и переменный домен легкой цепи в соответствии с указанным примером антитела.

Таблица 4. Иллюстративные последовательности антител 1 (mAb1–1)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
3	Переменный домен тяжелой цепи	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTDYYIHWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGNTYYAQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNDYDAWFVYWGQGLVTVSS
4	VH (ДНК)	CAAGTCCAACCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCCGGAGCCAGCGTGAAAGTCTCATGTAACCAGCGGCTACACCTTACCGACTACTACATCCACTGGGTCCGACAA GCCCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATGGGCGAGATCTACCCCGGCTCCGGCAACACCTACTACGCCAGAAGTTCCAA GGTCGTGTGACCATGACAGCCGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCTCTCTGCGTTCTGAGGACACAGCCGTTTACTACTGCGCCAGAGGCAACGACTACGACGCT TGGTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAACATTAGTGACCGGTCTCTCC
5	CDRH1 IMGT (белок)	GYTFTDYY
6	CDRH1 по Kabat (белок)	DYYIH
7	CDRH1 по Chothia (белок)	GYTFTD
8	CDRH2 IMGT (белок)	IYPGSGNT

9	CDRH2 по Kabat (белок)	EIYPGSGNTYYAQKFQ
10	CDRH2 по Chothia (белок)	YPGSG
11	CDRH3 IMGT (белок)	ARGNDYDAWFVY
12	CDRH3 по Kabat (белок)	GNDYDAWFVY
13	CDRH3 по Chothia (белок)	GNDYDAWFVY
14	Вариабельный домен легкой цепи	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLNSGTRKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SVQAEDVAVYYCKQSYSLYTFGQGTKLEIK
15	VL (ДНК)	GACATCGTCATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCCGTGT CTTTAGGCGAAAGAGTGACCATGAACTGCAAGTCCAGCC AGTCTTTACTGAATTCGGCACTCGAAAAACTATTTAGC TTGGTACCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCT GATCTACTGGGCTAGCATTTCGAGAATCCGGCGTGCCCGA TCGCTTTAGCGGCAGCGGTAGCGGCACCGACTTTACTTTA ACCATCAGCAGCGTGCAAGCTGAGGACGTGGCTGTGTAC TATTGCAAGCAGTCCTACTCTTTATACACCTTCGGCCAAG GAACAAAGCTGGAGATCAAG
16	CDRL1 IMGT (белок)	QSLNSGTRKNY
17	CDRL1 по Kabat (белок)	KSSQSLNSGTRKNYLA
18	CDRL1 по Chothia (белок)	KSSQSLNSGTRKNYLA
19	CDRL2 IMGT (белок)	WAS

20	CDRL2 по Kabat (белок)	WASIRES
21	CDRL2 по Chothia (белок)	WASIRES
22	CDRL3 IMGT (белок)	KQSYSLYT
23	CDRL3 по Kabat (белок)	KQSYSLYT
24	CDRL3 по Chothia (белок)	KQSYSLYT
25	ScFv	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFDYYIHWVRQA  PGQGLEWMGEIYPGSGNTYYAQKFQGRVTMTADTSTSTAY  MELSSLRSEDVAVYYCARGNDYDAWFVYWGQGLVTVSS  GSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNC  KSSQSLLSGTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGV  PDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYSLYTFGQ  GTKLEIK</p>
26	ScFv	<p>CAAGTCCAACCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAGGTCAAGAAG  CCCGGAGCCAGCGTGAAAGTCTCATGTAAAACCAGCGGC  TACACCTTACCGACTACTACATCCACTGGGTCCGACAA  GCCCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATGGGCGAGATCTAC  CCCGGCTCCGGCAACACCTACTACGCCAGAAGTTCCAA  GGTCGTGTGACCATGACAGCCGACACCAGCACCTCCACC  GCCTACATGGAAGTGTCTCTCTGCGTTCTGAGGACACA  GCCGTTTACTACTGCGCCAGAGGCAACGACTACGACGCT  TGGTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAACATTAGTGACCGTG  TCCTCCGGATCCACATCCGGCAGCGGAAAGCCCGGTAGC  GGCGAGGGCAGCACCAAAGGAGACATCGTCATGACCCA  GAGCCCCGATTCTTTAGCCGTGTCTTTAGGCGAAAGAGT  GACCATGAACTGCAAGTCCAGCCAGTCTTTACTGAATTC  CGGCACTCGAAAAAACTATTTAGCTTGGTACCAGCAGAA  ACCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCTAG  CATTCGAGAATCCGGCGTGCCCGATCGCTTTAGCGGCAG</p>

		CGGTAGCGGCACCGACTTTACTTTAACCATCAGCAGCGT GCAAGCTGAGGACGTGGCTGTGTACTATTGCAAGCAGTC CTACTCTTTATACACCTTCGGCCAAGGAACAAAGCTGGA GATCAAG
--	--	--

Таблица 5. Иллюстративные последовательности антител 2 (mAb1–2)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
27	Вариабельный домен тяжелой цепи	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYIHWVRQ APGQGLEWMGEIYPGSGNTYYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARGNDYDAWFVYWQGTLVTVS S
28	VH (ДНК)	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAAAA GCCC GGCGCCAGCGTGAAAGTCTCATGCAAGGCCAGCGG CTATACCTTCACCGACTACTACATCCACTGGGTCCGACAA GCTCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATGGGCGAGATCTAC CCCGGCAGCGGCAACACCTACTACGCCCAGAAGTTCCAA GGACGTGTGACCATGACTCGTGACACCTCCACCTCCACC GTGTATATGGAGCTGAGCTCTTTAAGGTCCGAGGATACC GCTGTGTACTACTGCGCCAGAGGAAACGACTACGACGCT TGGTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAACATTAGTGACCGTC AGCTCC
29	Вариабельный домен легкой цепи	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGTRKNYLAW YQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCKQSYSLYTFGQGTKLEIK
30	VL (ДНК)	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCTGTGT CTTTAGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGTCCTCCC AGAGCTTATTAATAGCGGCACTCGAAAAAACTATTTAG CTTGGTACCAACAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGC TCATCTACTGGGCTTCCATCAGAGAGAGCGGCGTGCCCG ATAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTCACTT TAACCATCTCCTCTTTACAAGCTGAGGACGTGGCCGTGTA TTACTGCAAGCAGTCCTACTCTTTATACACCTTCGGCCAA GGAACAAAGCTGGAGATCAAA
31	ScFv	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYIHWVRQ APGQGLEWMGEIYPGSGNTYYAQKFQGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARGNDYDAWFVYWQGTLVTVS SGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQSLNSGTRKNYLAWYQKPGQPPKLLIYWASIRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYSLYTFGQ GTKLEIK
32	ScFv	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAAAA GCCC GGCGCCAGCGTGAAAGTCTCATGCAAGGCCAGCGG CTATACCTTCACCGACTACTACATCCACTGGGTCCGACAA



		GCTCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATGGGCGAGATCTAC CCCAGCAGCGGCAACACCTACTACGCCAGAAAGTTCCAA GGACGTGTGACCATGACTCGTGACACCTCCACCTCCACC GTGTATATGGAGCTGAGCTCTTTAAGGTCCGAGGATAACC GCTGTGTACTACTGCGCCAGAGGAAACGACTACGACGCT TGGTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAACATTAGTGACCGTC AGCTCCGGCTCCACAAGCGGATCCGGCAAACCCGGTAGC GGCGAAGGCAGCACCAAGGGCGACATCGTGATGACCCA GAGCCCCGATTCTTTAGCTGTGTCTTTAGGCGAGAGAGC CACCATCAACTGCAAGTCCTCCCAGAGCTTATTAATAG CGGCACTCGAAAAAACTATTTAGCTTGGTACCAACAGAA GCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTCATCTACTGGGCTTCC ATCAGAGAGAGCGGCGTGCCCGATAGATTCAGCGGCAGC GGCTCCGGCACAGACTTCACTTTAACCATCTCCTCTTTAC AAGCTGAGGACGTGGCCGTGTATTACTGCAAGCAGTCCT ACTCTTTATACACCTTCGGCCAAGGAACAAAGCTGGAGA TCAA
--	--	--

Таблица 6. Иллюстративные последовательности антител 3 (mAb1–3)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
33	Вариабельный домен тяжелой цепи	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFDYYIHWVRQA PGQGLEWMGEIYPGSGNTYYAQKFQGRVTMTADTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARGNDYDAWFVYWGQGLVTVSS
34	VH (ДНК)	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAAAA GCCCGGCGCCAGCGTGAAAGTCTCATGCAAGACCTCCGG CTACACCTTACCGACTACTACATCCACTGGGTCCGACA AGCTCCCGGCCAAGGTCTGGAGTGGATGGGCGAGATCTA CCCCGGCTCCGGCAACACCTATTACGCCAGAAAGTTCCA AGGACGTGTGACCATGACAGCCGACACCTCCACCAGCAC CGCCTACATGGAAGTGTGAGCAGCTTACGTAGCGAGGACAC CGCTGTGTACTACTGCGCTCGTGGCAACGACTACGACGC TTGGTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAAGTCTGGTGACCGT GTCCTCC
35	Вариабельный домен легкой цепи	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGTRKKNYLAW YQQKPGQPPLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCKQSYSLYTFGQGTKLEIK
36	VL (ДНК)	GACATCGTGATGACCCAGTCCCCCGATTCTTTAGCCGTCA GCCTTGGAGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCC AGAGCTTATTAACCTCCGGCACTCGAAAAAACTACCTCG CTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGTCAGCCCCCTAAGCTGC TGATCTACTGGGCCAGCATTCGTGAGAGCGGAGTGCCCG ACAGATTTAGCGGCTCCGGCAGCGGCACCGATTCTCACTT TAACCATCAGCTCTTTACAAGCTGAGGATGTGGCCGTGT ATTACTGCAAGCAGTCTACTCTTTATACACCTTCGGCCA AGGAACAAAGCTGGAGATTAAG

37	ScFv	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFDYYIHWVRQA PGQGLEWMGEIYPGSGNTYYAQKFQGRVTMTADTSTSTAY MELSSLRSEDVAVYYCARGNDYDAWFVYWGQGLVTVSS GSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK SSQSLLNSGTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYSLYTFGQG TKLEIK
38	ScFv	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGCCGCGAAGTGAAAAA GCCC GGCGCCAGCGTGAAAGTCTCATGCAAGACCTCCGG CTACACCTTCACCGACTACTACATCCACTGGGTCCGACA AGCTCCCGGCCAAGGTCTGGAGTGGATGGGCGAGATCTA CCCCGGCTCCGGCAACACCTATTACGCCCAGAAGTTCCA AGGACGTGTGACCATGACAGCCGACACCTCCACCAGCAC CGCCTACATGGAAGTGTGAGCAGCTTACGTAGCGAGGACAC CGCTGTGTACTACTGCGCTCGTGGCAACGACTACGACGC TTGGTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAACTCTGGTGACCGT GTCCTCCGGAAGCACCTCCGGAAGCGGCAAGCCCGGTAG CGGCGAAGGATCCACCAAGGGCGACATCGTGATGACCCA GTCCCCGATTCTTTAGCCGTCAGCCTTGAGAGAGAGC CACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCTTATTAAGTC CGGCACTCGAAAAACTACCTCGCTTGGTACCAGCAGAA GCCC GGTCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAG CATTCGTGAGAGCGGAGTGCCCGACAGATTTAGCGGCTC CGGCAAGCGGACCGATTTCACTTTAACCATCAGCTCTTTA CAAGCTGAGGATGTGGCCGTGTATTACTGCAAGCAGTCC TACTCTTTATACACCTTCGGCCAAGGAACAAAGCTGGAG ATTAAG

Таблица 7. Иллюстративные последовательности антител 4 (mAb1–4)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
39	Вариабельный домен тяжелой цепи	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFDYYIHWVRQA PGQGLEWIGEIYPGSGNTYYAQKFQGRATLTADTSTSTAYM EFSSLRSEDVAVYYCARGNDYDAWFVYWGQGLVTVSS
40	VH (ДНК)	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGCCGCTGAGGTGAAGAA GCCC GGTCCTCCGTGAAGGTGTCTTGTAAGACCAGCGG CTACACCTTCACCGACTACTACATCCACTGGGTCCGACA AGCTCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATTGGGCGAGATCTA TCCC GGCAAGCACCTACTACGCCCAGAAGTTCCA AGGACGTGCCACTTTAACCGCTGACACCAGCACCAGCAC CGCCTACATGGAGTTCTCCTCTTTAAGGAGCGAGGACAC CGCCGTGTATTACTGCGCTCGTGGCAACGACTATGACGC TTGGTTCGTGTACTGGGGTCAAGGAACATTAGTGACAGT GAGCAGC

41	Вариабельный домен легкой цепи	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGTRKKNYLAWYQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFLTISSLQAEDVAVYYCKQSYSLYTFGQGTKLEIK
42	VL (ДНК)	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCTGTGAGCCTTGGAGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCTCCAGTCTTTACTGAACAGCGGCACTCGAAAAAACTATTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCCTCCATTCGTGAAAGCGGCGTGCCC GATAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGAACCGACTTTACTTTAACCATCTCCTCTTTACAAGCTGAGGACGTGGCTGTGTACTACTGCAAGCAGAGCTACTCTTTATACACCTTCGGCCAAGGAACAAAGCTGGAAATCAAG
43	ScFv	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFDYYIHWVRQAPGQGLEWIGEIYPGSGNTYYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMEFSSLRSEDVAVYYCARGNDYDAWFVYWGQGLVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGTRKKNYLAWYQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFLTISSLQAEDVAVYYCKQSYSLYTFGQGTKLEIK
44	ScFv	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCTGAGGTGAAGAA GCCCGGTGCCTCCGTGAAGGTGTCTTGTAAGACCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACTACATCCACTGGGTCCGACA AGCTCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATTGGCGAGATCTATCCCAGCAGCGGCAACACCTACTACGCCCAGAAGTTCCA AGGACGTGCCACTTTAACCGCTGACACCAGCACCAGCACCGCCTACATGGAGTTCTCCTCTTTAAGGAGCGAGGACAC CGCCGTGTATTACTGCGCTCGTGGCAACGACTATGACGCTTGGTTCGTGTACTGGGGTCAAGGAACATTAGTGACAGT GAGCAGCGGATCCACCAGCGGATCCGGCAAGCCCGGTA GCGGAGAAGGCAGCACCAGGGCGACATCGTGATGACC CAGAGCCCCGATTCTTTAGCTGTGAGCCTTGAGAGAGAGG GCCACCATCAACTGCAAGTCCTCCAGTCTTTACTGAACA GCGGCACTCGAAAAAACTATTTAGCTTGGTACCAGCAGA AACCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCCT CCATTCGTGAAAGCGGCGTGCCCGATAGATTCAGCGGCA GCGGCTCCGGAACCGACTTTACTTTAACCATCTCCTCTTT ACAAGCTGAGGACGTGGCTGTGTACTACTGCAAGCAGAG CTACTCTTTATACACCTTCGGCCAAGGAACAAAGCTGGA AATCAAG

Таблица 8. Иллюстративные последовательности антител 5 (mAb1–5)

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
------------	----------	--------------------

45	Вариабельный домен тяжелой цепи	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFDYYIHWVRQA PGQGLEWIGEIYPGSGNTYYAQKFQGRATLTADTSTSTAYM EFSSLRSEDVAVYYCARGNDYDAWFVYWGQGLVTVSS
46	VH (ДНК)	CAAGTTCAGCTGGTCCAGAGCGGCGCTGAAGTGAAGAAG CCCGGCGCTAGCGTCAAAGTCTCATGCAAAACCTCCGGC TACACCTTTACCGACTACTACATCCACTGGGTCCGACAA GCTCCCGGTCAAGGTCTGGAGTGGATCGGCGAGATCTAC CCCGGCAGCGGCAACACCTACTACGCCAGAAAGTTCCAA GGACGTGCCACTTTAACCGCTGACACCAGCACCTCCACC GCCTACATGGAGTTCAGCTCTTTAAGGTCCGAGGACACC GCCGTGTAATACTGCGCTCGTGGCAACGATTACGACGCT TGGTTCGTGTACTGGGGACAAGGAACATTAGTGACCGTG TCCAGC
47	Вариабельный домен легкой цепи	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLLSNGTRKKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SVQAEDVAVYYCKQSYSLYTFGQGTKLEIK
48	VL (ДНК)	GATATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCCGTGT CTTTAGGAGAGAGAGTGAACACTGCAAGAGCAGCC AGTCTTTACTGAACAGCGGCACCAGAAAGAACTATTTAG CTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCAAGCTGC TGATCTACTGGGCCAGCATTCTGTGAGAGCGGAGTGCCCG ACAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTTACTT TAACCATCAGCAGCGTGCAAGCTGAGGATGTGGCCGTGT ATTACTGCAAGCAGTCCTACTCTTTATACACCTTTGGCCA AGGAACAAAGCTGGAGATCAAA
49	ScFv	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFDYYIHWVRQA PGQGLEWIGEIYPGSGNTYYAQKFQGRATLTADTSTSTAYM EFSSLRSEDVAVYYCARGNDYDAWFVYWGQGLVTVSSGS TSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCSS QSLLSNGTRKKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SVQAEDVAVYYCKQSYSLYTFGQGT KLEIK
50	ScFv	CAAGTTCAGCTGGTCCAGAGCGGCGCTGAAGTGAAGAAG CCCGGCGCTAGCGTCAAAGTCTCATGCAAAACCTCCGGC TACACCTTTACCGACTACTACATCCACTGGGTCCGACAA GCTCCCGGTCAAGGTCTGGAGTGGATCGGCGAGATCTAC CCCGGCAGCGGCAACACCTACTACGCCAGAAAGTTCCAA GGACGTGCCACTTTAACCGCTGACACCAGCACCTCCACC GCCTACATGGAGTTCAGCTCTTTAAGGTCCGAGGACACC GCCGTGTAATACTGCGCTCGTGGCAACGATTACGACGCT TGGTTCGTGTACTGGGGACAAGGAACATTAGTGACCGTG TCCAGCGGCAGCACAAGCGGAAGCGGCAAGCCCGGTAG CGGCGAGGGAAGCACCAAGGGCGATATCGTGATGACCC AGAGCCCCGATTCTTTAGCCGTGTCTTTAGGAGAGAGAG TGACCATGAACTGCAAGAGCAGCCAGTCTTTACTGAACA GCGGCACCAGAAAGAACTATTTAGCTTGGTACCAGCAGA AGCCCGGCCAGCCTCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCA GCATTCGTGAGAGCGGAGTGCCCGACAGATTCAGCGGCA

		GCGGCTCCGGCACCGACTTTACTTTAACCATCAGCAGCG TGCAAGCTGAGGATGTGGCCGTGTATTACTGCAAGCAGT CCTACTCTTTATACACCTTTGGCCAAGGAACAAAGCTGG AGATCAAA
--	--	---

**[0155]** Химерные антигенные рецепторы (CAR) представляют собой сконструированные рецепторы, которые могут направлять или перенаправлять Т-клетки или НК-клетки (например, Т или НК-клетки пациента или донора) для нацеливания на выбранный антиген. CAR может быть сконструирован таким образом, чтобы распознавать антиген и, связавшись с ним, активировать иммунную клетку для атаки и уничтожения клетки, несущей этот антиген. Когда эти антигены существуют на опухолевых клетках, иммунная клетка, экспрессирующая CAR, может нацеливаться и уничтожать опухолевую клетку. CAR обычно содержат внеклеточный связывающий домен, который опосредует связывание антигена (например, GPC3-связывающий домен), трансмембранный домен, который охватывает или подразумевается, что охватывает клеточную мембрану, когда CAR присутствует на поверхности клетки или клеточной мембране, и внутриклеточный (или цитоплазматический) сигнальный домен.

**[0156]** Согласно по меньшей мере одной точке зрения, не имеющей ограничительного характера, существует по меньшей мере три «поколения» композиций CAR. В CAR первого поколения связывающий домен (например, варибельный одноцепочечный фрагмент, связывающий домен) связан или соединен с сигнальным доменом (например, CD3 $\zeta$ ) через трансмембранный домен, дополнительно включающий шарнирный домен и один или несколько спейсеров. Во втором поколении CAR вместе с сигнальным доменом (например, CD3 $\zeta$ ) вводится костимуляторный домен (CM1, такой как CD28, 4-1BB или OX-40). В третьем поколении CAR в состав входит второй костимуляторный домен (CM2).

**[0157]** TCR представляют собой гетеродимеры, состоящие из  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи. Сигнализация TCR требует привлечения сигнальных белков, которые формируют иммунный синапс. Кроме того, локализация TCR на плазматической мембране зависит от комплекса CD3, который экспрессируется в Т-клетках. Могут быть созданы сконструированные одноцепочечные TCR, например, с использованием трансмембранного и сигнального доменов конструкторов CAR, для которых известны способы и конструкторы (например, молекулы sTCR и TCR-CAR, например, слияние цепи TCR $\beta$  с сигнальными модулями CD28 TM и CD28 и CD3 $\zeta$ ).

**[0158]** Система связывания GPC3 по настоящему изобретению может содержать один или более антигенсвязывающих доменов, которые связывают GPC3. В некоторых вариантах

осуществления антигенсвязывающая система дополнительно содержит костимулирующий домен, и/или внеклеточный домен (например, «шарнирную» или «спейсерную область»), и/или трансмембранный домен, и/или внутриклеточный (сигнальный) домен, и/или домен активации CD3-дзета или Cd3-эпсилон. В некоторых вариантах осуществления система связывания GPC3 по настоящему описанию содержит по меньшей мере связывающий домен, который связывает человеческий GPC3, костимулирующий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен и домен активации CD3-дзета или CD3-эпсилон.

**[0159]** В некоторых вариантах осуществления GPC3-связывающий CAR по настоящему описанию может содержать антигенсвязывающую систему, которая содержит один или более или все из лидерного пептида (P), связывания GPC3 (B), внеклеточного домена (E) белка, трансмембранного домена (T), костимулирующего домена (C), второго костимулирующего домена (C') и домена активации (A). В некоторых случаях GPC3-связывающий CAR, сконфигурирован следующим образом: В Е Т А. В некоторых случаях GPC3-связывающий CAR сконфигурирован следующим образом: Р В Е Т А. В некоторых случаях GPC3-связывающий CAR сконфигурирован следующим образом: В Е Т С А. В некоторых случаях GPC3-связывающий CAR сконфигурирован следующим образом: Р В Е Т С А. В некоторых случаях GPC3-связывающий CAR сконфигурирован следующим образом: В Е Т С С' А. В некоторых случаях GPC3-связывающий CAR сконфигурирован следующим образом: Р В Е Т С С' А. В некоторых вариантах осуществления GPC3-связывающий CAR содержит VH и VL, необязательно при этом CAR сконфигурирован следующим образом: P-VH-VL-E-T-C-A или P-VL-VH-E-T-C-A. В некоторых вариантах осуществления VH и VL соединены линкером (L), необязательно при этом CAR сконфигурирован следующим образом от N-конца к C-концу: P-VH-L-VL-E-T-C-A или P-VH-L-VL-E-T-C-A.

**[0160]** Один или более антигенсвязывающих доменов определяют мишень(-и) системы связывания антигена. Связывающий домен системы связывания антигена может содержать любой связывающий GPC3 домен, например антитело по настоящему описанию, например связывающий домен по настоящему описанию. Связывающий домен используют в химерных антигенных рецепторах по меньшей мере частично, поскольку они могут быть сконструированы как часть одной цепи вместе с другими компонентами CAR. См., например, патенты США №7,741,465 и 6,319,494, а также Eshhar et al., *Cancer Immunol Immunotherapy* (1997) 45: 131-136, Krause et al., *J. Exp. Med.*, Volume 188, No. 4, 1998 (619-626); Finney et al., *Journal of Immunology*, 1998, 161: 2791-2797, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в отношении связывающих

доменов в CAR. Связывающий домен или scFv представляет собой одноцепочечный антигенсвязывающий фрагмент, содержащий переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, причем переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи связаны друг с другом. См., например, патенты США №7,741,465 и 6,319,494, а также Eshhar et al., *Cancer Immunol Immunotherapy* (1997) 45: 131–136, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки в отношении связывающих доменов. При получении из исходного антитела связывающий домен может сохранять некоторые, все или по существу сохранять связывание родительского антитела с целевым антигеном. В некоторых вариантах осуществления CAR, рассматриваемый в настоящем документе, содержит антигенспецифический связывающий домен, который может представлять собой scFv (мышинный, человеческий или гуманизированный scFv), который связывает антиген, экспрессируемый на раковой клетке. В определенном варианте осуществления scFv связывается с GPC3.

**[0161]** В определенных вариантах осуществления CAR, рассматриваемые в настоящем документе, могут содержать линкерные остатки между различными доменами, например, между доменами VH и VL, добавленными для соответствующего конформационного образования молекулы. CAR, рассматриваемые в настоящем документе, могут содержать один, два, три, четыре или пять или более линкеров. В некоторых вариантах осуществления длина линкера составляет от около 1 до около 25 аминокислот, от около 5 до около 20 аминокислот или от около 10 до около 20 аминокислот или любую промежуточную длину аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 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 или более аминокислот.

**[0162]** Иллюстративные примеры линкеров включают глициновые полимеры (G)<sub>n</sub>; глицин-сериновые полимеры (G<sub>1-5</sub>S<sub>1-5</sub>)<sub>n</sub>, где n представляет собой целое число по меньшей мере один, два, три, четыре или пять; глицин-аланиновые полимеры; аланин-сериновые полимеры; и другие гибкие линкеры, известные в данной области. Глициновые и глицин-сериновые полимеры относительно неструктурированы и, следовательно, могут служить нейтральным звеном между доменами слитых белков, такими как CAR, описанные в настоящем документе. Глицин имеет больший доступ к пространству phi-psi, чем даже аланин, и гораздо менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173–142 (1992)). Другие линкеры, рассматриваемые в настоящем документе, включают линкеры Уитлоу (см. Whitlow, *Protein Eng.* 6(8): 989–95 (1993)). Специалисту в данной области техники будет понятно, что конструкция CAR в некоторых вариантах осуществления может включать линкеры,

которые полностью или частично являются гибкими, например, линкер может включать гибкий линкер, а также одну или несколько частей, придающих менее гибкую структуру, чтобы обеспечить желаемую структуру CAR. В одном варианте осуществления любая из конструкций, описанных в настоящем документе, может содержать линкер «GS». В другом варианте осуществления любые из описанных в настоящем документе конструкций содержат линкер «GSG». В примере глицин-сериновый линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности GS (SEQ ID NO: 51), которая может быть кодирована последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с GGATCC (SEQ ID NO: 52) или GGGTCC (SEQ ID NO: 53). В примере глицин-сериновый линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности GSG (SEQ ID NO: 54), которая может быть кодирована последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с GGCTCTGGA (SEQ ID NO: 55) или ggggcc (SEQ ID NO: 56). В примере глицин-сериновый линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности GGGSGGGS (SEQ ID NO: 56), которая может быть кодирована последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с GGCGGTGGAAGCGGAGGAGGTTCC (SEQ ID NO: 58). В другом варианте осуществления CAR, описанные в настоящем документе, содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 59 (GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 59). В одном варианте осуществления линкер кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с GGATCCACATCCGGCAGCGGAAAGCCCGGTAGCGGCGAGGGCAGCACCAAGGA (SEQ ID NO: 60), GGCTCCACAAGCGGATCCGGCAAACCCGGTAGCGGCGAAGGCAGCACCAAGGGC (SEQ ID NO: 61) или GGAAGCACCTCCGGAAGCGGCAAGCCCGGTAGCGGCGAAGGATCCACCAAGGGC (SEQ ID NO: 62) GGATCCACCAGCGGATCCGGCAAGCCCGGTAGCGGAGAAGGCAGCACCAAGGGC (SEQ ID NO: 63) GGCAGCACAAGCGGAAAGCGGCAAGCCCGGTAGCGGCGAGGGAAGCACCAAGGGC (SEQ ID NO: 64).



**[0163]** В вариантах осуществления CAR содержит scFv, который дополнительно содержит последовательность связывания переменных областей. «Последовательность связывания переменных областей» представляет собой аминокислотную последовательность, которая соединяет переменную область тяжелой цепи с переменной областью легкой цепи и обеспечивает спейсерную функцию, совместимую с взаимодействием двух субсвязывающих доменов, так что полученный полипептид сохраняет специфическую аффинность связывания с той же молекулой-мишенью, что и антитело, которое содержит одинаковые переменные области легкой и тяжелой цепи. В одном варианте осуществления последовательность связывания переменных областей имеет длину 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 или более аминокислот.

**[0164]** В вариантах осуществления за связывающим доменом CAR может следовать один или более «спейсерных доменов», которые обозначают область, отодвигающую антигенсвязывающий домен от поверхности эффекторной клетки, чтобы обеспечить надлежащий контакт между клеткой и клеткой, связывание антигена и активацию (Patel *et al.*, *Gene Therapy*, 1999; 6: 412–419). Спейсерный домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. В определенных вариантах осуществления спейсерный домен представляет собой часть иммуноглобулина, включая, без ограничений, одну или более константных областей тяжелой цепи, например CH2 и CH3. Спейсерный домен может включать аминокислотную последовательность шарнирной области иммуноглобулина природного происхождения или измененной шарнирной области иммуноглобулина.

**[0165]** За связывающим доменом CAR может, как правило, следовать один или более «шарнирных доменов», которые играют роль в позиционировании антигенсвязывающего домена в стороне от поверхности эффекторной клетки, чтобы обеспечить надлежащий контакт между клеткой и клеткой, связывание антигена и активацию. CAR обычно содержит один или более шарнирных доменов между связывающим доменом и трансмембранным доменом. Шарнирный домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. Шарнирный домен может включать аминокислотную последовательность шарнирной области иммуноглобулина природного происхождения или измененной шарнирной области иммуноглобулина.

**[0166]** В некоторых вариантах осуществления система связывания антигена по настоящему описанию может содержать шарнир, который представляет собой, получен из или происходит из (например, содержит весь или фрагмент) иммуноглобулиноподобного

шарнирного домена. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен получен из или происходит из иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен выбран из шарнира IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE или IgM или его фрагмента. Шарнир может быть получен из природного источника или синтезированного источника. Шарнирные домены, пригодные для использования в CAR, описанных в настоящем документе, включают шарнирную область, полученную из внеклеточных областей мембранных белков типа 1, таких как CD8 $\alpha$ , CD4, CD28 и CD7, которые могут представлять собой шарнирные области дикого типа из этих молекул или могут быть изменены, например усеченный шарнирный домен CD28. Шарнир может быть получен из природного источника или синтезированного источника. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая система по настоящему описанию может содержать шарнир, который представляет собой, получен из или происходит из (например, содержит все фрагменты) CD2, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD4, CD7, CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$ , CD11a (ITGAL), CD11b (ITGAM), CD11c (ITGAX), CD11d (ITGAD), CD18 (ITGB2), CD19 (B4), CD27 (TNFRSF7), CD28, CD28T, CD29 (ITGB1), CD30 (TNFRSF8), CD40 (TNFRSF5), CD48 (SLAMF2), CD49a (ITGA1), CD49d (ITGA4), CD49f (ITGA6), CD66a (CEACAM1), CD66b (CEACAM8), CD66c (CEACAM6), CD66d (CEACAM3), CD66e (CEACAM5), CD69 (CLEC2), CD79A (альфа-цепь, ассоциированная с В-клеточным антигенным рецептором), CD79B (бета-цепь, ассоциированная с В-клеточным антигенным рецепторным комплексом), CD84 (SLAMF5), CD96 (тактильные), CD100 (SEMA4D), CD103 (ITGAE), CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD150 (SLAMF1), CD158A (KIR2DL1), CD158B1 (KIR2DL2), CD158B2 (KIR2DL3), CD158C (KIR3DP1), CD158D (KIRDL4), CD158F1 (KIR2DL5A), CD158F2 (KIR2DL5B), CD158K (KIR3DL2), CD160 (BY55), CD162 (SELPLG), CD226 (DNAM1), CD229 (SLAMF3), CD244 (SLAMF4), CD247 (CD3-дзета), CD258 (LIGHT), CD268 (BAFFR), CD270 (TNFSF14), CD272 (BTLA), CD276 (B7-H3), CD279 (PD-1), CD314 (NKG2D), CD319 (SLAMF7), CD335 (NK-p46), CD336 (NK-p44), CD337 (NK-p30), CD352 (SLAMF6), CD353 (SLAMF8), CD355 (CRTAM), CD357 (TNFRSF18), костимулятора индуцибельных Т-клеток (ICOS), LFA-1 (CD11a/CD18), NKG2C, DAP-10, ICAM-1, NKp80 (KLRF1), IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, LFA1-1, SLAMF9, LAT, GADS (GrpL), SLP-76 (LCP2), PAG1/CBP, лиганда CD83, гамма-рецептора Fc, молекулы МНС класса 1, молекулы МНС класса 2, белка рецептора TNF, белка иммуноглобулина, рецептора цитокинов, интегрина, рецепторов, активирующих Nk-клетки или рецептора Toll-лиганда или который представляет собой их фрагмент или комбинацию.

**[0167]** В вариантах осуществления шарнирный домен содержит шарнирную область CD8 $\alpha$ . В вариантах осуществления CAR, описанные в настоящем документе, содержат шарнирный домен из Cd8 $\alpha$ , имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 65 (TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 65)). В вариантах осуществления шарнирный домен из CD8 $\alpha$  кодируется нуклеиновой кислотой, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность, в соответствии с: ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAACC CCTGTCCCTGCGCCCCGAGGCGTGCCGGCCAGCGGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGA GGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT (SEQ ID NO: 66).

**[0168]** В вариантах осуществления шарнирный домен содержит усеченную шарнирную область CD28 (CD28T), такую как описанная в международной заявке на патент №: PCT/US2017/025351, поданной 31 марта 2017 г., которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки. В вариантах осуществления CAR, описанные в настоящем документе, содержат шарнирный домен CD28T, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 67 (LDNEKSNGTPIHVKGKHLCPSPFPGPSKP (SEQ ID NO: 67)). В вариантах осуществления шарнирный домен CD28T кодируется нуклеиновой кислотой, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с CTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACSTTTG TCCAAGTCCCSTATTTCCCGGACSTTCTAAGCCC (SEQ ID NO: 68).

**[0169]** Полинуклеотидные и полипептидные последовательности этих шарнирных доменов известны. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий шарнирный домен, содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере

мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или по меньшей мере около 100% (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) идентична известной нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность шарнирного домена, содержит полипептидную последовательность, которая по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или по меньшей мере около 100% (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) идентична известной полипептидной последовательности.

**[0170]** В целом «трансмембранный домен» (например, антигенсвязывающая система) относится к домену, имеющему свойство присутствия в мембране, когда он присутствует в молекуле на поверхности клетки или клеточной мембраны (например, охватывая часть или всю клеточную мембрану). Костимуляторный домен для антигенсвязывающей системы по настоящему изобретению может дополнительно содержать трансмембранный домен и/или внутриклеточный сигнальный домен. Не требуется, чтобы каждая аминокислота в трансмембранном домене присутствовала в мембране. Например, в некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен характеризуется тем, что обозначенный участок или часть белка по существу расположены в мембране. Аминокислотные или нуклеиновые последовательности могут быть проанализированы с использованием множества алгоритмов для прогнозирования подклеточной локализации белка (например, трансмембранной локализации). Программы psort (PSORT.org) и prosite (prosite.expasy.org) являются примерами таких программ.

**[0171]** Тип трансмембранного домена, содержащегося в системе связывания антигенов, описанной в настоящем документе, не ограничивается каким-либо одним типом. В некоторых вариантах осуществления выбран трансмембранный домен, который естественным образом связан со связывающим доменом и/или внутриклеточным доменом. В некоторых случаях трансмембранный домен содержит модификацию одной или более аминокислот (например, делецию, вставку и/или замену), например, во избежание связывания таких доменов с трансмембранным доменом тех же или разных поверхностных мембранных белков для сведения к минимуму взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса.

**[0172]** Трансмембранный домен может быть получен из природного или синтезированного источника. Если источник является природным, домен может быть получен из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Примеры трансмембранных доменов могут быть получены из (например, могут содержать по меньшей мере трансмембранный домен) альфа, бета или дзета цепи Т-клеточного рецептора, 2B4, CD28, CD3 эpsilon, CD3 дельта, CD3 гамма, CD45, CD4, CD5, CD7, CD8, CD8 альфа, CD8 бета, CD9, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD16, CD22, CD27, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, TNFSFR25, CD154, 4-1BB/CD137, рецепторов, активирующих NK-клетки, белка иммуноглобулина, B7-H3, BAFFR, BLAME (SLAMF8), BTLA, CD100 (SEMA4D), CD103, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD19a, CD2, CD247, CD276 (B7-H3), CD29, CD30, CD40, CD49a, CD49D, CD49f, CD69, CD84, CD96 (Tactile), CDS, CEACAM1, CRT AM, цитокинового рецептора, DAP-10, DAP-12, DNAM1 (CD226), Fc гамма рецептора, GADS, GITR, HVEM (LIGHTR), IA4, ICAM-1, ICAM-1, Ig альфа (CD79a), IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, индуцибельного Т-клеточного костимулятора (ICOS), интегринов, ITGA4, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB2, ITGB7, ITGB1, KIRDS2, LAT, LFA-1, LFA-1, лиганда, связывающегося с CD83, LIGHT, LIGHT, LTBR, Ly9 (CD229), лимфоцитарного функционально-ассоциированного антигена-1 (LFA-1; CD1-1a/CD18), молекулы МНС класса 1, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), OX-40, PAG/Cbp, белка 1 запрограммированной смерти клетки (PD-1), PSGL1, SELPLG (CD162), сигнальной лимфоцит-активирующей молекулы (белки SLAM), SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3), SLAMF4 (CD244; 2B4), SLAMF6 (NTB-A; Ly108), SLAMF7, SLP-76, белка рецептора TNF, TNFR2, TNFSF14, рецептора лиганда Toll, TRANCE/RANKL, VLA1 или VLA-6 или их фрагментов, усечения или комбинации. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может быть синтетическим (и может, например, содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин). В некоторых вариантах осуществления триплет фенилаланина, триптофана и валина содержится в каждом конце синтетического трансмембранного домена. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен непосредственно связан или соединен с цитоплазматическим доменом. В некоторых вариантах осуществления короткий олиго- или полипептидный линкер (например, от 2 до 10 аминокислот в длину) может образовывать связь между трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой дублет глицина-серина.

**[0173]** В вариантах осуществления CAR, описанные в настоящем документе, содержат ТМ домен из Cd8a, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей

мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 69 (YIWAAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO: 69)). В вариантах осуществления ТМ домен из CD8α кодируется нуклеиновой кислотой, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTT  
ATCACCCCTTTAATGTC (SEQ ID NO: 70).

**[0174]** В вариантах осуществления CAR, описанные в настоящем документе, содержат ТМ домен из CD28, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 71 (FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 71)). В вариантах осуществления ТМ домен из CD28 кодируется нуклеиновой кислотой, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACA  
GTGGCCTTTATTATTTCTGGGTG (SEQ ID NO: 72).

**[0175]** Полинуклеотидные и полипептидные последовательности трансмембранных доменов, предложенных в настоящем документе, известны. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий трансмембранный домен, содержит нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или по меньшей мере около 100% (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) идентична известной нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность трансмембранного домена содержит полипептидную

последовательность, которая по на меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% или по меньшей мере около 100% (например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) идентична известной полипептидной последовательности. Необязательно короткие спейсеры могут образовывать связи между любыми или некоторыми из внеклеточного, трансмембранного и внутриклеточного доменов CAR.

**[0176]** Известны внутриклеточные сигнальные домены, которые могут передавать сигнал при связывании антигена с иммунной клеткой, и любой из них может быть включен в антигенсвязывающую систему по настоящему описанию. Например, известно, что цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR) инициируют передачу сигнала после связывания TCR с антигеном (см., например, Brownlie et al., *Nature Rev. Immunol.* 13:257-269 (2013)).

**[0177]** Согласно некоторым вариантам осуществления CAR, рассматриваемые в настоящем документе, содержат внутриклеточный сигнальный домен. «Внутриклеточный сигнальный домен» относится к части CAR, которая участвует в трансдукции сообщения эффективного связывания CAR с целевым антигеном во внутреннюю часть иммунной эффекторной клетки, чтобы вызвать эффекторную клеточную функцию, например активацию, продукцию цитокинов, пролиферацию и цитотоксическую активность, включая высвобождение цитотоксических факторов в клетку– мишень, связанную с CAR, или другие клеточные ответы, вызванные связыванием антигена с внеклеточным доменом CAR. В некоторых вариантах осуществления сигнальный домен и/или домен активации содержит иммунорецепторный тирозиновый домен активации (ITAM). Примеры цитоплазматических сигнальных последовательностей, содержащих ITAM, включают те, которые получены из TCR дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 дзета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d (см., например, Love et al., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a002485 (2010); Smith-Garvin et al., *Annu. Rev. Immunol.* 27:591-619 (2009)). В некоторых вариантах осуществления изобретения подходящие сигнальные домены включают, без ограничения, 4-1BB/CD137, активирующие рецепторы НК-клеток, белок иммуноглобулина, B7-H3, BAFFR, BLAME (SLAMF8), BTLA, CD100 (SEMA4D), CD103, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD19a, CD2, CD247, CD27, CD276 (B7-H3), CD28, CD29, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD30, CD4, CD40, CD49a, CD49D, CD49f, CD69, CD7, CD84, CD8 альфа, CD8 бета, CD96 (Tactile), CD11a, CD11b,

CD11c, CD11d, CDS, CEACAM1, CRT AM, цитокиновый рецептор, DAP-10, DNAM1 (CD226), Fc гамма рецептор, GADS, GITR, HVEM (LIGHTR), IA4, ICAM-1, ICAM-1, Ig альфа (CD79a), IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, индуцибельный Т-клеточный костимулятор (ICOS), интегрины, ITGA4, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB2, ITGB7, ITGB1, KIRDS2, LAT, LFA-1, LFA-1, лиганд, связывающийся с CD83, LIGHT, LIGHT, LTBR, Ly9 (CD229), Ly108), лимфоцитарный функционально-ассоциированный антиген-1 (LFA-1; CD1-1a/CD18), молекулы МНС класса 1, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), OX-40, PAG/Cbp, белка 1 запрограммированной смерти клетки (PD-1), PSGL1, SELPLG (CD162), сигнальной лимфоцит-активирующей молекулы (белки SLAM), SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3), SLAMF4 (CD244; 2B4), SLAMF6 (NTB-A, SLAMF7, SLP-76, белка рецептора ФНО, TNFR2, TNFSF14, рецептора лиганда Toll, TRANCE/RANKL, VLA1 или VLA-6, или их фрагментов, усечения или их комбинации.

**[0178]** Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность, или помощь, или активность, включая секрецию цитокина. Таким образом, термин «внутриклеточный сигнальный домен» относится к части белка, которая трансдуцирует сигнал эффекторной функции и направляет клетку для выполнения специализированной функции. Хотя обычно можно использовать весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать его полностью. В той степени, в которой используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может быть использована вместо всего домена при условии, что она трансдуцирует сигнал эффекторной функции. Термин «внутриклеточный сигнальный домен» включает в себя любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для трансдукции сигнала эффекторной функции.

**[0179]** Известно, что сигналы, генерируемые только TCR, недостаточны для полной активации Т-клетки и что также может понадобиться вторичный или костимулирующий сигнал. Таким образом, можно сказать, что активация Т-клеток опосредована двумя различными классами внутриклеточных сигнальных доменов: первичные сигнальные домены, которые инициируют антигензависимую первичную активацию через TCR (например, комплекс TCR/CD3) и костимулирующие сигнальные домены, которые действуют независимо от антигена, чтобы обеспечить вторичный или костимулирующий сигнал. В некоторых вариантах осуществления CAR, рассматриваемый в настоящем



документе, содержит внутриклеточный сигнальный домен, который содержит один или более «костимулирующих сигнальных доменов» и «первичный сигнальный домен».

**[0180]** Иллюстративные примеры первичных сигнальных доменов, содержащих ITAM, которые используются в настоящем описании, включают те, которые получены из TCR $\zeta$ , FcR $\gamma$ , FcR $\beta$ , DAP12, CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , CD22, CD79a, Cd79b и CD66d. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит первичный сигнальный домен CD3 $\zeta$  и один или более костимулирующих сигнальных доменов. Внутриклеточный первичный сигнальный и костимулирующий сигнальный домены могут быть связаны в любом порядке в тандеме с карбоксильным концом трансмембранного домена. В одном варианте осуществления CAR содержат домен Cd3 $\zeta$ , имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%)

SEQ ID NO: 73.

LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE  
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

(SEQ ID NO: 73). В вариантах осуществления домен CD3 $\zeta$  кодируется нуклеиновой кислотой, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) последовательности нуклеиновой кислоты в соответствии с

ttgAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCcTAiCAGCAaGGCCAGAACC  
AGCTCTATAACGAGCTCAATtTAGGgCGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGA  
GgCGTGGCCGGGACCCcGAaATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAA  
GGCtTGTACAATGAAtTGCAGAAgGATAAGATGGCGGAGGCaTACAGTGAGATTGGG  
ATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTAiCAGGGTCTCAG  
TACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAaGCCCTGCCCCCTCGC  
(SEQ ID NO: 74).

**[0181]** CAR, рассматриваемые в настоящем документе, содержат один или более костимулирующих сигнальных доменов для усиления эффективности и экспансии T-клеток, экспрессирующих рецепторы CAR. Используемый в настоящем документе термин «костимулирующий сигнальный домен» или «костимулирующий домен» относится к внутриклеточному сигнальному домену костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления костимулирующие молекулы могут включать DAP-10, DAP-12, CD27, CD28, CD137(4-1BB), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-I, ICOS

(CD278), CTLA4, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, TRIM, LCK3, SLAM, DAPIO, LAG3, HVEM, B7-H3, NKD2C, GITR, CD5, ICAM-1, CD1 la, Lck, TNFR-I, TNFR-II, FasR, NKG2C, B7-H3 и CD83.

**[0182]** В вариантах осуществления CAR содержат костимулирующий домен 4-1BB, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 75. RGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE (SEQ ID NO: 75). В вариантах осуществления костимулирующий домен 4-1BB кодируется нуклеиновой кислотой, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность в соответствии с, которая может быть кодирована последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с: AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGT ACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAA GGAGGATGTGAA (SEQ ID NO: 76).

**[0183]** В вариантах осуществления CAR содержат костимулирующий домен CD28, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 77. RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 77). В вариантах осуществления костимулирующий домен CD28 кодируется нуклеиновой кислотой, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность в соответствии с, которая может быть кодирована последовательностью нуклеиновой кислоты в соответствии с AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCG CCCCCGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCSTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAG CSTATCGCTCC (SEQ ID NO: 78).

**[0184]** Сконструированные CAR, описанные в настоящем документе, могут также содержать N-концевой сигнальный пептид или метку на N-конце scFv или

антигенсвязывающего домена. В одном варианте осуществления можно использовать гетерологичный сигнальный пептид. Антигенсвязывающий домен или scFV может быть слит с лидерным или сигнальным пептидом, который направляет зарождающийся белок в эндоплазматический ретикулум с последующей транслокацией на поверхность клетки. Следует понимать, что после экспрессии полипептида, содержащего сигнальный пептид, на поверхности клетки, сигнальный пептид обычно удаляется протеолитически во время обработки полипептида в эндоплазматическом ретикулуме и транслокации на поверхность клетки. Таким образом, полипептид, такой как конструкт CAR, описанный в настоящем документе, обычно экспрессируется на поверхности клетки в виде зрелого белка, не содержащего сигнального пептида, в то время как предшественник полипептида включает сигнальный пептид. Можно использовать любую подходящую сигнальную последовательность, известную в данной области. Аналогично, можно также использовать любую известную последовательность метки, известную в данной области. В одном варианте осуществления сигнальная последовательность представляет собой сигнальную последовательность CSF2RA. В вариантах осуществления CAR, описанные в настоящем документе, содержат сигнальную последовательность CSF2RA, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP (SEQ ID NO: 79) MEWTWVFLFLLSVTAGVHS (SEQ ID NO: 80) или MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 81).

**[0185]** Компоненты CAR могут быть заменены или «подменены» с использованием стандартных методик биотехнологической обработки для эквивалентных компонентов. Чтобы привести лишь несколько не ограничивающих и неполных примеров, CAR по настоящему описанию может включать связывающий домен, представленный в настоящем документе, в сочетании с шарниром, представленным в настоящем документе, и костимуляторным доменом, представленным в настоящем документе. В некоторых примерах CAR согласно настоящему описанию может содержать лидерную последовательность, как предложено в настоящем документе, вместе со связывающим доменом, как предложено в настоящем документе, в комбинации с шарниром, предложенным в настоящем документе, и с костимулирующим доменом, предложенным в настоящем документе.

**[0186]** Настоящее изобретение включает конъюгаты, в которых антитело по настоящему изобретению связано с терапевтическим агентом или обнаруживаемым фрагментом. В

различных вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой противораковый агент, как предложено в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления предложенный конъюгат содержит один или более обнаруживаемых фрагментов, т. е. «помечен» одним или более такими фрагментами. В некоторых таких вариантах осуществления конъюгат по настоящему изобретению можно использовать в диагностических целях или для визуализации, например диагностирования или визуализации рака. Любой из широкого спектра обнаруживаемых фрагментов может быть использован в меченых конъюгатах антитела, описанных в настоящем документе. Подходящие обнаруживаемые фрагменты содержат, помимо прочего: различные лиганды, радионуклиды; флуоресцентные красители; хемилюминесцентные агенты (такие как, например, сложные эфиры акридина, стабилизированные диоксетаны и т. п.); биолюминесцентные агенты; спектрально разрешенные неорганические флуоресцентные полупроводники нанокристаллов (т. е. квантовые точки); микрочастицы; металлические наночастицы (например, золота, серебра, меди, платины и т. д.); нанокластеры; парамагнитные ионы металлов; ферменты; колориметрические метки (такие как, например, красители, коллоидное золото и т. п.); биотин; диоксигенин; гаптены; и белки, для которых доступны антисыворотки или моноклональные антитела.

**[0187]** Настоящее описание содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие домены связывания GPC3, предложенные в настоящем документе. Настоящее описание содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела согласно настоящему описанию, содержащие, без ограничений, нуклеиновые кислоты, кодирующие домены связывания GPC3. Настоящее описание содержит нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенсвязывающие системы согласно настоящему описанию, содержащие, без ограничений, нуклеиновые кислоты, кодирующие GPC3-связывающие химерные антигенные рецепторы. Последовательность нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 4 содержит и предусматривает иллюстративные последовательности нуклеиновых кислот, соответствующие и кодирующие каждую из SEQ ID NO: 3 и 5–13. Последовательность нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 15 содержит и предусматривает иллюстративные последовательности нуклеиновых кислот, соответствующие и кодирующие каждую из SEQ ID NO: 12 и 16–24. Последовательность нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 26 содержит и предусматривает иллюстративную последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую и кодирующую SEQ ID NO: 25. Последовательность нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 28 содержит и предусматривает иллюстративную последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую и кодирующую SEQ ID NO:

27. Последовательность нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 30 содержит и предусматривает иллюстративную последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую и кодирующую SEQ ID NO: 29. Последовательность нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 32 содержит и предусматривает иллюстративную последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую и кодирующую SEQ ID NO: 31. Последовательность нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 34 содержит и предусматривает иллюстративную последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую и кодирующую SEQ ID NO: 33. Последовательность нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 36 содержит и предусматривает иллюстративную последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую и кодирующую SEQ ID NO: 35. Последовательность нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 38 содержит и предусматривает иллюстративную последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую и кодирующую SEQ ID NO: 37. Последовательность нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 40 содержит и предусматривает иллюстративную последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую и кодирующую SEQ ID NO: 39. Последовательность нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 42 содержит и предусматривает иллюстративную последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую и кодирующую SEQ ID NO: 41. Последовательность нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 44 содержит и предусматривает иллюстративную последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую и кодирующую SEQ ID NO: 43. Последовательность нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 46 содержит и предусматривает иллюстративную последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую и кодирующую SEQ ID NO: 45. Последовательность нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 48 содержит и предусматривает иллюстративную последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую и кодирующую SEQ ID NO: 47. Последовательность нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 50 содержит и предусматривает иллюстративную последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую и кодирующую SEQ ID NO: 49.

**[0188]** В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, GPC3-связывающий конструкт CAR имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 82. QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYIHWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGN TYYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGNDYDAWFVYWGQGT

LVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGTRK  
NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCK  
QSYSLYTFGQGTKLEIKGSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF  
ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP  
EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGK  
PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH  
MQALPPR (SEQ ID NO: 82). В вариантах осуществления GPC3-связывающий CAR

кодируется нуклеиновой кислотой, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность, в соответствии с:

CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAAAAGCCCGGCGCCAGCGTGA  
AAGTCTCATGCAAGGCCAGCGGCTATACCTTCACCGACTACTACATCCACTGGGTCC  
GACAAGCTCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATGGGCGAGATCTACCCCGGCGAGCGGC  
AACACCTACTACGCCCAGAAGTTCCAAGGACGTGTGACCATGACTCGTGACACCTC  
CACCTCCACCGTGTATATGGAGCTGAGCTCTTTAAGGTCCGAGGATACCGCTGTGTA  
CTACTGCGCCAGAGGAAACGACTACGACGCTTGGTTCGTGTAAGTGGGGCCAAGGAA  
CATTAGTGACCGTCAGCTCCGGCTCCACAAGCGGATCCGGCAAACCCGGTAGCGGC  
GAAGGCAGCACCAAGGGCGACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCTGT  
GTCTTTAGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGTCCTCCAGAGCTTATTAATA  
GCGGCACTCGAAAAAACTATTTAGCTTGGTACCAACAGAAGCCCGGCCAGCCCCC  
AAGCTGCTCATCTACTGGGCTTCCATCAGAGAGAGCGGCGTGCCCGATAGATTGAG  
CGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTCACTTTAACCATCTCCTCTTTACAAGCTGAGGA  
CGTGCCCGTGTATTACTGCAAGCAGTCCTACTCTTTATACACCTTCGGCCAAGGAAC  
AAAGCTGGAGATCAAaggGtccACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGC  
GCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAaggggcg  
gggggagcagTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCC  
CTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAA  
ACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTAC  
AACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGG  
AGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAG  
CAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACG  
ATGTTTTGGACAAGAGgCGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAG  
GAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAG

GCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATG  
GCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATG  
CAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO: 83).

[0189] В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, GPC3-связывающий конструктор CAR имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 84. QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYFTFDYYIHWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGN  
TYYAQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGNDYDAWFVYWGQGT  
LVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGTRK  
NYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCK  
QSYSLYTFGQGTKLEIKGSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF  
ACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP  
EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGGK  
PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLQGLSTATKDTYDALH  
MQALPPR (SEQ ID NO: 84). В вариантах осуществления GPC3-связывающий CAR кодируется нуклеиновой кислотой, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность, в соответствии с:

CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAAAAGCCCGGCGCCAGCGTGA  
AAGTCTCATGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCGACTACTACATCCACTGGGTCC  
GACAAGCTCCCGGCCAAGGTCTGGAGTGGATGGGCGAGATCTACCCCGGCTCCGGC  
AACACCTATTACGCCAGAAGTTCCAAGGACGTGTGACCATGACAGCCGACACCTC  
CACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGTGAGCAGCTTACGTAGCGAGGACACCGCTGTGT  
ACTACTGCGCTCGTGGCAACGACTACGACGCTTGGTTCGTGTACTGGGGCCAAGGA  
ACTCTGGTGACCGTGTCTCCGGAAGCACCTCCGGAAGCGGCAAGCCCGGTAGCGG  
CGAAGGATCCACCAAGGGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCGATTCTTTAGCCG  
TCAGCCTTGGAGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCTTATTAAC  
TCCGGCACTCGAAAAACTACCTCGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGTCAGCCCC  
TAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCATTCGTGAGAGCGGAGTGCCCGACAGATTTA  
GCGGCTCCGGCAGCGGCACCGATTTCACTTTAACCATCAGCTCTTTACAAGCTGAGG  
ATGTGGCCGTGTATTACTGCAAGCAGTCCTACTCTTTATACACCTTCGGCCAAGGAA

CAAAGCTGGAGATTAAGggGtccACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGG  
CGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAgcggc  
ggggggcgcagTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCC  
CTTGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAA  
ACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTAC  
AAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGG  
AGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAG  
CAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACG  
ATGTTTTGGACAAGAGgCGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAG  
GAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAG  
GCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGCACGATG  
GCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATG  
CAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO:85).

[0190] В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, GPC3-связывающий конструкт CAR имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 86. QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYTFDYYIHWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGN  
TYYAQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGNDYDAWFVYWGQGT  
LVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGTR  
KNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSTDFTLTISSVQAEDVAVYYC  
KQSYSLYTFGQGTKLEIKGSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL  
DFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR  
FPEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMG  
GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYD  
ALHMQALPPR (SEQ ID NO: 86). В вариантах осуществления GPC3-связывающий CAR кодируется нуклеиновой кислотой, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность, в соответствии с:

CAAGTTCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCCGGAGCCAGCGTGA  
AAGTCTCATGTAAAACCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACTACATCCACTGGGTCC  
GACAAGCCCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATGGGCGAGATCTACCCCGGCTCCGGC



AACACCTACTACGCCAGAAAGTTCCAAGGTCGTGTGACCATGACAGCCGACACCAG  
CACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCTCTCTGCGTTCTGAGGACACAGCCGTTTA  
CTACTGCGCCAGAGGCAACGACTACGACGCTTGGTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAA  
CATTAGTGACCGTGTCTCCGGATCCACATCCGGCAGCGGAAAGCCCGGTAGCGGC  
GAGGGCAGCACCAAAGGAGACATCGTCATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCCGT  
GTCTTTAGGCGAAAGAGTGACCATGAACTGCAAGTCCAGCCAGTCTTTACTGAATTC  
CGGCACTCGAAAAAACTATTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCTA  
AGCTGCTGATCTACTGGGCTAGCATTGAGAATCCGGCGTGCCCGATCGCTTTAGCG  
GCAGCGGTAGCGGCACCGACTTTACTTTAACCATCAGCAGCGTGCAAGCTGAGGAC  
GTGGCTGTGTACTATTGCAAGCAGTCCTACTCTTTATACACCTTCGGCCAAGGAACA  
AAGCTGGAGATCAAGggGtccACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCG  
CCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAgcggcggg  
gggagcagTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCT  
TGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAAC  
GGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAA  
ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAG  
GATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCA  
GGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGAT  
GTTTTGGACAAGAGgCGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA  
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGC  
CTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGC  
CTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCA  
GGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO: 87).

[0191] В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, GPC3-связывающий конструкт CAR имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 88. QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYTFDYYIHWVRQAPGQGLEWIGEIYPGSGNT  
YYAQKFQGRATLTADTSTSTAYMEFSSLRSEDTAVYYCARGNDYDAWFVYWGQGLT  
VTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGTRKN  
YLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDFRSGSGSDFTLTISLQAEDVAVYYCKQ  
SYSLYTFGQGTKLEIKGSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA  
CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE  
EEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKP

RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGDLQGLSTATKDTYDALH  
MQALPPR (SEQ ID NO: 88). В вариантах осуществления GPC3-связывающий CAR  
кодируется нуклеиновой кислотой, которая по меньшей мере на 75% идентична  
(например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по  
меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–  
95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность, в  
соответствии с:

CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCTGAGGTGAAGAAGCCCGGTGCCTCCGTGAA  
GGTGTCTTGTAAGACCAGCGGCTACACCTTACCGACTACTACATCCACTGGGTCCG  
ACAAGCTCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATTGGCGAGATCTATCCCGGCAGCGGCA  
ACACCTACTACGCCAGAAGTTC AAGGACGTGCCACTTTAACCGCTGACACCAGC  
ACCAGCACCGCCTACATGGAGTTCTCCTCTTTAAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTA  
T TACTGCGCTCGTGGCAACGACTATGACGCTTGGTTCGTGTACTGGGGTCAAGGAAC  
ATTAGTGACAGTGAGCAGCGGATCCACCAGCGGATCCGGCAAGCCCGGTAGCGGA  
GAAGGCAGCACCAAGGGCGACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCTGT  
GAGCCTTGGAGAGAGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCTCCAGTCTTTACTGAACA  
GCGGCACTCGAAAAACTATTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCT  
AAGCTGCTGATCTACTGGGCCTCCATTCGTGAAAGCGGCGTGCCCGATAGATTGAG  
CGGCAGCGGCTCCGGAACCGACTTTACTTTAACCATCTCCTCTTTACAAGCTGAGGA  
CGTGGCTGTGTACTACTGCAAGCAGAGCTACTCTTTATACACCTTCGGCCAAGGAAC  
AAAGCTGGAAATCAAGggGtccACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGC  
GCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAgcggcg  
gggggcgcagTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCC  
CTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAA  
ACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTC AACAACCATTTATGAGACCAGTAC  
AACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGG  
AGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAG  
CAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACG  
ATGTTTTGGACAAGAGgCGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAAG  
GAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAG  
GCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATG  
GCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATG  
CAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO: 89).

[0192] В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, GPC3-  
связывающий конструкт CAR имеет аминокислотную последовательность, которая по

меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 90. VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKTSGYFTDYYIHWRQAPGQGLEWIGEIYPGSGNTY YAQKFQGRATLTADTSTSTAYMEFSSLRSEDTAVYYCARGNDYDAWFVYWGQGLTLVT VSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLNSGTRKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQS YSLYTFGQGTKLEIKGSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR (SEQ ID NO: 90). В вариантах осуществления GPC3-связывающий CAR кодируется нуклеиновой кислотой, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность, в соответствии с:

CAAGTTCAGCTGGTCCAGAGCGGCGCTGAAGTGAAGAAGCCCGGCGCTAGCGTCAA  
AGTCTCATGCAAAACCTCCGGCTACACCTTTACCGACTACTACATCCACTGGGTCCG  
ACAAGCTCCCGGTCAAGGTCTGGAGTGGATCGGCGAGATCTACCCCGGCAGCGGCA  
ACACCTACTACGCCCAGAAGTTCCAAGGACGTGCCACTTTAACCGCTGACACCAGC  
ACCTCCACCGCCTACATGGAGTTCAGTCTTTAAGGTCCGAGGACACCGCCGTGTAC  
TACTGCGCTCGTGGCAACGATTACGACGCTTGGTTCGTGTAAGTGGGACAAGGAAC  
ATTAGTGACCGTGTCCAGCGGCAGCACAAAGCGGAAGCGGCAAGCCCGGTAGCGGC  
GAGGGAAGCACCAAGGGCGATATCGTGATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCCGT  
GTCTTTAGGAGAGAGAGTGACCATGAACTGCAAGAGCAGCCAGTCTTTACTGAACA  
GCGGCACCAGAAAGAACTATTTAGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCC  
AAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCATTTCGTGAGAGCGGAGTGCCCGACAGATTCAG  
CGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTTACTTTAACCATCAGCAGCGTGCAAGCTGAGG  
ATGTGGCCGTGTATTAAGTCAAGCAGTCCTACTCTTTATACACCTTTGGCCAAGGAA  
CAAAGCTGGAGATCAAaggGtccACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGG  
CGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAgcggc  
ggggggcgcagTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCC  
CTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAA  
ACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTAC

AAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGG  
AGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAG  
CAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACG  
ATGTTTTGGACAAGAGgCGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAG  
GAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAG  
GCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATG  
GCSTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATG  
CAGGCCCTGCCCCCTCGC (SEQ ID NO: 91).

**[0193]** Терапии, основанные на модифицированных Т-клеточных рецепторах (TCR) и химерных антигенных рецепторах (CAR), используют специфичность и иммунотерапевтический эффект Т-клеток для лечения широкого спектра злокачественных новообразований. Некоторые исследования показывают, что эти методы терапии могут быть восприимчивы к супрессивным факторам в ТМЕ, которые возникают в результате подавления Т-клеток TGF- $\beta$  (Bendle et al., J Immunol, 191:3232-3239 (2013) и Vong et al., Blood, 130:1791 (2017)). Настоящее описание предполагает использование рецепторов DN TGF- $\beta$ , описанных здесь, в комбинации с терапией TCR или CAR для поддержания или, в некоторых случаях, восстановления экспансии TCR и/или CAR в присутствии подавления TGF- $\beta$ .

**[0194]** Терапия химерными антигенными рецепторами (CAR) Т-клеток представляет собой еще один терапевтический подход к борьбе с опухолевой прогрессией. В клинических условиях авторы изобретения продемонстрировали, что экспансия и персистенция CAR коррелирует с терапевтической эффективностью. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, считается, что TGF- $\beta$ -репрессированные популяции Т-клеток, обнаруженные в ТМЕ, могут ограничивать экспансию и персистенцию CAR Т-клеток у пациентов, которые не отвечают на CAR-терапию. Считается, что полученные ингибирующие цитокины в ТМЕ ограничивают функцию и размножение CAR-клеток. Таким образом, TGF- $\beta$  может ограничить эффективность терапевтических сконструированных Т-клеток.

**[0195]** Комбинирование любых CAR-конструктов или TCR, описанных в настоящем документе, с помощью рецепторов DN TGF- $\beta$  может восстановить, поддержать или усилить терапевтический эффект CAR Т-терапии, затрудненной подавлением TGF- $\beta$ . Так, в одном из описанных в настоящем документе вариантов осуществления рецепторы DN TGF- $\beta$ , например DN TGF- $\beta$ RI или RII, коэкспрессируются в Т-клетке или НК-клетке вместе с GPC3-связывающим CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления рецепторы DN TGF- $\beta$ , например DN TGF- $\beta$ RI или RII,

коэкспрессируются в Т-клетке или НК-клетке вместе с GPC3-связывающим CAR, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления рецепторы DN TGF- $\beta$ , например DN TGF- $\beta$ RI или RII, коэкспрессируются в Т-клетке или НК-клетке вместе с GPC3-связывающим TCR. Рецепторы DN TGF- $\beta$  описаны в международной патентной заявке № PCT/US2020/070157, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**[0196]** Сконструированные рецепторы TGF- $\beta$  могут содержать N-концевой сигнальный пептид на N-конце, например на N-конце внеклеточного лигандсвязывающего домена DN TGF- $\beta$ RI. В одном варианте осуществления можно использовать гетерологичный сигнальный пептид. Внеклеточный домен DN TGF- $\beta$ RI может быть слит с лидерным или сигнальным пептидом, который направляет зарождающийся белок в эндоплазматический ретикулум с последующей транслокацией на поверхность клетки. Следует понимать, что после экспрессии полипептида, содержащего сигнальный пептид, на поверхности клетки, сигнальный пептид обычно удаляется протеолитически во время обработки полипептида в эндоплазматическом ретикулуме и транслокации на поверхность клетки. Таким образом, полипептид, такой как DN TGF- $\beta$ RI, обычно экспрессируется на поверхности клетки в виде зрелого белка, не содержащего сигнального пептида, в то время как предшественник полипептида включает сигнальный пептид. Можно использовать любую подходящую сигнальную последовательность. В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, DN TGF- $\beta$ RI содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 92 или ее части. MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAAAALLPGATA (SEQ ID NO: 92).

**[0197]** В настоящем описании сигнальный пептид присоединяется к N-концу внеклеточного антигенсвязывающего домена DN TGF- $\beta$ RI в виде слитого белка. В одном варианте осуществления DN TGF- $\beta$ RI содержит внеклеточный лигандсвязывающий домен, который по меньшей мере на 75% идентичен (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) TGF- $\beta$ RI дикого типа, и сигнальный пептид на N-конце внеклеточного домена TGF- $\beta$ RI, который по меньшей мере на 75% идентичен (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%)

аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 93.  
MEAAVAAPRPRLLLLVLAAAAAAAALLPGATALQCFCCHLCTKDNFTCVTDGLCFVS  
VTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVFCAPSSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSS  
PGLGPVEL (SEQ ID NO: 93).

**[0198]** Сконструированные конструкторы DN TGF- $\beta$ RII могут также содержать N-концевой сигнальный пептид на N-конце внеклеточного лигандсвязывающего домена TGF- $\beta$ RII. В одном варианте осуществления можно использовать гетерологичный сигнальный пептид. Внеклеточный домен DN TGF- $\beta$ RII может быть слит с лидерным или сигнальным пептидом, который направляет зарождающийся белок в эндоплазматический ретикулум с последующей транслокацией на поверхность клетки. Следует понимать, что после экспрессии полипептида, содержащего сигнальный пептид, на поверхности клетки, сигнальный пептид обычно удаляется протеолитически во время обработки полипептида в эндоплазматическом ретикулуме и транслокации на поверхность клетки. Таким образом, полипептид, такой как DN TGF- $\beta$ RII, обычно находится на поверхности клетки в виде зрелого белка, не содержащего сигнального пептида, в то время как предшественник полипептида включает сигнальный пептид. Можно использовать любую подходящую сигнальную последовательность. В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, конструкторы DN TGF- $\beta$ RII, описанные в настоящем документе, содержат сигнальную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 94 или ее части. MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIAS (SEQ ID NO: 94). В другом варианте осуществления сигнальная последовательность получена из альфа-субъединицы рецептора колониестимулирующего фактора 2 (CSF2R $\alpha$ ), содержащей аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 75% идентичную (например, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности, например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 79 или ее части. MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP (SEQ ID NO: 79). Сигнальные последовательности, описанные в настоящем документе, также могут быть необязательно использованы с любой подходящей белковой меткой, включая, без ограничений: V5-метку, мус-метку, HA-метку, Spot-метку, NE-метку. В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, сигнальная последовательность и метка содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей

мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 95. MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEQKLISEEDL (SEQ ID NO: 95). В вариантах осуществления сигнальная последовательность и метка могут быть кодированы нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 75% идентична ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCCTC CTGATTCCTGAACAGAAGCTGATAAGTGAGGAGGACTTG (SEQ ID NO: 96) (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100% ).

**[0199]** Следует понимать, что использование этого сигнального пептида является примерным. Любой подходящий сигнальный пептид, хорошо известный в данной области, может быть нанесен на DN TGF- $\beta$ RI или RII для обеспечения экспрессии на клеточной поверхности иммунной клетки. Пригодные сигнальные пептиды могут быть получены из белков клеточной поверхности, естественно экспрессируемых в Т-клетке, НК-клетке или ее клетке-предшественнице, включая любой из сигнальных пептидов полипептидов, описанных в настоящем документе. Таким образом, любой подходящий сигнальный пептид может быть использован для направления DN TGF- $\beta$ RI RII для экспрессии на клеточной поверхности Т-клетки или НК-клетки.

**[0200]** В вариантах осуществления DN TGF- $\beta$ RI содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 97. MEAAVAAPRPRLLLLVLAATAAAAAAAAAALLPGATALQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVS VTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVCAPSSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSS PGLGPVELAAVIAGPVCFVCISLMLMVYIRVNRQ (SEQ ID NO: 97).

**[0201]** В одном варианте осуществления DN TGF- $\beta$ RII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 98: MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKKFCDFVRF STCDNQKSCMSNCSITSICEKPKQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAS

PKCIMKEKKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIQVVTGISLLPPLGVAI  
SVIIFCYRVNRQ (SEQ ID NO: 98).

[0202] В одном варианте осуществления DN TGF- $\beta$ RII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 99.  
TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQE  
VCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKKPGETFFMCSCSSD  
ECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 99).

[0203] В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, DN TGF- $\beta$ RII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) TGF- $\beta$ RII дикого типа, как показано в аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 100.  
TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQE  
VCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKKPGETFFMCSCSSD  
ECNDNIIFSEEYNTSNPDLLLVIQVVTGISLLPPLGVAISVIIFCY (SEQ ID NO: 100).

[0204] В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, DN TGF- $\beta$ RII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 101.  
TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQE  
VCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPCKIMKEKKKKPGETFFMCSCSSD  
ECNDNIIFSEEYNTSNPDSGPILLTISILSFFSVALLVIL (SEQ ID NO: 101).

[0205] В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, DN TGF- $\beta$ RII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%), как показано в аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 102.  
TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQE



VCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKKPGETFFMCSCSSD  
ECNDNIIFSEEYNTSNPDSGPILLTCPTISILSFFSVALLVIL (SEQ ID NO: 102).

[0206] В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, DN TGF- $\beta$ RII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 103.  
ACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKKTLEHLCKKPRKLNLSFNPEFLDCQIHRVDDIQARD  
EVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACD  
APILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTNSTLPPPSLQSGILTLNPVAQGQPILTS  
LGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ (SEQ ID NO: 103).

[0207] В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, DN TGF- $\beta$ RII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 104.

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQE  
VCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKKPGETFFMCSCSSD  
ECNDNIIFSEEYNTSNPDSGPILLTISILSFFSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKT  
LEHLCKKPRKLNLSFNPEFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLG  
GDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVY  
QDLLLSLGTNSTLPPPSLQSGILTLNPVAQGQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ  
(SEQ ID NO: 104).

[0208] В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, DN TGF- $\beta$ RII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 105.

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQE  
VCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKKPGETFFMCSCSSD  
ECNDNIIFSEEYNTSNPDSGPILLTCPTISILSFFSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDH  
KKTLEHLCKKPRKLNLSFNPEFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTFPQQLEESEKQ  
RLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGP

HVYQDLLLSLGTNSTLPPFSLQSGILTLNPVAQGQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQN  
Q (SEQ ID NO: 105).

**[0209]** В одном варианте осуществления сконструированный DN TGF-RII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 106.  
MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRST  
CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASP  
KCIMKEKKPKGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO: 106).

**[0210]** В одном варианте осуществления сконструированный DN TGF-RII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 107.  
MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEQKLISEEDLTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLC  
KFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHD  
FILEDAASP KCIMKEKKPKGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD (SEQ ID NO:  
107).

**[0211]** В одном варианте осуществления сконструированный DN TGF-RII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 108.  
MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRST  
CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASP  
KCIMKEKKPKGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSGPILLTISILSFFSVALLVILA  
CVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARDE  
VEGFLQDTFPQQLSESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDA  
PILSSRSRLDCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTNSTLPPFSLQSGILTLNPVAQGQPILTSL  
GSNQEEAYVTMSSFYQNQ (SEQ ID NO: 108).

**[0212]** В одном варианте осуществления сконструированный DN TGF-RII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по

меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 109.

**[0213]**

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEQKLISEEDLTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVK  
FPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPK  
LPYHDFILEDAAAPK CIMKEKKKPKGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSGPILLTI  
SILSFFSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKLNVSFNPESFLDC  
QIHRVDDIQARDEVEGFLQDTPPQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSS  
LTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTNSTLPPPSLQSGILT  
LNPVAQGQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ (SEQ ID NO: 109).

**[0214]** В одном варианте осуществления сконструированный DN TGF–RII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 110.

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST  
CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAP  
K CIMKEKKKPKGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSGPILLTISILSFFSVALLVILA  
CVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARDE  
VEGFLQDTPPQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDA  
PILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTNSTLPPPSLQSGILTNPVAQGQPILTSL  
GSNQEEAYVTMSSFYQNNQ (SEQ ID NO: 110).

**[0215]** В одном варианте осуществления сконструированный DN TGF–RII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 111.

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEQKLISEEDLTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLC  
KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHD  
FILEDAAPK CIMKEKKKPKGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSGPILLTCPTISIL  
SFFSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKLNVSFNPESFLDCQI  
HRVDDIQARDEVEGFLQDTPPQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLT  
CLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTNSTLPPPSLQSGILTNP  
VAQGQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNNQ (SEQ ID NO: 111).

**[0216]** В одном варианте осуществления сконструированный DN TGF-RII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 112.  
MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST  
CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASP  
KCIMKEKPKGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSGPILLTCPTISILSFFSVALLV  
ILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKLNLSFNPEFLDCQIHRVDDIQR  
DEVEGFLQDTFPQQLSESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVVITPESFGRDSSLTCLAGNVSAC  
DAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTNSTLPPFSLQSGILTLNPVAQGGPIL  
SLGSNQEEAYVTMSSFYQNN (SEQ ID NO: 112).

**[0217]** В настоящем описании рассматриваются экспрессия полинуклеотидов, кодирующих GPC3 CAR и TCR, описанных в настоящем документе, и коэкспрессия полинуклеотидов, включающих сконструированные рецепторы DN TGF- $\beta$ , с GPC3-связывающими CAR, TCR и их фрагментами, клетки и композиции, содержащие их, и векторы, экспрессирующие полипептиды.

**[0218]** В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, GPC3-связывающий CAR, связанный с рецептором DN TGF- $\beta$ , имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 113.  
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKTSGYTFDYYIHWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGN  
TYYAQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNDYDAWFVYWGQGT  
LTVVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLNSGTR  
KNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYC  
KQSYSLYTFGGGTKLEIKGSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL  
DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR  
FPEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMG  
GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYD  
ALHMQUALPPRGSSEGRGSLTCDGVEENPGPMGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHV  
QKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCA  
VWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASP KCIMKEKPKGETFFMCSCSSDECND  
NIIFSEEYNTSNPDLLL VIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIIFYCY (SEQ ID NO: 113). B

вариантах осуществления GPC3-связывающий CAR кодируется нуклеиновой кислотой, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность, в соответствии с:

СААГТССААСТГГТГСАГТССГГАГССГГАГТСААГААГСССГГАГССАГССГТГА  
ААГТСТСАТГТААААССАГССГГТТАСАСТТАССГАСТТАСАТССАСТГГГТСС  
ГАСААГСССССГГТСААГГТТТАГАГТГГАТГГГССГАГАТТАСССГГТССГСС  
ААСАСТТАСАГСССАГААГТТССААГГТССГТГТАССАТГАСАГССГАССАГ  
САСТТАССГССТАСАТГГААСТГТССТТТГССГТТТГАГГАСАСАГССГТТА  
СТАТГССГССАГАГГСААССАТТАСАГТТАССГТТГГТТССГТТАСТГГСССААГГАА  
САТТАГТГАССГТГТССТССГГАТССАСАТССГССАГССГАААГСССГГАТГССГСС  
ГАГСССАГСАССАААГГАГАСАТССГТАТГАСССАГАСССГАТТТТТАГССГТ  
ГТТТТАГССГАААГАГТГАССАТГААСТГСААГТССАГССАГТТТТАСТГААТТА  
ССГСАСТССГАААААСТАТТТАГСТТГГАТТАССАГСАГАААСССГГССАГССССТА  
АГТГТГТАТТАСТГГГТАГАТТАССГААТТАССГССГТГСССГАТССГТТТАГСС  
ГСАГССГАТГСССАССГАСТТАСТТТААССАТТАСАГСАГССГТААГТГАГГА  
ГТГГТГТГАТТАТТГААГСАГТССТАСТТТАТАСАСТТАССГССААГГААА  
ААГТГГАГАТТАААГГГТССАССАССАГССАГССАГССАССАССААССАССА  
ССССАССАТССГССГТАААССССТГТСССТГСССССГАГССГТГССГССАГСС  
ГССГСССГССАГТГСАСАССАГСССГТГГАСТТАСССТГТГАТАТТАСАТТА  
ГССГСССТТГСССГГГАСТТГТГГГТССТТТСССТГТАСТГГТТАТАСССТТТА  
ТГСАААССГСССГАГААГАААСТССТГТАТАТАТТАААААССАТТТАТГАГАСС  
АГТАСАААСТТАСААГАГААГАТГГТГТАГТГССГАТТТАСАГААГААГА  
ААГГАГАТГТААТТАГАГАТГААГТТАСАГСАГГАССАГСССССГССАТ  
САГААГССАГААССАГТТАТААССАГТТААТТАГСССГААГАГАГАГТ  
АССАТГТТТТГГАСААГАГССГТГСССГГАСССГАААТГСССГГАААГССАГ  
ААГААГААСССТТАГАААГГТТГТАСААТГААТТАСАГААГАТААГАТГСС  
ГАГСАТАСАГТГАГАТТГГГАТГАААГССАГССАГССАГСССГААГСССАСС  
АТГСССТТАТАСАГГТТТАСАТАСАССАААГСАССАТАСАГССССТТАСА  
АТГАААСССТГССССТТАССГГТТТАГАГАГСССАГАГГТТТТАГАГАГТГ  
СССАГССГТГААГАГААССАГССССТАГГГААГАГГТТАСТТАГАГАГТГ  
ТГСССТТАСАСАТТАГТГТГТГГАТТАСАТАССАГССАССАСССССАТГТ  
СААААГАГССГТААААССАТАТАТТАГТГТАССААААТГСССГССГТААГТ  
ТССССАГТТГТААГТТТАССАГТТАГГТТАСАСТТТТАГАААССАГАА

AGCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTG  
CGTGGCCGTGTGGAGGAAGAACGACGAGAACATCACTTTAGAGACAGTGTGCCACG  
ACCCCAAGCTGCCCTACCACGACTTCATTTTAGAAGATGCCGCCAGCCCCAAGTGC  
ATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGCGAGACCTTCTTCATGTGTTCTTGTTCGTCT  
GATGAGTGCAACGATAACATCATCTTCAGCGAGGAGTACAACACCAGCAACCCCGA  
TTTACTGCTGGTGATCTTCCAAGTTACCGGCATTTCTTTACTGCCTCCGTTGGGCGTG  
GCTATCAGCGTGATCATCATCTTCTACTGCTAT (SEQ ID NO: 114).

[0219] В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, GPC3-связывающий CAR, связанный с рецептором DN TGF-β, имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%)

SEQ	ID	NO:	115.
-----	----	-----	------

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFDYYIHWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGN  
TYYAQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNDYDAWFVYWGQGT  
LVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGTR  
KNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYC  
KQSYSLYTFGQGTKLEIKGSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL  
DFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR  
FPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMG  
GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYD  
ALHMQUALPPRGSGEGRGSLTCDGVEENPGPMGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHV  
QKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCA  
VWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKPKGETFFMCSCSSDECND  
NIIFSEEYNTSNPDLLLVIQVTGISLLPPLGVAISVIIIIFYCY (SEQ ID NO: 115).

В вариантах осуществления GPC3-связывающий CAR кодируется нуклеиновой кислотой, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность, в соответствии с:

CAAGTCCAACCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCCGGAGCCAGCGTGA  
AAGTCTCATGTAACACCAGCGGCTACACCTTACCGACTACTACATCCACTGGGTCC  
GACAAGCCCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATGGGCGAGATCTACCCCGGCTCCGGC  
AACACCTACTACGCCAGAAAGTTCCAAGGTCGTGTGACCATGACAGCCGACACCAG  
CACCTCCACCGCCTACATGGAACCTGTCCTCTCTGCGTTCTGAGGACACAGCCGTTTA

CTACTGCGCCAGAGGCAACGACTACGACGCTTGGTTCGTGTACTGGGGCCAAGGAA  
CATTAGTGACCGTGTCTCCGGATCCACATCCGGCAGCGGAAAGCCCGGTAGCGGC  
GAGGGCAGCACCAAAGGAGACATCGTCATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCCGT  
GTCTTTAGGGCGAAAGAGTGACCATGAACTGCAAGTCCAGCCAGTCTTTACTGAATTC  
CGGCACTCGAAAAAACTATTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCTA  
AGCTGCTGATCTACTGGGCTAGCATTTCGAGAATCCGGCGTGCCCGATCGCTTTAGCG  
GCAGCGGTAGCGGCACCGACTTTACTTTAACCATCAGCAGCGTGCAAGCTGAGGAC  
GTGGCTGTGTACTATTGCAAGCAGTCCTACTCTTTATACACCTTCGGCCAAGGAACA  
AAGCTGGAGATCAAGGGGTCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGG  
CGCCACCATCGCGTCGCAACCCCTGTCCCTGCGCCCCGAGGCGTGCCGGCCAGCG  
GCGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTG  
GGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTAT  
TGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACC  
AGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAG  
AAGGAGGATGTGAATTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCCTAT  
CAGCAAGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATTTAGGGCGAAGAGAGGAGT  
ACGATGTTTTGGACAAGAGGCGTGGCCGGGACCCCGAAATGGGGGGAAAGCCGAG  
AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCTTGTACAATGAATTGCAGAAGGATAAGATGGCG  
GAGGCATACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGCACG  
ATGGCCTTTATCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTAC  
ATGCAAGCCCTGCCCCCTCGCGGCTCTGGAGAGGGCAGAGGCTCTCTGCTGACCTG  
CGGCGACGTGGAAGAGAACCCAGGCCCATGGGAAGAGGTTTACTGAGAGGACTG  
TGGCCTTTACACATCGTGCTGTGGACTCGTATCGCCAGCACCATCCCCCCCATGTC  
CAAAGAGCGTGAACAACGACATGATCGTGACCGACAACAATGGCGCCGTGAAGT  
TCCCCAGCTGTGCAAGTTCTGCGACGTGAGGTTTCAGCACTTGTGACAACCAGAAG  
AGCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAGAAGCCCCAAGAAGTGTG  
CGTGGCCGTGTGGAGGAAGAACGACGAGAACATCACTTTAGAGACAGTGTGCCACG  
ACCCCAAGCTGCCCTACCACGACTTCATTTTAGAAGATGCCGCCAGCCCCAAGTGC  
ATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGCGAGACCTTCTTCATGTGTTCTTGTTCGTCT  
GATGAGTGCAACGATAACATCATCTTCAGCGAGGAGTACAACACCAGCAACCCCGA  
TTTACTGCTGGTGATCTTCCAAGTTACCGGCATTTCTTTACTGCCTCCGTTGGGCGTG  
GCTATCAGCGTGATCATCATCTTCTACTGCTAT (SEQ ID NO: 116).

[0220] В одном варианте осуществления GPC3-связывающий CAR, связанный с рецептором DN TGF- $\beta$ , имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%,

по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 116. QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKTSGYTFDYYIHWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGN TYAAQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNDYDAWFVYWGQGT LVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLNSGTR KNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYC KQSYSLYTFGQGTKLEIKGSLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVVGGV LACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGS GEGRGSLLTCGDVEENPGPMGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTD NNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLET VCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD LLLVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIIFYCY (SEQ ID NO: 116). В вариантах осуществления GPC3-связывающий CAR кодируется нуклеиновой кислотой, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность, в соответствии с:

CAAGTCCAACCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAGGTCAAGAAGCCCGGAGCCAGCGTGA AAGTCTCATGTAAAACCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACTACATCCACTGGGTCC GACAAGCCCCCGGTCAAGGTTTAGAGTGGATGGGCGAGATCTACCCCGGCTCCGGC AACACCTACTACGCCAGAAAGTTCCAAGGTCGTGTGACCATGACAGCCGACACCAG CACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGTCTCTCTGCGTTCTGAGGACACAGCCGTTTA CTACTGCGCCAGAGGCAACGACTACGACGCTTGGTTCGTGTAAGTGGGGCCAAGGAA CATTAGTGACCGTGTCTCCGGATCCACATCCGGCAGCGGAAAGCCCGGTAGCGGC GAGGGCAGCACAAAGGAGACATCGTCATGACCCAGAGCCCCGATTCTTTAGCCGT GTCTTTAGGCGAAAGAGTGACCATGAACTGCAAGTCCAGCCAGTCTTTACTGAATTC CGGCACTCGAAAAAATAATTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCCGGCCAGCCCCCTA AGCTGCTGATCTACTGGGCTAGCATTCGAGAATCCGGCGTGCCCGATCGCTTTAGCG GCAGCGGTAGCGGCACCGACTTTACTTTAACCATCAGCAGCGTGCAAGCTGAGGAC GTGGCTGTGTAAGTATTGCAAGCAGTCTACTCTTTATACACCTTCGGCCAAGGAACA AAGCTGGAGATCAAGGGGTCCCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCC ATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCT TTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAG



TGGCCTTTATTATTTTCTGGGTCCGATCAAAAAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACT  
ACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTAT  
GCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAG  
CGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAAGGGCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATC  
TAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGGCGTGGCCGGGACCCTGA  
GATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTG  
CAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCC  
GGAGGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGA  
CACCTACGACGCCCTTCACATGCAAGCTCTGCCCCCTCGCGGCTCTGGAGAGGGCA  
GAGGCTCTCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGAAGAGAACCAGGCCCATGGGAAGA  
GGTTTACTGAGAGGACTGTGGCCTTTACACATCGTGCTGTGGACTCGTATCGCCAGC  
ACCATCCCCCCCATGTCCAAAAGAGCGTGAACAACGACATGATCGTGACCGACAA  
CAATGGCGCCGTGAAGTTCAGCTGTGCAAGTTCTGCGACGTGAGGTTTCAGCA  
CTTGTGACAACCAGAAGAGCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATCTGCGAG  
AAGCCCCAAGAAGTGTGCGTGGCCGTGTGGAGGAAGAACGACGAGAACATCACTTT  
AGAGACAGTGTGCCACGACCCCAAGCTGCCCTACCACGACTTCATTTTAGAAGATG  
CCGCCAGCCCCAAGTGCATCATGAAGGAGAAGAAGAAGCCCGGCGAGACCTTCTTC  
ATGTGTTCTTGTTCGTCTGATGAGTGCAACGATAACATCATCTTCAGCGAGGAGTAC  
AACACCAGCAACCCCGATTTACTGCTGGTGTCTTCCAAGTTACCGGCATTTCTTTA  
CTGCCTCCGTTGGGCGTGGCTATCAGCGTGATCATCATCTTCTACTGCTAT (SEQ  
ID NO: 117).

**[0221]** «Полипептид», «полипептидный фрагмент», «пептид» и «белок», если не указано иное, имеют общепринятое значение, т. е. представляют собой последовательность аминокислот. Полипептиды не ограничены конкретной длиной, например, они могут включать белковую последовательность полной длины или фрагмент белка полной длины, а также могут включать посттрансляционные модификации полипептида, например гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и тому подобное, а также другие модификации, известные в данной области, как природного происхождения, так и неприродного происхождения. В различных вариантах осуществления рассматриваемые в настоящем документе полипептиды включают сигнальную (или лидерную) последовательность на N-конце белка, которая котрансляционно или посттрансляционно направляет перенос белка.

**[0222]** Полипептиды включают «варианты полипептидов». Варианты полипептидов могут отличаться от встречающегося в природе полипептида одной или более заменами, делециями, добавлениями и/или вставками. Такие варианты могут быть природного

происхождения или могут быть получены синтетически, например, путем модификации одной или более из вышеуказанных полипептидных последовательностей. Например, в некоторых вариантах осуществления может быть желательно улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства сконструированных рецепторов DN TGF- $\beta$  и сконструированных GPC3-связывающих CAR и TCR рецепторов путем введения одной или более замен, делеций, добавлений и/или вставок. Предпочтительно полипептиды согласно настоящему описанию включают в себя полипептиды, имеющие по меньшей мере около 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с ними. Полипептиды согласно настоящему описанию включают варианты, имеющие по меньшей мере около 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности с любой из эталонных последовательностей, описанных в настоящем документе (см., например, перечень последовательностей), как правило, где вариант сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность эталонной последовательности. Полипептиды включают «фрагменты полипептидов». Фрагменты полипептидов относятся к полипептиду, который может быть мономерным или мультимерным, имеющий аминоконцевую делецию, карбоксильную концевую делецию и/или внутреннюю делецию или замену полипептида природного происхождения или полученного рекомбинантным путем. В определенных вариантах осуществления фрагмент полипептида может содержать аминокислотную цепь длиной по меньшей мере от 5 до около 500 аминокислот. Следует понимать, что в определенных вариантах осуществления фрагменты имеют длину по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 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, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот.

**[0223]** Полипептид также может быть слит в рамке или конъюгирован с линкером или другой последовательностью для облегчения синтеза, очистки или идентификации полипептида (например, поли-His) или для улучшения связывания полипептида с твердой подложкой. Как отмечалось выше, полипептиды по настоящему описанию могут быть изменены различными способами, включая аминокислотные замены, делеции, усечения и вставки. Способы таких манипуляций обычно известны в данной области. Например, варианты аминокислотной последовательности эталонного полипептида могут быть получены путем мутаций в ДНК. Способы мутагенеза и изменения нуклеотидных последовательностей хорошо известны в данной области. См., например, Kunkel (1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 488–492), Kunkel *et al.*, (1987, *Methods in Enzymol*, 154: 367–382), U.S. Pat. No. 4,873,192, Watson, J. D. *et al.*, (*Molecular Biology of the Gene*, Fourth

Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) и приведенные в них ссылки. Рекомендации по соответствующим аминокислотным заменам, не влияющим на биологическую активность интересующего белка, можно найти в модели Dayhoff *et al.*, (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.).

**[0224]** В определенных вариантах осуществления вариант будет содержать консервативные замены. «Консервативная замена» представляет собой замену, при которой аминокислота заменяется другой аминокислотой, которая имеет аналогичные свойства, так что специалист в области химии пептидов может ожидать, что вторичная структура и профиль гидропатичности полипептида по сути не изменится. Можно внести модификации в структуру полинуклеотидов и полипептидов по настоящему описанию и при этом получить функциональную молекулу, которая кодирует вариант или производное полипептида с желаемыми характеристиками.

**[0225]** Варианты полипептидов дополнительно включают гликозилированные формы, агрегирующие конъюгаты с другими молекулами и ковалентные конъюгаты с несвязанными химическими соединениями (например, пегилированными молекулами). Ковалентные варианты могут быть получены путем присоединения функциональных элементов к группам, находящимся в аминокислотной цепи или на N- или C-концевом остатке, как известно в данной области. Варианты также включают аллельные варианты, видовые варианты и мутеины. Вариантами также являются усечения или делеции областей, которые не влияют на функциональную активность белков.

**[0226]** Если требуется экспрессия двух или более полипептидов, кодирующие их полинуклеотидные последовательности могут быть разделены IRES-последовательностью. В другом варианте осуществления два или более полипептидов могут быть экспрессированы в виде слитого белка, включающего одну или более саморасщепляющихся полипептидных последовательностей, например полипептид T2A. В одном варианте осуществления саморасщепляющаяся полипептидная последовательность имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%) SEQ ID NO: 118. EGRGSLTCDGVEENPGP (EQ ID NO: 118). В вариантах осуществления саморасщепляющаяся полипептидная последовательность кодируется нуклеиновой кислотой, которая по меньшей мере на 75% идентична (например, имеет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентичности; например, 85–90%, 85–95%, 85–100%, 90–95%, 90–100% или 95–100%)

нуклеиновой кислоте, имеющей последовательность, в соответствии с: GAGGGCAGAGGCTCTCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGAAGAGAACCCAGGCCCC (SEQ ID NO: 119). В других вариантах осуществления два или более полипептидов, экспрессируемых различными промоторами, могут находиться в двух или более векторах. В некоторых вариантах осуществления GPC3-связывающий CAR или TCR кодируется в том же векторе, что и сконструированный рецептор DN TGF- $\beta$ , и функционально связан с тем же промотором, что и сконструированный рецептор DN TGF- $\beta$ , где последовательности разделены IRES-последовательностью. В некоторых вариантах осуществления GPC3-связывающий CAR или TCR кодируется в том же векторе, что и сконструированный рецептор DN TGF- $\beta$ , но функционально связан с другим промотором, отличным от промотора сконструированного рецептора DN TGF- $\beta$ . В определенных вариантах осуществления GPC3-связывающий CAR или TCR экспрессируется на клетке, которая также была сконструирована для экспрессии мембраносвязанного химерного рецептора суши-домена IL-15-IL-15R $\alpha$ , такого как описано в предварительном патенте США № 63/159,610, поданной 11 марта 2021 г., который полностью включен в настоящий документ путем ссылки. В некоторых вариантах осуществления GPC3-связывающий CAR или TCR кодируется в том же векторе, что и мембраносвязанный химерный рецептор суши-домена IL-15-IL-15R $\alpha$ , и функционально связан с тем же промотором, что и сконструированный мембраносвязанный химерный рецептор суши-домена IL-15-IL-15R $\alpha$ , где последовательности разделены последовательностью IRES или расщепляемым линкером. В некоторых вариантах осуществления GPC3-связывающий CAR или TCR кодируется в том же векторе, что и мембраносвязанный химерный рецептор суши-домена IL-15-IL-15R $\alpha$ , и функционально связан с другим промотором, отличным от промотора мембраносвязанного химерного рецептора суши-домена IL-15-IL-15R $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления GPC3-связывающий CAR кодируется в другом векторе, отличном от мембраносвязанного химерного рецептора суши-домена IL-15-IL-15R $\alpha$ .

**[0227]** Полипептиды по настоящему описанию включают в себя слитые полипептиды. В некоторых вариантах осуществления предложены слитые полипептиды и полинуклеотиды, кодирующие слитые полипептиды. Слитые полипептиды и слитые белки относятся к полипептиду, имеющему по меньшей мере два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять или более полипептидных сегментов. Слитые полипептиды, как правило, связаны С-концом с N-концом, хотя они также могут быть связаны С-концом с С-концом, N-концом с N-концом или N-концом с С-концом. Полипептиды слитого белка могут находиться в любом порядке или в определенном порядке. Слитые полипептиды или слитые белки также могут включать консервативно

модифицированные варианты, полиморфные варианты, аллели, мутанты, подпоследовательности и межвидовые гомологи, пока сохраняется желаемая транскрипционная активность слитого полипептида. Слитые полипептиды могут быть получены химическими методами синтеза или химическими связями между двумя фрагментами или могут быть по существу получены с использованием других общепринятых методик. Лигированные последовательности ДНК, содержащие слитый полипептид, функционально связаны с подходящими элементами контроля транскрипции или трансляции, как описано в других разделах настоящего документа.

**[0228]** В одном варианте осуществления партнер по слиянию содержит последовательность, которая способствует экспрессии белка (усилитель экспрессии) с более высоким выходом, чем нативный рекомбинантный белок. Другие партнеры по слиянию могут быть выбраны таким образом, чтобы увеличить растворимость белка, или обеспечить нацеливание белка на желаемые внутриклеточные компартменты, или облегчить транспорт слитого белка через клеточную мембрану.

**[0229]** Слитые полипептиды могут дополнительно содержать сигнал расщепления полипептида между каждым из полипептидных доменов, описанных в настоящем документе. Кроме того, полипептидный сайт может быть помещен в любую линкерную пептидную последовательность. Примеры полипептидных сигналов расщепления включают сайты распознавания расщепления полипептидов, такие как сайты расщепления протеазой, сайты расщепления нуклеазой (например, сайты распознавания редких рестрикционных ферментов, сайты распознавания рибозимов саморасщепления) и саморасщепляющиеся вирусные олигопептиды (см. deFelipe and Ryan, 2004. *Traffic*, 5(8); 616–26).

**[0230]** Подходящие сайты расщепления протеазы и саморасщепляющиеся пептиды известны специалисту в данной области (см., например, Ryan *et al.*, 1997. *J Gener. Viral.* 78, 699–722; Scymczak *et al.* (2004) *Nature Biotech.* 5, 589–594). Иллюстративные сайты расщепления протеазы включают, но не ограничиваются ими, сайты расщепления протеазы потивируса Nia (например, протеазы вируса гравировки табака), протеазы потивируса HC, протеазы потивируса PI (P35), протеазы биовируса Nia, протеазы биовируса RNA-2-колированной, протеазы афтовируса L, протеазы энтеровируса 2A, протеазы риновируса 2A, протеазы пикорнавируса 3C, протеазы комовируса 24K, протеазы неповируса 24K, 3C-подобной протеазы RTSV (сферического вируса тунгрового риса), 3C-подобной протеазы PYVF (вируса желтой пятнистости пастернака), гепарина, тромбина, фактора Ха и энтерокиназы. Из-за высокой степени расщепления можно использовать участки расщепления протеазы TEV (вирус гравировки табака). В других

вариантах осуществления изобретения саморасщепляющиеся пептиды могут включать полипептидные последовательности, полученные из пептидов потивируса и кардиовируса 2A, FMDV (вирус эпизоотического стоматита), вируса конского ринита А, вируса *Thosea asigna* и тешовируса свиней. В других вариантах осуществления сайт саморасщепляющегося полипептида содержит 2A или 2A-подобный сайт, последовательность или домен (Donnelly *et al.*, 2001. *J Gen. Viral.* 82:1027–1041).

**[0231]** В целом, подразумевается, что любой подходящий вирусный вектор или векторы могут быть использованы для трансдукции сконструированных конструктов, описанных в настоящем документе. В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, клетка (например, Т-клетка или НК-клетка) трансдуцирована ретровирусным вектором, например лентивирусным вектором. Используемый в настоящем документе термин «ретровирус» относится к вирусу РНК, который осуществляет обратную транскрипцию своей геномной РНК в линейную копию двухцепочечной ДНК и впоследствии ковалентно встраивает свою геномную ДНК в геном хозяина. Иллюстративные ретровирусы, подходящие для использования в некоторых вариантах осуществления изобретения, включают, но не ограничиваются ими: вирус мышинного лейкоза Молони (M-MuLV), вирус мышинной саркомы Молони (MoMSV), вирус мышинной саркомы Харви (HaMuSV), вирус опухоли молочной железы мыши (MuMTV), вирус лейкоза обезьян гиббонов (GaLV), вирус лейкоза кошек (FLV), спумавирус, вирус мышинного лейкоза Френда, вирус стволовых клеток мыши (MSCV), вирус саркомы Руса (RSV) и лентивирусы.

**[0232]** Используемый в настоящем документе термин «лентивирус» относится к группе (или роду) сложных ретровирусов. Иллюстративные примеры лентивирусов включают, но не ограничиваются ими: ВИЧ (вирус иммунодефицита человека, включая ВИЧ типа 1 и ВИЧ типа 2); вирус висна-маэди (VMV); вирус козьего артрита-энцефалита (CAEV); вирус инфекционной анемии у лошадей (EIAV); вируса иммунодефицита кошек (FIV); вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV); и вирус иммунодефицита обезьян (SIV).

**[0233]** Термин «вектор» используется в настоящем документе для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить или транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты. Перенесенная нуклеиновая кислота обычно связана с молекулой векторной нуклеиновой кислоты, например, вставлена в нее. Вектор может включать последовательности, которые направляют автономную репликацию в клетке, или могут включать последовательности, достаточные для обеспечения интеграции в ДНК клетки-хозяина. Пригодные векторы включают, например, плазмиды (например, ДНК-плазмиды

или РНК-плазмиды), транспозоны, космиды, бактериальные искусственные хромосомы и вирусные векторы. Пригодные вирусные векторы включают, например, дефектные ретровирусы репликации и лентивирусы.

**[0234]** Как будет очевидно специалисту в данной области, термин «вирусный вектор» широко используется для обозначения либо молекулы нуклеиновой кислоты (например, плазида переноса), которая включает в себя нуклеотидные элементы, полученные из вируса, которые обычно облегчают перенос молекулы нуклеиновой кислоты или интеграции в геном клетки или в вирусную частицу, которая опосредует перенос нуклеиновых кислот. Вирусные частицы, как правило, включают различные вирусные компоненты, а иногда и компоненты клеток-хозяев в дополнение к нуклеиновой кислоте (-ам).

**[0235]** Термин «вирусный вектор» может относиться либо к вирусу, либо вирусной частице, способной переносить нуклеиновую кислоту в клетку или к самой переносимой нуклеиновой кислоте. Вирусные векторы и плазмиды переноса содержат структурные и/или функциональные генетические элементы, которые в основном происходят из вируса. Термин «ретровирусный вектор» относится к вирусному вектору или плазмиде, содержащей структурные и функциональные генетические элементы или их части, которые в основном происходят из ретровируса. Термин «лентивирусный вектор» относится к вирусному вектору или плазмиде, содержащей структурные и функциональные генетические элементы или их части, включая LTR, которые в основном происходят из лентивируса. Термин «гибридный вектор» относится к вектору, LTR или другой нуклеиновой кислоте, содержащей ретровирусные, например лентивирусные, последовательности и неретровирусные вирусные последовательности. В одном варианте осуществления гибридный вектор относится к вектору или плазмиде переноса, содержащей ретровирусные, например лентивирусные, последовательности для обратной транскрипции, репликации, интеграции и/или упаковки.

**[0236]** В некоторых вариантах осуществления термины «лентивирусный вектор», «лентивирусный экспрессионный вектор» можно использовать для обозначения лентивирусных плазмид и/или инфекционных лентивирусных частиц. При упоминании в настоящем документе элементов, таких как сайты клонирования, промоторы, регуляторные элементы, гетерологичные нуклеиновые кислоты и т. д., следует понимать, что последовательности этих элементов присутствуют в форме РНК в лентивирусных частицах согласно настоящему изобретению и присутствуют в форме ДНК в ДНК-плазмидах согласно настоящему изобретению. В одном варианте осуществления,

описанном в настоящем документе, вектор экспрессии представляет собой лентивирусный экспрессионный вектор.

**[0237]** На каждом конце провируса находятся структуры, называемые «длинными концевыми повторами» или «LTR». Термин «длинный концевой повтор (LTR)» относится к доменам пар оснований, расположенным на концах ретровирусных ДНК, которые в контексте естественных последовательностей являются прямыми повторами и содержат области U3, Rand U5. LTR по существу выполняют функции, имеющие фундаментальное значение для экспрессии ретровирусных генов (например, продвижение, инициация и полиаденилирование транскриптов генов) и вирусной репликации. LTR содержит множество регуляторных сигналов, включая элементы контроля транскрипции, сигналы полиаденилирования и последовательности, необходимые для репликации и интеграции вирусного генома. Вирусный LTR разделен на три области, называемые U3, R и U5. Область U3 содержит энхансеры и промоторные элементы. Область U5 представляет собой последовательность между сайтом связывания праймера и областью R и содержит последовательность полиаденилирования. Область R (повтор) фланкирована областями U3 и U5. LTR состоит из областей U3, R и U5 и появляется как на 5', так и на 3'-конце вирусного генома. Рядом с 5' LTR находятся последовательности, необходимые для обратной транскрипции генома (сайт связывания праймера с тРНК) и для эффективной упаковки вирусной РНК в частицы (сайт Psi).

**[0238]** Используемый в настоящем документе термин «сигнал упаковки» или «последовательность упаковки» относится к последовательностям, расположенным в ретровирусном геноме, которые необходимы для вставки вирусной РНК в вирусный капсид или частицу, см., например, Clever et al., 1995. J of Virology, Vol. 69, No. 4; pp. 2101–2109. Некоторые ретровирусные векторы используют минимальный сигнал упаковки (также называемый последовательностью psi [Ψ]), необходимый для инкапсидации вирусного генома. Таким образом, в данном документе термины «последовательность упаковки», «сигнал упаковки», «psi» и символ «Ψ» используют для обозначения некодирующей последовательности, необходимой для инкапсидации нитей ретровирусной РНК во время формирования вирусной частицы.

**[0239]** В различных вариантах осуществления векторы содержат модифицированные 5' LTR и/или 3' LTR. Любой или оба из LTR могут содержать одну или более модификаций, включая, без ограничений, одну или более делеций, вставок или замен. Модификации 3'-LTR часто выполняют для улучшения безопасности лентивирусных или ретровирусных систем, делая вирусы репликативно-дефектными. Используемый в настоящем документе термин «репликативно-дефектный» относится к вирусу, который не способен к полной,



эффективной репликации, так что инфицирующие вирионы не продуцируются (например, репликативно-дефектное лентивирусное потомство). Термин «репликационно-компетентный» относится к вирусу дикого типа или мутантному вирусу, который способен к репликации, так что вирусная репликация вируса способна продуцировать инфекционные вирионы (например, репликационно-компетентное лентивирусное потомство).

**[0240]** Под «самоинактивирующимися» (SIN) векторами подразумевают репликативно-дефектные векторы, например ретровирусные или лентивирусные векторы, в которых правая (3') энхансер-промоторная область LTR, известная как область U3, была изменена (например, путем делеции или замены), чтобы предотвратить вирусную транскрипцию после первого раунда вирусной репликации. Это связано с тем, что правая (3') LTR U3 область используется в качестве шаблона для левой (5') LTR U3 области во время вирусной репликации, и, таким образом, вирусный транскрипт не может быть создан без U3 энхансера-промотора. В дополнительном варианте осуществления изобретения 3'LTR модифицируется таким образом, что область U5 заменяется, например, идеальной последовательностью поли(A). Следует отметить, что в настоящем документе также рассматриваются модификации LTR, такие как модификации 3'LTR, 5'LTR или как 3', так и 5'LTR.

**[0241]** Дополнительное повышение безопасности обеспечивается заменой U3-области 5'LTR на гетерологичный промотор для управления транскрипцией вирусного генома во время продуцирования вирусных частиц. Примеры гетерологичных промоторов, которые могут быть использованы, включают, например, промоторы вируса обезьян 40 (SV40) (например, ранний или поздний), цитомегаловируса (CMV) (например, немедленный ранний), вирус мышинового лейкоза Молони (MoMLV), вируса саркомы Руса (RSV) и вируса простого герпеса (HSV) (тимидин-киназа). Типичные промоторы способны управлять высокими уровнями транскрипции независимым от Tat способом. Такая замена снижает вероятность рекомбинации для создания репликационно-компетентного вируса, поскольку в системе производства вирусов нет полной последовательности U3. В определенных вариантах осуществления гетерологичный промотор обладает дополнительными преимуществами для контроля способа транскрипции вирусного генома. Например, гетерологичный промотор может быть индуцибельным, так что транскрипция всего или части вирусного генома будет происходить только при наличии индукционных факторов. Индукционные факторы включают, без ограничений, одно или более химических соединений или физиологических состояний, таких как температура или pH, в которых культивируют клетки-хозяева.

**[0242]** В некоторых вариантах осуществления вирусные векторы содержат элемент TAR. Термин «TAR» относится к генетическому элементу «реакция трансактивации», расположенному в R-области лентивирусных (например, ВИЧ) LTR. Этот элемент взаимодействует с генетическим элементом лентивирусного транс-активатора (tat) для усиления вирусной репликации.

**[0243]** Под «областью R» понимается область в ретровирусных LTR, начинающаяся с начала кэппинговой группы (т. е. начала транскрипции) и заканчивающаяся непосредственно перед началом тракта поли-А. Область R также определяется как фланкированная областями U3 и U5. Область R играет роль во время обратной транскрипции при разрешении на перенос зарождающейся ДНК из одного конца генома в другой.

**[0244]** Используемый в настоящем документе термин «элемент FLAP» относится к нуклеиновой кислоте, последовательность которой включает центральный полипуриновый тракт и центральные терминирующие последовательности (сРРТ и СТС) и включает центральный полипуриновый тракт и центральные терминирующие последовательности (сРРТ и СТС) ретровируса, например, ВИЧ-1 или ВИЧ-2. Подходящие элементы FLAP описаны в патенте США № 6,682,907 и в Zennou, et al., 2000, Cell, 101: 173. Во время обратной транскрипции ВИЧ-1 центральная инициация плюс-цепи ДНК на центральном полипуриновом тракте (сРРТ) и центральная терминация на центральной терминирующей последовательности (СТС) приводят к образованию трехцепочечной структуры ДНК — центрального флэпа ДНК ВИЧ-1. Без ограничений, накладываемых какой-либо теорией, флэп ДНК может выступать в качестве цис-активной детерминанты ядерного импорта лентивирусного генома и/или может повышать титр вируса.

**[0245]** В одном варианте осуществления ретровирусные или лентивирусные векторы переноса содержат один или более элементов экспорта. Термин «элемент экспорта» относится к цис-действующему посттранскрипционному регуляторному элементу, который регулирует перенос РНК-транскрипта из ядра в цитоплазму клетки. Примеры элементов экспорта РНК включают, но не ограничиваются ими, элемент обр. ответа (RRE) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) (see e.g., Cullen et al., 1991. J Virol. 65: 1053; и Cullen et al., 1991. Cell 58: 423) и посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита В (HPRE). Как правило, элемент экспорта РНК размещается в 3' UTR гена и может быть вставлен в одной или нескольких копиях.

**[0246]** В других вариантах осуществления экспрессия гетерологичных последовательностей в вирусных векторах усиливается за счет включения в векторы

посттранскрипционных регуляторных элементов, эффективных сайтов полиаденилирования и, необязательно, сигналов терминации транскрипции в векторы. Различные посттранскрипционные регуляторные элементы могут повышать экспрессию гетерологичной нуклеиновой кислоты в белке, например, посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита (WPRE; Zufferey et al., 1999, *J Virol.*, 73:2886); посттранскрипционный регуляторный элемент, присутствующий в вирусе гепатита В (HPRE) (Huang et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5:3864); и т. п. (Liu et al., 1995, *Genes Dev.*, 9:1766).

**[0247]** В некоторых вариантах осуществления векторы могут включать регуляторные олигонуклеотиды, обладающие транскрипционной или трансляционной регуляторной активностью. Такой олигонуклеотид может быть использован в различных конфигурациях экспрессии генов для регулирования контроля экспрессии. Олигонуклеотид, регулирующий транскрипцию, может повышать (усиливать) или понижать (заглушать) уровень экспрессии рекомбинантного экспрессионного конструкта. Регуляторные олигонуклеотиды могут избирательно регулировать экспрессию контекстно-специфическим образом, в том числе, например, для обеспечения тканеспецифической, специфической для стадии развития или тому подобной экспрессии полинуклеотида, включая конститутивную или индуцибельную экспрессию. Регуляторный олигонуклеотид по настоящему описанию также может быть компонентом вектора экспрессии или рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты, включающей регуляторный олигонуклеотид, оперативно связанный с экспрессируемым полинуклеотидом. Регуляторный элемент может иметь различную длину — от нескольких нуклеотидов до нескольких сотен нуклеотидов.

**[0248]** Элементы, направляющие эффективную терминацию и полиаденилирование транскриптов гетерологичных нуклеиновых кислот, повышают экспрессию гетерологичных генов. Сигналы терминации транскрипции обычно находятся ниже сигнала полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления векторы содержат 3' последовательности полиаденилирования полинуклеотида, кодирующего экспрессируемый полипептид. Используемый в настоящем документе термин «сайт поли-А» или «последовательность поли-А» обозначает последовательность ДНК, которая направляет как терминацию, так и полиаденилирование зарождающегося РНК-транскрипта РНК-полимеразой II. Последовательности полиаденилирования могут способствовать стабильности мРНК за счет добавления поли-А хвоста к 3' концу кодирующей последовательности и, таким образом, вносить вклад в повышение эффективности трансляции. Эффективное полиаденилирование рекомбинантного транскрипта желательно, поскольку транскрипты, лишенные поли-А-хвоста, нестабильны

и быстро разрушаются. Иллюстративные примеры сигналов поли-А, которые могут быть использованы в векторе по настоящему описанию, включают идеальную последовательность поли-А (например, ААТAAA, АТТAAA, АGТAAA), последовательность поли-А бычьего гормона роста (BGHrA), последовательность поли-А β-глобина кролика (rβgrA) или другую подходящую гетерологичную или эндогенную последовательность поли-А, известную в данной области.

**[0249]** В данном документе также описаны нуклеиновые кислоты, оптимизированные по кодонам. «Оптимизированная по кодонам» нуклеиновая кислота относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая была изменена таким образом, что кодоны являются оптимальными для экспрессии в конкретной системе (такой как конкретный вид или группа видов). Например, нуклеотидная последовательность может быть оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих или в конкретных видах млекопитающих (таких как клетки человека) путем замены по меньшей мере одного, более одного или значительного количества кодонов нативной последовательности кодомами, которые чаще или более часть используются в генах этого вида. Оптимизация кодонов не изменяет аминокислотную последовательность кодируемого белка.

**[0250]** Оптимизированные по кодомам нуклеотидные последовательности могут обеспечивать улучшенные свойства, связанные с эффективностью экспрессии. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК, подлежащая транскрипции, может быть оптимизирована для облегчения более эффективной транскрипции и/или трансляции. В некоторых вариантах осуществления последовательность ДНК может быть оптимизирована в отношении цис-регуляторных элементов (например, ТАТА-бокса, сигналов терминации и сайтов связывания белков), сайтов искусственной рекомбинации, *chi* сайтов, содержания CpG динуклеотидов, отрицательных CpG островов, содержания GC, сайтов проскальзывания полимеразы и/или других элементов, имеющих отношение к транскрипции; последовательность ДНК может быть оптимизирована в отношении криптоических сайтов сплайсинга, вторичной структуры мРНК, стабильной свободной энергии мРНК, повторяющихся последовательностей, домена нестабильности РНК и/или других элементов, имеющих отношение к процессингу и стабильности мРНК; последовательность ДНК может быть оптимизирована в отношении смещения использования кодонов, адаптивности кодонов, внутренних сайтов *chi*, сайтов связывания рибосом (например, IRES), преждевременных сайтов полиА, последовательностей Шайна — Дальгарно (SD) и/или других элементов, имеющих отношение к трансляции; и/или последовательность ДНК может быть оптимизирована в отношении контекста кодонов, взаимодействия кодонов и антикодонов,

сайтов трансляционной паузы и/или других элементов, имеющих отношение к укладке белка.

**[0251]** Векторы могут содержать один или несколько LTR, при этом любой LTR включает одну или более модификаций, например одну или более нуклеотидных замен, добавлений или делеций. Векторы могут дополнительно включать один или несколько вспомогательных элементов для повышения эффективности трансдукции (например, cPPT /FLAP), вирусной упаковки (например, сигнал упаковки Psi ( $\Psi$ ), RRE) и/или другие элементы, повышающие экспрессию терапевтического гена (например, поли (A) последовательности), и могут дополнительно включать WPRE или HPRE. Специалисту в данной области будет понятно, что многие другие различные варианты осуществления могут быть созданы на основе существующих вариантов осуществления изобретения.

**[0252]** «Клетка-хозяин» включает клетки, трансфицированные, инфицированные или трансдуцированные *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro* с рекомбинантным вектором или полинуклеотидом согласно настоящему изобретению. Клетки-хозяева могут включать упаковывающие клетки, продуцирующие клетки и клетки, инфицированные вирусными векторами. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, инфицированные вирусным вектором по настоящему изобретению, вводят субъекту, нуждающемуся в терапии. В определенных вариантах осуществления термин «клетка-мишень» используется взаимозаменяемо с клеткой-хозяином и относится к трансфицированным, инфицированным или трансдуцированным клеткам желаемого типа клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка-мишень представляет собой Т-клетку.

**[0253]** Для достижения приемлемого титра вируса часто необходимо получение вирусной частицы большого масштаба. Вирусные частицы получают путем трансфекции вектора переноса в линию упаковывающей клетки, которая содержит вирусные структурные и/или вспомогательные гены, например gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx или nef или другие ретровирусные гены.

**[0254]** Используемый в настоящем документе термин «упаковывающий вектор» относится к вектору экспрессии или вирусному вектору, который не содержит упаковывающего сигнала и содержит полинуклеотид, кодирующий один, два, три, четыре или более вирусных структурных и/или вспомогательных генов. Как правило, упаковывающие векторы включены в упаковывающую ячейку и вводятся в клетку посредством трансфекции, трансдукции или инфекции. Способы трансфекции, трансдукции или инфекции хорошо известны специалистам в данной области. Ретровирусный/лентивирусный вектор переноса по настоящему изобретению может быть введен в упаковывающую линию клеток, посредством трансфекции, трансдукции или

инфекции для получения продуцирующей клетки или клеточной линии. Упаковывающие векторы по настоящему изобретению могут быть введены в клетки человека или клеточные линии обычными способами, включая, например, трансфекцию фосфата кальция, липофекцию или электропорацию. В некоторых вариантах осуществления упаковывающие векторы вводят в клетки вместе с доминантным селективным маркером, таким как неомицин, гигромицин, пурамицин, бластоцидин, зеоцин, тимидинкиназа, DHFR, Gln-синтетаза или ADA, с последующей селекцией в присутствии соответствующего препарата и выделением клонов. Селективный маркерный ген может быть физически связан с генами, кодируемыми упаковывающим вектором, например, с помощью IRES или саморасщепляющихся вирусных пептидов.

[0255] Белки вирусной оболочки (*env*) определяют диапазон клеток-хозяев, которые в конечном итоге могут быть инфицированы и трансформированы рекомбинантными ретровирусами, полученными из клеточных линий. В случае лентивирусов, таких как ВИЧ-1, ВИЧ-2, SIV, FIV и EIV, белки *env* включают *gp41* и *gp120*. В некоторых вариантах осуществления вирусные белки *env*, экспрессируемые упаковочными клетками согласно настоящему изобретению, кодируются на отдельном векторе из вирусных генов *gag* и *pol*, как было описано ранее.

[0256] Иллюстративные примеры ретровирусных генов *env*, которые могут быть использованы в описанных в настоящем документе вариантах осуществления, включают, но не ограничиваются ими: оболочки MLV, оболочки IOAI, BAEV, FeLV-B, RDI 14, SSAV, вируса эболы, вируса Сендай, FPV (вирус чумы птиц) и оболочки вируса гриппа. Аналогичным образом можно использовать гены, кодирующие оболочки РНК-вирусов (например, семейства РНК-вирусов *Picomaviridae*, *Calciviridae*, *Astroviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Coronaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Arenaviridae*, *Reoviridae*, *Bimaviridae*, *Retroviridae*), а так же ДНК-вирусов (семейства *Hepadnaviridae*, *Circoviridae*, *Parvoviridae*, *Papovaviridae*, *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Poxyviridae* и *Iridoviridae*). Иллюстративные примеры включают FeLV, VEE, HFVW, WDSV, SFV, вирус бешенства, ALV, BIV, BL V, EBV, CAEV, SNV, ChTL V, STL V, MPMV SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CTIO и EIAV.

[0257] В других вариантах осуществления изобретения белки оболочки для псевдотипирования вируса по настоящему описанию включают, без ограничения, любой из следующих вирусов: вирус гриппа А, такой как H1N1, H1N2, H3N2 и H5N1 (птичий грипп), вирус гриппа В, вирус гриппа С, вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус гепатита D, вирус гепатита Е, ротавирус, любой вирус из группы вирусов Норвалка, кишечные аденовирусы, парвовирус, вирус лихорадки Денге, оспа

обезьян, мононегавирусы, лиссавирусы, такие как вирус бешенства, вирус летучих мышей Лагоса, вирус Мокола, вирус Дювенхаге, вирус летучих мышей европейского типа 1 и 2 и вирус австралийской летучей мыши, эфемеровирус, везикуловирус, вирус везикулярного стоматита (VSV), вирусы герпеса, такие как вирус простого герпеса типов 1 и 2, ветряной оспы, цитомегаловирус, вирус Эпштейна — Барр (EBV), герпесвирусы человека (HHV), герпесвирусы человека типов 6 и 8, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус папилломы человека, вирус мышинового гамма-герпеса, аренавирусы, такие как вирус аргентинской геморрагической лихорадки, вирус боливийской геморрагической лихорадки, вирус геморрагической лихорадки, ассоциированной с Сабией, вирус венесуэльской геморрагической лихорадки, Вирус лихорадки Ласса, вирус Мачупо, вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), *Bunyaviridae*, такие как вирус геморрагической лихорадки Крым-Конго, хантавирус, вирус, вызывающий геморрагическую лихорадку с почечным синдромом, вирус лихорадки долины Рифт, *Filoviridae* (филовирусы), включая геморрагическую лихорадку Эбола и геморрагическую лихорадку Марбург, *Flaviviridae*, включая вирус лесной болезни Кайсанур, вирус Омской геморрагической лихорадки, вирус, вызывающий клещевой энцефалит, и *Paramyxoviridae*, такие как вирус Хендра и вирус Нипах, вирус оспы, альфавирусы, такие как вирус венесуэльского энцефалита, вирус восточного энцефалита, вирус западного энцефалита, SARS-ассоциированный коронавирус (SARS-CoV), вирус Западного Нила, или любой вирус, вызывающий энцефалит.

**[0258]** Термины «псевдототип» или «псевотипирование», используемые в настоящем документе, относятся к вирусу, у которого белки оболочки были замещены такими белками другого вируса, обладающего другими характеристиками. Например, ВИЧ может быть псевдотипирован белками оболочки G-протеина вируса везикулярного стоматита (VSV-G), что позволяет ВИЧ инфицировать более широкий круг клеток, поскольку белки оболочки ВИЧ (кодируемые геном *env*) обычно направляют вирус на клетки, представляющие CD4+.

**[0259]** Используемый в настоящем документе термин «упаковывающие клеточные линии» используется в отношении клеточных линий, которые не содержат упаковывающего сигнала, но стабильно или временно экспрессируют вирусные структурные белки и ферменты репликации (например, *gag*, *pol* и *env*), которые необходимы для правильной упаковки вирусных частиц. Для получения упаковывающих клеточных линий по настоящему изобретению можно использовать любую подходящую линию клеток. Как правило, клетки представляют собой клетки млекопитающих. В другом варианте осуществления клетки, используемые для получения упаковывающей

клеточной линии, представляют собой клетки человека. Подходящие линии клеток, которые можно использовать для получения упаковывающей клеточной линии, включают, например, клетки CHO, клетки ВНК, клетки MDCK, клетки СЗН 10Т1/2, клетки FLY, клетки Psi-2, клетки BOSC 23, клетки Р А317, клетки WENI, клетки COS, клетки BSC 1, клетки BSC 40, клетки BMT 10, клетки VERO, клетки W138, клетки MRC5, клетки A549, клетки НТ1080, клетки 293, клетки 293Т, клетки В-50, клетки 3Т3, клетки НИЗТ3, клетки НерG2, клетки Saos-2, клетки Нuh7, клетки HeLa, клетки W163, клетки 211 и клетки 211А.

**[0260]** Используемый в настоящем документе термин «клеточная линия-производитель» относится к клеточной линии, которая способна продуцировать рекомбинантные ретровирусные частицы, содержащие упаковывающую клеточную линию и конструкт вектора переноса, содержащий упаковывающий сигнал. Получение инфекционных вирусных частиц и вирусных маточных растворов можно осуществлять с использованием традиционных методов. Способы получения маточных вирусных растворов известны в данной области и проиллюстрированы, например, в Y. Soneoka et al. (1995) Nucl. Acids Res. 23:628–633, and N. R. Landau et al. (1992) J Virol. 66:5110–5113. Инфекционные вирусные частицы могут быть собраны из упаковывающих клеток с использованием традиционных методик. Например, инфекционные частицы могут быть собраны путем лизиса клеток или сбора супернатанта клеточной культуры, известных в данной области. При необходимости собранные вирусные частицы могут быть необязательно очищены. Подходящие методики очистки хорошо известны специалистам в данной области.

**[0261]** Доставка гена(ов) или другой полинуклеотидной последовательности с помощью ретровирусного или лентивирусного вектора посредством вирусной инфекции, а не путем трансфекции, называется «трансдукцией». В одном варианте осуществления ретровирусные векторы трансдуцируются в клетку посредством инфекции и интеграции провируса. В определенных вариантах осуществления клетка-мишень, например Т-клетка или НК-клетка, является «трансдуцированной», если она содержит ген или другую полинуклеотидную последовательность, доставленную в клетку при заражении с помощью вирусного или ретровирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления трансдуцированная клетка содержит один или более генов или других полинуклеотидных последовательностей, доставляемых ретровирусным или лентивирусным вектором в ее клеточный геном.

**[0262]** Описаны клетки-хозяева, экспрессирующие один или более конструкт согласно настоящему изобретению. Клетки-хозяева могут быть трансдуцированы одним или более вирусными векторами, содержащими нуклеотидные последовательности, кодирующие



один или более полипептидов, экспрессирующих сконструированный TCR и/или CAR. Другие способы, относящиеся к применению вирусных векторов в генной терапии, которые можно использовать в соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего описания, можно найти, например, в Kay, M.A. (1997) *Chest* 111(6 Supp.): 138S–142S; Ferry, N. and Heard, J.M. (1998) *Hum. Gene Ther.* 9:1975–81; Shiratory, Y. et al., (1999) *Liver* 19:265–74; Oka, K. et al., (2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11:179–86; Thule, P. M. and Liu, J.M. (2000) *Gene Ther.* 7:1744–52; Yang, N. S. (1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:335–56; Alt, M. (1995) *J Hepatol.* 23:746–58; Brody, S. L. and Crystal, R.G. (1994) *Ann. NY Acad. Sci.* 716:90–101; Strayer, D.S. (1999) *Expert Opin. Investig. Drugs* 8:2159–2172; Smith–Arica, J. R. and Bartlett, J. S. (2001) *Curr. Cardiol. Rep.* 3:43–49; and Lee, H. C. et al., (2000) *Nature* 408:483–8.

**[0263]** Композиции, описанные в настоящем документе, могут содержать один или более полинуклеотидов, полипептидов, векторов, содержащих их, и Т-клеточные композиции и НК-композиции, как предусмотрено в настоящем документе. Один вариант осуществления, описанный в настоящем документе, представляет собой композицию, содержащую модифицированную Т-клетку, которая экспрессирует GPC3-связывающий TCR и/или CAR. Другой вариант осуществления, описанный в настоящем документе, представляет собой композицию, содержащую модифицированную НК-клетку, которая экспрессирует d GPC3-связывающий TCR и/или CAR. Композиции включают, но не ограничиваются ими, фармацевтические композиции. «Фармацевтическая композиция» относится к композиции, составленной в фармацевтически приемлемых или физиологических растворах, приемлемых для введения в клетку или животное, отдельно или в комбинации с одним или более другими способами терапии. Также следует понимать, что при необходимости композиции по настоящему изобретению можно вводить в комбинации с другими агентами, например, цитокинами, факторами роста, гормонами, малыми молекулами, химиотерапевтическими, пролекарственными средствами, лекарственными средствами, антителами или другими различными фармацевтическими активными веществами. Практически нет ограничений на другие компоненты, которые также могут быть включены в композиции, при условии, что дополнительные агенты не оказывают негативного влияния на способность композиции доставлять целевое терапевтическое средство.

**[0264]** Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в настоящем документе для обозначения соединений, материалов, композиций и/или дозированных форм, которые в рамках здравого медицинского заключения подходят для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергического

ответа или других проблем или осложнений, соразмерных с разумным соотношением польза/риск.

**[0265]** В контексте настоящего документа термин «фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент» включает, помимо прочего, любой адъювант, носитель, эксципиент, глидант, подсластитель, разбавитель, консервант, краситель, усилитель вкуса, поверхностно-активное вещество, смачивающий агент, диспергирующий агент, суспендирующий агент, стабилизатор, изотонический агент, растворитель, поверхностно-активное вещество или эмульгатор, который был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США как приемлемый для использования на людях или домашних животных. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают, но не ограничиваются ими, сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетатцеллюлоза; трагакант; солод; желатин; тальк; масло какао, воски, животные и растительные жиры, парафины, силиконы, бентониты, кремниевую кислоту, оксид цинка; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы; и другие совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

**[0266]** В одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, композиции по настоящему изобретению содержат количество модифицированных Т-клеток или НК-клеток, предусмотренных в настоящем документе. По существу, можно сказать, что фармацевтическая композиция, содержащая Т-клетки или НК-клетки, рассматриваемые в настоящем документе, может быть введена в дозе от  $10^2$  до  $10^{10}$  клеток/кг массы тела, от  $10^5$  до  $10^9$  клеток/кг массы тела, от  $10^5$  до  $10^8$  клеток/кг массы тела, от  $10^5$  до  $10^7$  клеток/кг массы тела, от  $10^7$  до  $10^9$  клеток/кг массы тела или от  $10^7$  до  $10^8$  клеток/кг массы тела, включая все целые значения в пределах этих диапазонов. Количество клеток будет зависеть от конечного применения композиции, а также от типа входящих в нее клеток. Т-клетки или НК-клетки, модифицированные для экспрессии сконструированного TCR или CAR, можно вводить многократно в дозах в пределах этих диапазонов. Клетки могут быть аллогенными, сингенными, ксеногенными или аутологичными для пациента,

проходящего терапию. При необходимости лечение может также включать введение митогенов (например, РНА) или лимфокинов, цитокинов и/или хемокинов (например, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-7, IL-15, IL-12, TNF-альфа, IL-18 и TNF-бета, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 $\alpha$  и т.д.), как описано в настоящем документе, для улучшения приживления и функционирования влитых Т-клеток.

**[0267]** Как правило, композиции, включающие активированные и расширенные клетки, как описано в настоящем документе, могут быть использованы для лечения и профилактики заболеваний, возникающих у людей с ослабленным иммунитетом или иммуносупрессией. В некоторых случаях композиции, включающие модифицированные Т-клетки или НК-клетки, рассматриваемые в настоящем документе, используются для лечения раковых заболеваний. Модифицированные Т-клетки или НК-клетки, описанные в настоящем документе, можно вводить либо отдельно, либо в виде фармацевтической композиции в сочетании с носителями, разбавителями, вспомогательными веществами и/или с другими компонентами, такими как IL-2, IL-7 и/или IL-15 или другие цитокины или клеточные популяции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, рассматриваемые в настоящем документе, включают определенное количество генетически модифицированных Т-клеток или НК-клеток в сочетании с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами.

**[0268]** Фармацевтические композиции, включающие модифицированные Т-клетки или НК-клетки, рассматриваемые в настоящем документе, могут дополнительно включать буферы, такие как нейтральный буферный солевой раствор, фосфатно-буферный солевой раствор и тому подобное; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстран, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Композиции по настоящему описанию могут быть предназначены для парентерального введения, например внутрисосудистого (внутривенного или внутриартериального), внутрибрюшинного или внутримышечного введения.

**[0269]** Жидкие фармацевтические композиции, будь то растворы, суспензии или другие подобные формы, могут включать одно или более из следующего: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, такой как физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, фиксированные масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить в качестве растворителя или суспендирующей среды, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие

растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для корректировки тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы, изготовленные из стекла или пластика. Также включены стерильные инъекционные фармацевтические композиции.

**[0270]** В некоторых вариантах осуществления композиции, рассматриваемые в настоящем документе, содержат эффективное количество расширенной модифицированной композиции Т-клеток или НК-клеток, отдельно или в комбинации с одним или более терапевтическими агентами. Таким образом, композиции Т-клеток или НК-клеток можно вводить отдельно или в комбинации с другими известными видами лечения рака, такими как лучевая терапия, химиотерапия, трансплантация, иммунотерапия, гормональная терапия, фотодинамическая терапия и т. д. Композиции также можно вводить в комбинации с антибиотиками и противовирусными агентами. Такие терапевтические агенты могут быть приняты в данной области в качестве лечения болезненного состояния, как описано в настоящем документе, такого как рак. В одном варианте осуществления композиции, рассматриваемые в настоящем документе, также можно вводить с ингибиторами TGF- $\beta$ , например низкомолекулярным ингибитором LY55299. Примеры предполагаемых терапевтических агентов включают цитокины, факторы роста, стероиды, NSAID, DMARD, противовоспалительные, химиотерапевтические, радиотерапевтические, терапевтические антитела или другие активные и вспомогательные агенты.

**[0271]** В определенных вариантах осуществления композиции, включающие Т-клетки или НК-клетки, рассматриваемые в настоящем документе, могут применяться в сочетании с любым количеством химиотерапевтических агентов. Иллюстративные примеры химиотерапевтических агентов включают в себя, без ограничений, алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамида, триэтилентифосфорамида и триметилломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид мехлорэтамину оксида, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урацил иприт; нитромочевинны, такие как кармустин, хлорзотоцин,

фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабин, карминомицин, карзинофиллин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиروмицин, пурамицин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птерофтерин, триметотрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, энцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, угнетающие функцию надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; восполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминоклевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; эльформитин; эллиптиния ацетат; этоглюцид; галлия нитрат; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид (Ara-C); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например паклитаксел (TAXOL®, Bristol–Myers Squibb Oncology, г. Принстон, штат Нью-Джерси) и доксетаксел (TAXOTERE®, Rhone–Poulenc Roger, г. Антони, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, например, цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навельбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RPS 2000; дифформетилметин (DMFO); производные ретиноевой кислоты, такие как Targretin™ (бексаротен), Panretin™ (алитретиноин); ONTAK™ (денилейкин дифтитокс); эсперамицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из вышеперечисленных. В это определение также включены антигормональные агенты, действие которых направлено на регулирование или ингибирование действия гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен,

ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Fareston); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из вышеперечисленных.

**[0272]** Различные другие терапевтические средства могут быть использованы в сочетании с композициями, описанными в данном документе. В одном варианте осуществления композиция, содержащая Т-клетки, вводится с противовоспалительным агентом. Противовоспалительные средства или лекарственные средства включают, без ограничения, стероиды и глюкокортикоиды (включая бетаметазон, будесонид, дексаметазон, ацетат гидрокортизона, гидрокортизон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон, преднизон, триамцинолон), нестероидные противовоспалительные средства (НПВП), включая аспирин, ибупрофен, напроксен, метотрексат, сульфасалазин, лефлуномид, лекарственные против TNF, циклофосфамид и микофенолат.

**[0273]** В некоторых вариантах осуществления НПВП выбирают из группы, состоящей из ибупрофена, напроксена, напроксена натрия, ингибиторов ЦОГ-2, таких как VIOXX® (рофекоксиб) и CELEBREX® (целекоксиб), и сиалилатов. Иллюстративные анальгетики выбраны из группы, состоящей из ацетаминофена, оксикодона, трамадола или гидрохлорида пропороксифенена. Примеры глюкокортикоидов выбраны из группы, состоящей из кортизона, дексаметазона, гидрокортизона, метилпреднизолона, преднизолона или преднизона. Иллюстративные модификаторы биологического ответа включают молекулы, направленные против маркеров клеточной поверхности (например, CD4, CD5 и т.д.), ингибиторы цитокинов, такие как антагонисты TNF (например, этанерцепт (ENBREL®), адалимумаб (HUMIRA®) и инфликсимаб (REMICADE®), ингибиторы хемокинов и ингибиторы молекул адгезии. Модификаторы биологического ответа включают моноклональные антитела, а также рекомбинантные формы молекул. Примеры болезнь-модифицирующих антиревматических препаратов (DMARD) включают азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, метотрексат, пеницилламин, лефлуномид, сульфасалазин, гидроксихлорохин, золото (перорально (ауранофин) и внутримышечно) и миноциклин.

**[0274]** В других вариантах осуществления терапевтические антитела, подходящие для комбинации с CAR или TCR-модифицированными Т-клетками или NK-клетками, рассматриваемыми в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, абаговомаб, адекатумумаб, афутузумаб, алемтузумаб, алтумумаб, аматуксимаб, анатумумаб, аркитумумаб, бавитуксимаб, бектумумаб, бевацизумаб, биватузумаб, блинатумумаб, брентуксимаб, кантузумаб, катумаксамаб, цетуксимаб, цитатузумаб,

циксутомумаб, кливатузумаб, конатумомумаб, даратумомумаб, дрозитумаб, дулиготумаб, дусигитумаб, детумомаб, дацетузумаб, далотузумаб, экромексимаб, элотузумаб, энситуксимаб, эртумаксомаб, этарацизумаб, фариетузумаб, фиклатузумаб, фигитумаб, фланвотумаб, футуксимаб, ганитумаб, гемтузумаб, гирентуксимаб, глембатумаб, ибритумомаб, иговомаб, имгатузумаб, индатуксимаб, инотузумаб, интетумумаб, ипилимумаб, иратумумаб, лабетузумаб, лексатумомумаб, линтузумаб, лорвотузумаб, лукатумомумаб, мапатумомумаб, матузумаб, милатузумаб, минретумомаб, митумомаб, моксетумомаб, наматумаб, наптумомаб, нецитумомаб, нимотузумаб, нофетумомаб, окаратузумаб, офатумомумаб, оларатумаб, онартузумаб, опортузумаб, ореговомаб, панитумумаб, парсатузумаб, патритумаб, пемтумомаб, пертузумаб, пинтумомаб, притумумаб, ракотумомаб, радретумаб, рилотумумаб, ритуксимаб, робатумомумаб, сатумомаб, сибротузумаб, силтуксимаб, симтузумаб, солитомаб, такатузумаб, таплитумомаб, тенатумомаб, тепротумумаб, тигатузумаб, тоситумомаб, трастузумаб, тукотузумаб, ублитуксимаб, велтузумаб, ворсетузумаб, вотумумаб, залутумумаб, СС49 и 3F8.

**[0275]** В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, вводят в сочетании с цитокином. В контексте данного документа термин «цитокин» является общим термином для белков, высвобождаемых одной популяцией клеток, которые действуют на другую клетку в качестве межклеточных медиаторов. Примерами таких цитокинов являются лимфокины, монокины, хемокины и традиционные полипептидные гормоны. Цитокины включают гормоны роста, такие как гормон роста человека, N-метионилловый гормон роста человека и бычий гормон роста; паратгормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (FSH), тиреотропный гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); фактор роста печени; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор некроза опухоли-альфа и -бета; мюллеров ингибирующий фактор; мышинный гонадотропин-ассоциированный пептид; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов; интегрин; тромбопоэтин (TPO); факторы роста нервов, такие как NGF-бета; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF-альфа и TGF-бета; инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоэтин (EPO); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон-альфа, бета и гамма; колониестимулирующие факторы (CSF), такие как макрофагальный CSF (M-CSF); гранулоцитарно-макрофагальный CSF (GM-CSF); и гранулоцитарный CSF (G-CSF); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10,

IL-11, IL-12; IL-15, фактор некроза опухоли, такой как TNF- $\alpha$  or TNF- $\beta$ ; и другие полипептидные факторы, включая лиганд LIF и лиганд kit (KL). В контексте данного документа термин «цитокин» включает белки из природных источников или из культуры рекомбинантных клеток и биологически активные эквиваленты цитокинов нативной последовательности.

[0276] Любая клетка может быть использована в качестве клетки-хозяина для полинуклеотидов, векторов или полипептидов согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления клетка может представлять собой прокариотическую клетку, грибковую клетку, дрожжевую клетку или более высокие эукариотические клетки, такие как клетка млекопитающего. Подходящие прокариотические клетки включают, без ограничений, эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например *Enterobacterales*, такие как *Escherichia*, например *E. coli*; *Enterobacter*; *Ernani*; *Klebsiella*; *Proteus*; *Salmonella*, например *Salmonella typhimurium*; *Serratia*, например *Serratia marcescans* и *Shigella*; *Bacilli*, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis*; *Pseudomonas*, такие как *P. aeruginosa*; и *Streptomyces*. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, В-клетки, инфильтрующей опухоль лимфоцита (TIL), клетки, экспрессирующей TCR, природной клетки-киллера (NK), дендритной клетки, гранулоцита, врожденной лимфоидной клетки, мегакариоцита, моноцита, макрофага, тромбоцита, тимоцита и миелоидной клетки. В одном варианте осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку. В другом варианте осуществления иммунная клетка представляет собой NK-клетку. В определенных вариантах осуществления Т-клетка представляет собой инфильтрующий опухоль лимфоцит (TIL), аутологичную Т-клетку, сконструированную аутологичную Т-клетку (eACT™), аллогенную Т-клетку, гетерологичную Т-клетку или любую их комбинацию. В отличие от терапии антителами или только TCR- или CAR-модифицированными Т-клетками, Т-клетками (или любыми другими клетками, как описано выше).

[0277] В другом варианте осуществления описан способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение эффективного количества, например терапевтически эффективного, количества композиции, включающей Т-клетки или NK-клетки, экспрессирующие TCR или CAR, как описано в настоящем документе. Количество и частота введения препарата определяются такими факторами, как состояние



пациента, тип и тяжесть его заболевания, хотя соответствующие дозировки могут быть определены в ходе клинических исследований.

**[0278]** В других вариантах осуществления предусмотрены способы, включающие введение терапевтически эффективного количества модифицированных Т-клеток, описанных в настоящем документе, или композиции, включающей их, пациенту, нуждающемуся в этом, отдельно или в комбинации с одним или несколькими терапевтическими агентами. В определенных вариантах осуществления клетки согласно настоящему изобретению используются для лечения пациентов, подверженных риску развития рака. Таким образом, в настоящем описании предложены способы лечения или профилактики рака, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества модифицированных Т-клеток по данному описанию.

**[0279]** Специалисту в данной области будет понятно, что для достижения желаемого эффекта может потребоваться многократное введение композиций, описанных в настоящем документе. Например, композицию можно вводить 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более раз в течение 1 недели, 2 недель, 3 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 5 лет, 10 лет или более.

**[0280]** В определенных вариантах осуществления может быть желательно ввести субъекту активированные Т-клетки, а затем впоследствии провести повторный забор крови (или аферез), активировать полученные из нее Т-клетки в соответствии с настоящим описанием и повторно ввести пациенту эти активированные и размноженные Т-клетки. Этот процесс можно осуществлять несколько раз каждые несколько недель. В определенных вариантах осуществления Т-клетки могут быть активированы при заборе крови объемом от 10 до 400 куб. см. Не ограничиваясь какой-либо теорией, можно предположить, что использование этого протокола многократного забора крови / многократной повторной инфузии может служить для отбора определенных популяций Т-клеток.

**[0281]** Введение рассматриваемых в настоящем документе композиций может осуществляться любым удобным способом, в том числе путем аэрозольной ингаляции, инъекции, приема внутрь, трансфузии, имплантации или трансплантации. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят парентерально. Фразы «парентеральное введение» и «введение парентерально», используемые в настоящем документе, относятся к способам введения, отличным от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, без ограничения, внутрисосудистое, внутривенное, внутримышечное, внутриартериальное, интратекальное, интракапсулярное,

интраорбитальное, интратуморальное, внутрисердечное, внутрикожное, внутрибрюшинное, транстрахеальное, подкожное, субкутикулярное, внутрисуставное, подкапсулярное, субарахноидальное, интраспинальное и интрастернальное введение и инфузию. В одном варианте осуществления композиции, рассматриваемые в настоящем документе, вводятся субъекту путем прямой инъекции в опухоль, лимфатический узел или очаг инфекции.

**[0282]** В одном варианте осуществления субъекту, нуждающемуся в этом, вводят эффективное количество композиции для повышения клеточного иммунного ответа на рак у субъекта. Иммунный ответ может включать клеточные иммунные реакции, опосредованные цитотоксическими Т-клетками, способными убивать инфицированные клетки, регуляторными Т-клетками и хелперными Т-клетками. Также может быть индуцирован гуморальный иммунный ответ, опосредованный в основном хелперными Т-клетками, способными активировать В-клетки, что приводит к выработке антител. Для анализа типа иммунного ответа, индуцированного композициями по настоящему описанию, могут быть использованы различные методики, хорошо описанные в данной области; например, *Current Protocols in Immunology*, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.

**[0283]** В случае опосредованного Т-клетками уничтожения связывание CAR-лиганда инициирует передачу сигнала CAR в Т-клетку, что приводит к активации различных сигнальных путей Т-клетки, которые побуждают Т-клетку вырабатывать или высвобождать белки, способные вызывать апоптоз клеток-мишеней по различным механизмам. Эти механизмы, опосредованные Т-клетками, включают (но не ограничиваются ими) перенос внутриклеточных цитотоксических гранул из Т-клетки в клетку-мишень, секрецию Т-клетками провоспалительных цитокинов, которые могут вызывать гибель клеток-мишеней напрямую (или опосредованно через привлечение других эффекторных клеток-киллеров), и регуляцию лигандов рецепторов гибели (например, FasL) на поверхности Т-клетки, которые вызывают апоптоз клеток-мишеней после связывания с их родственным рецептором гибели (например, Fas) на клетке-мишени.

**[0284]** В вариантах осуществления описан способ лечения субъекта, у которого диагностирован рак, включающий извлечение Т-клеток у субъекта, генетическую модификацию указанных Т-клеток вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую GPC3-связывающий CAR, как предусмотрено в настоящем документе, с

получением популяции модифицированных Т-клеток, и введение популяции модифицированных Т-клеток тому же субъекту.

**[0285]** В определенных вариантах осуществления настоящее описание также предоставляет способы стимулирования опосредованного эффекторными клетками иммунного модулятора ответа на целевую клеточную популяцию у субъекта, включающие этапы введения субъекту иммунной эффекторной клеточной популяции, экспрессирующей конструкт нуклеиновой кислоты, кодирующий GPC3-связывающую молекулу CAR.

**[0286]** Способы введения клеточных композиций, описанных в настоящем документе, включают любой метод, который эффективен для реинтродукции *ex vivo* генетически модифицированных иммунных эффекторных клеток, которые либо непосредственно экспрессируют сконструированный CAR в субъекте, либо при реинтродукции генетически модифицированных предшественников иммунных эффекторных клеток, которые при введении субъекту дифференцируются в зрелые иммунные эффекторные клетки, экспрессирующие GPC3-связывающую молекулу CAR. Один из способов включает трансдукцию Т-клеток периферической крови *ex vivo* конструктом нуклеиновых кислот в соответствии с настоящим описанием и возвращение трансдуцированных клеток субъекту.

**[0287]** Хотя вышеизложенное изобретение было описано довольно подробно с помощью иллюстраций и примеров для ясности понимания, специалистам в данной области в контексте настоящего описания будет очевидно, что в него могут быть внесены определенные изменения и модификации без отклонения от духа или объема прилагаемой формулы изобретения. Следующие примеры приведены исключительно в качестве иллюстрации и не имеют ограничительного характера. Специалистам в данной области будет понятно множество не критических параметров, которые могут быть изменены или модифицированы для получения по существу аналогичных результатов.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1**

#### **Антитела к GPC3**

**[0288]** Мышей иммунизировали белком GPC3 для получения потенциальных гибридом. Гибридомы тестировали на связывание с различными клетками-мишенями. Клетки-мишени, используемые в данном примере и примерах ниже, были получены из Американской коллекции типовых культур (англ.: American Type Culture Collection, ATCC) (Hep3B, SkHep1, K562) или Японской коллекции исследовательских биоресурсов

(англ.: Japanese Collection of Research Bioresources, JCRB) (Huh7, JHH5). Эти линии, за исключением клеток K562, культивировали в среде DMEM (Gibco) или в среде Уильяма Е., каждая из которых дополнена 10% эмбриональной бычьей сывороткой (Corning) и смесью антибиотиков пенициллина/стрептомицина (Gibco). Клетки Hep3В экспрессируют высокие уровни GPC3 человека. Hep3В GPC3-отрицательные клетки (GPC3КО) конструировали через CRISPR КО из экзона 2 GPC3 и клонально отбирали. Эффективность нокаута GPC3 и минимальный эффект вне мишени подтверждали с помощью секвенирования и функциональных анализов. Клетки SkHep1 представляют собой GPC3-отрицательную клеточную линию. Клетки Huh7 имеют среднюю/низкую экспрессию GPC3. Родительские клетки K562 являются GPC3-отрицательными. K562 GPC3-положительные клетки конструировали для сверхэкспрессии (с использованием промотора EF1a) полного человеческого GPC3 (последовательность, доступная в идентификаторе Uniport под номером ID NO; P51654-1) с помощью трансдукции лентивирусным вектором и отбора на устойчивость к пурамицину. Белки GPC3 мыши и GPC5 человека сверхэкспрессировали аналогичным образом в клетках K562 в качестве контроля для проверки селективности/специфичности GPC3 человека. Клетки K562 культивировали в среде IMDM (Gibco) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Corning) и смеси антибиотиков пенициллина/стрептомицина (Gibco) с пурамицином или без него в концентрации 1 мкг/мл (Sigma). Родительские клетки K562, K562-GPC3 и K562-GPC5 собирали в виде клеточной суспензии. Клетки Hep3В собирали с помощью TrypLE express (Gibco) или безферментного буфера Cell Dissociation Buffer (Gibco), следуя инструкциям производителя.

**[0289]** Для определения связывания супернатантов, образующих гибридомы, клетки-мишени, как показано в таблице 9, высевали на 96-луночный планшет с U-образным дном и промывали в PBS, инкубировали с Fc-блокатором (BD Pharmingen), с разведением 1 : 50 сыворотки человека и реагентом LIVE/Dead™ Fixable Near-IR Dead-IR Dead-IR Dead (Invitrogen™) в течение 15 минут, затем промывали в PBS. Затем клетки инкубировали в течение 30 минут при 4 °C либо с супернатантом гибридомы, разведенном 4 раза в PBS, либо с контрольным антителом (HN3, Genescript; GPC3-PE, ABIN230197, Antibody Online), либо с PBS. После двух промывок в PBS все образцы, за исключением образцов с прямым конъюгированным антителом, окрашивали в течение 30 минут при 4 °C вторичным козым антимышиным антителом, конъюгированным с PE (Jackson ImmunoResearch), разведенным в 300 раз в PBS. После двух конечных промывок в PBS клетки ресуспендировали в холодном PBS и сразу же анализировали с помощью проточной цитометрии на цитометре Fortessa (Becton Dickinson). В таблице 9 показано

процентное содержание живых клеток, положительных по PE, при гейтировании на основе окрашивания отрицательного контроля PBS. Связующие вещества классифицировали по сходству на 3 категории, связующие вещества частично расщепленного GPC3, связующие вещества интактного GPC3 и связующие вещества только клеток Hep3В.

**Таблица 9. Профили связывания гибридом**

	Гибридома или первичное антитело	Процентное содержание положительных окрашенных клеток			
		Родительские K562 (контроль)	K562 GPC3+	Hep3В TrypLE	Hep3В CDB
Отрицательный контроль	PBS	0,1	0,1	1,5	2,1
Связующие вещества частично расщепленного GPC3	mAb1	0,8	96,2	73,7	99,2
	HN3	1,9	89,8	50,6	99,5
	mAb2	0,4	94,1	46,8	99,2
	mAb4	0,1	94,1	45,7	99,0
	mAb6	0,1	94,5	49,1	99,4
	mAb7	0,1	94,4	45,8	99,3
	mAb8	0,3	95,1	45,5	99,6
	mAb9	0,4	94,4	46,7	99,6
	mAb11	0,5	93,4	44,2	99,4
	mAb12	8,8	95,9	51,4	99,5
	mAb16	0,2	95,5	46,1	98,6
	mAb17	0,1	94,6	47,8	98,8
Связующие вещества интактного GPC3	mAb5	0,1	60,4	3,7	98,0
	mAb10	0,1	56,3	2,8	98,2
	mAb18	0,1	27,3	4,1	21,7
Связующие вещества только Hep3В	mAb3	0,9	2,3	9,7	23,2
	mAb14	0,2	0,6	8,9	19,0
	mAb19	0,3	0,4	7,6	17,8
Коммерческий контроль	AbOnline-PE	22,1	92,7	1,8	2,2

[0290] Для дальнейшей оценки были выбраны гибридомы, продуцирующие антитела, способные связываться с тремя типами клеток, не являющихся контролем. Вариабельные

домены иммуноглобулинов этих гибридом секвенировали и шесть из них были идентифицированы как уникальные последовательности, остальные оказались избыточными по отношению к шести идентифицированным как уникальные.

## Пример 2

### Т-клетки с химерными антигенными рецепторами (CAR)

[0291] Последовательности легкой и тяжелой переменных областей шести уникальных пар тяжелых и легких цепей, идентифицированных в примере 1 и подвергнутых последующему секвенированию — mAb1, mAb2, mAb10, mAb14, mAb18 и mAb19 — клонировали в виде одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) в конструкции CAR со следующей архитектурой: scFv — шарнирный домен CD8 — трансмембранный домен CD8 — костимуляторный домен 4 1BB — сигнальный домен CD3зета, с использованием стандартных методов молекулярной биологии, известных в данной области. Конструкции CAR клонировали в лентивирусные векторы, которые использовали для трансдукции Т-клеток. Промотор EF1A использовали и тестировали со всеми конструктами. Были протестированы две различные ориентации переменных тяжелых (VH) и переменных легких (VL) цепей: суффикс «VH» обозначает конструкт, в котором VH идет сразу после сигнального пептида, а суффикс «VL» — конструкт, в котором VH идет сразу после сигнального пептида (см., например, таблицу 10).

[0292] Т-клетки с химерными антигенными рецепторами (CAR) получали с использованием scFv на основе mAb2, mAb10, mAb1, mAb14, mAb19 и mAb18, а также контрольных конструктов, использующих scFv, полученные из общедоступных последовательностей антител YP7 и кодритузумаба. Для производства CAR Т-клеток выделяли CD3<sup>+</sup> Т-клетки из мононуклеарных клеток периферической крови, полученных от здоровых доноров, с помощью отрицательной селекции и замораживали в среде для криоконсервации клеток CryoStor® (Sigma Aldrich®). Перед трансдукцией лентивируса CD3 пан-Т-клетки размораживали, оставляли на два часа, активировали с помощью CD3/CD28 Dynabeads® (ThermoFisher Scientific), а затем оставляли на ночь в среде для Т-клеток (X-VIVO™ (Lonza) с 5% человеческой сывороткой (Valley Biomedical) и GlutaMax (Gibco)), дополненной 100 МЕ/мл интерлейкина-2 (IL2) (Miltenyi Biotech). На следующий день клетки трансдуцировали полибренном и лентивирусом, содержащим конструкции CAR с доминантно-отрицательными рецепторами TGFbeta (TGFbeta-DNRs) и без них, как описано в данном документе. Клетки центрифугировали в течение 90 минут при 1000 g, затем помещали в инкубатор. На следующий день культуральную среду заменяли. Клетки деинкапсулировали еще через два дня и размножали в течение восьми дней. Среду

обновляли три раза в неделю с добавлением IL-2 для всего объема. В конце производства клетки замораживали в среде для криоконсервации клеток CryoStor<sup>®</sup> (Sigma Aldrich<sup>®</sup>). Во всех случаях полученные клетки были на приблизительно 40–90% положительны в отношении трансгена при измерении с помощью проточной цитометрии со средним числом копий вектора приблизительно 0,5–4. Клетки, используемые в функциональных анализах и экспериментах *in vivo*, описанных ниже, были получены после размораживания и выдержки в течение ночи с 100 US/мл IL2.

### Пример 3

#### Цитотоксичность

[0293] Цитотоксичность CAR T-клеток, полученных, как описано в примере 2, оценивали в ходе анализа RTCA xCELLigence на приборе MP (Agilent). Десять тысяч живых клеток-мишеней (клетки Нер3В) высевали за день до анализа и на следующий день 500 CAR+ Т-клеток (или нетрансдуцированных (UT) (для соотношения эффектор/мишень (Е : Т) 1 : 5 и 1 : 20) высевали в 96-луночный Е-планшет в среде для культивирования клеток-мишеней, следуя рекомендациям производителя. Цитотоксичность наблюдали в течение 6–7 дней с использованием предоставленного программного обеспечения RTCA Pro и регистрировали как % цитолиза. В таблице 10 представлены данные по конечной точке % цитолиза клеток Нер3В через 143 часа. Данные показаны для 2 доноров, донора 1 и донора 2, полученных, как описано в примере 2.

**Таблица 10. Определение цитотоксичности**

Соотношение CAR+ Т-клетки : клетки-мишени	СООТНОШЕНИЕ Е : Т 1 : 5		СООТНОШЕНИЕ Е : Т 1 : 20	
	Донор 1	Донор 2	Донор 1	Донор 2
Краткое название				
mAb2_VH	100,0	100,0	100,0	81,8
mAb10_VH	24,8	52,2	9,5	12,7
mAb1_VH	100,0	100,0	100,0	98,1
mAb14_VH	100,0	100,0	82,4	61,3
mAb19_VH	3,4	1,6	8,8	7,9
mAb18_VH	4,9	1,4	4,2	6,9
mAb2_VL	4,3	3,3	6,7	7,8
mAb10_VL	5,4	3,6	5,5	5,4
mAb19_VL	4,5	3,7	1,8	1,5

mAb18_VL	0,7	1,4	5,8	3,0
hYP7	100,0	100,0	99,9	98,1
Кодритзумаб	100,0	100,0	99,9	90,2
Нетрансдуцированные	0,0	0,0	3,6	0,0
Только клетки-мишени	0,0	0,0	0,0	0,0

[0294] Все конструкции CAR хорошо экспрессировались в Т-клетках: 53–76% Т-клеток были CAR+, а среднее число копий вектора составляло 0,9-1,6. Полученные CAR+ и нетрансдуцированные Т-клетки имели сопоставимые фенотипы памяти, за исключением CAR-Т-клеток на основе mAb14, которые имели более высокие маркеры неспецифической активации/истощения.

**Таблица 11**

	% CAR на 14 день		Кол-во копий вектора		% CD25 в CD8+ клетках		% CD39 в CD8+ клетках		% CD69 в CD8+ клетках		% LAG3 в CD8+ клетках		% PD1 в CD8+ клетках	
	Доно р 1	Доно р 2	Доно р 1	Доно р 2	Доно р 1	Доно р 2	Доно р 1	Доно р 2	Доно р 1	Доно р 2	Доно р 1	Доно р 2	Доно р 1	Доно р 2
mAb2_VH	74,3	74,9	1,21	1,62	13,3	10,1	43,7	71,8	9,62	9,38	10,1	10,8	1,05	1,27
mAb10_VH	61,8	60,1	1,16	0,95	10,7	8,76	36	70,4	8,37	8,22	6,29	8,4	0,56	1,09
mAb1_VH	71,6	65,1	1,39	1,31	12,6	6,39	51,4	74,9	7,88	6,21	7	6,07	0,78	1,27
mAb14_VH	62,2	58,6	1,22	1,28	29,7	19,1	58,1	80,9	14,5	14,4	15,7	16,1	0,95	1,44
mAb19_VH	71,3	66,1	0,97	1,02	17,3	11,5	46,7	74,5	9,13	11,8	9,59	12,5	0,79	1,55
mAb18_VH	62,4	58,3	1,26	1,18	9,26	7,68	36	72,2	3,78	7,7	4,03	7,81	0,39	1,36
mAb2_VL	53,8	55,8	1,05	1,24	7,63	3,61	34	63,3	4,93	4,46	3,55	2,82	0,57	1,48
mAb10_VL	75,8	72,1	1,27	1,20	9,82	6,48	38,4	68,4	7,65	7,31	6,98	6,74	0,65	1,06
mAb19_VL	75,2	71,4	1,15	1,05	13,5	8,11	41,7	72,8	10,8	9,93	8,98	7,71	0,99	1,3
mAb18_VL	69,9	67,6	1,44	1,39	7,92	4,11	38,9	68,7	4,76	6,19	3,57	3,58	0,54	1,17
hYP7	69,9	64,3	1,42	1,36	12,7	6,64	50,3	77,1	9	8,41	7,4	7,32	0,62	1,2
Кодритзумаб	77	71	1,35	1,50	11,5	7,2	42,1	71,7	11,3	9,42	9,34	9,39	0,99	1,37
Нетрансдуцированные	0,05	0,05	0,00	0,00	6,17	3,98	16,7	42,7	3,67	2,87	2,55	3,34	0,62	2,21

#### Пример 4

#### Цитотоксичность на основе проточной цитометрии



[0295] Цитотоксичность CAR T-клеток дополнительно оценивали с помощью проточной цитометрии. Цитотоксичность определяли по количеству погибших клеток-мишеней (Hep3B, JHH5, GPC3 K562 (мышинные), GPC5 K562 (человеческие), родительские K562 и SKHep1) по окончании анализа. Анализ проводили на T-клетках от 2 здоровых доноров, полученных, как описано в примере 2. Для этого анализа 10 0000 клеток-мишеней, окрашенных CellTrace Violet, и 100 000 CAR+ T-клеток (или нетрансдуцированных (NTD) клеток) высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном и в среду для культивирования клеток-мишеней. Через 48 ч кокультуры промывали, окрашивали панелью антител, окрашивающих на жизнеспособность (Live/Dead Near Infra-Red Invitrogen™), и маркерами T-клеток CD3-BV786, CD8-FITC, CD69-PECy7 (Biolegend), Мус-AF647 (Cell Signaling), а образцы получали на проточном цитометре iQue (Intellicyt). Цитотоксичность измеряли как % мертвых мишеней, оцениваемых по % живых/мертвых клеток в CD3-отрицательных CellTrace Violet-положительных клетках. CAR на основе mAb14 имели цитотоксическую активность против GPC3-отрицательной клетки-мишени, Sk-Hep1 (см. таблицу 11). Кроме того, CAR на основе mAb19\_VL, YP7 и кодритузумаба обладали цитотоксической активностью против клеток-мишеней K562, сверхэкспрессирующих человеческий GPC5 (см. таблицу 12). Напротив, CAR на основе mAb2 и mAb1 не обладали сходным уровнем цитотоксичности против клеток-мишеней Sk-Hep1 и K562, сверхэкспрессирующих GPC5 человека. CAR на основе mAb2 и mAb1 были отобраны для дальнейшей оценки.

**Таблица 12. Определение цитотоксичности**

Краткое название	Донор 1						Донор 2					
	Hep3B	JHH5	GPC3 K562 (мышинные)	GPC5 K562 (человеческие)	K562 (родительские)	SkHep1	Hep3B	JHH5	GPC3 K562 (мышинные)	GPC5 K562 (человеческие)	K562 (родительские)	SkHep1
mAb2_VH	87,5	74,2	79,5	26,2	13,3	29	72,9	65,2	88,5	25,2	13,5	26,5
mAb10_VH	84,3	38,6	33,1	25,5	15,2	28,1	77	41,2	49,8	29,7	15,6	27,2
mAb1_VH	88,8	70,5	80,4	23,4	13,9	23,8	75,6	72,3	87,8	25,3	13	29,7
mAb14_VH	85,7	27,9	29,2	29,6	18,8	82,9	78,5	26	31,9	34,1	19,2	73,1
mAb19_VH	41,8	24,6	19,3	23,6	12,9	23,7	51,1	19,4	25,6	27,1	14,7	28,1
mAb18_VH	39,8	22,8	21,3	24	14,6	24,3	49,8	22,3	28,6	29,4	16,3	23
mAb2_VL	85,2	47	29,2	24,8	14,6	32,1	81,5	43,8	31	26,9	13,6	22,8
mAb10_VL	61	33,5	26,5	23,9	14,4	24,9	69,6	32,9	29,8	25,1	13,4	23,8

mAb19_V L	69,2	40,2	38,2	38,8	31,8	22,4	74,5	45,4	69,7	69,8	28	38,8
mAb18_V L	41,5	21,5	18,7	22,1	11,6	23,4	38,4	19,6	21,3	23,3	13	21,7
hYp7	88,9	83	63,6	64,5	13,4	23,8	89,5	81	68,1	71,2	15,1	26
Кодригуз умаб	90	90,6	22,3	94,6	12,4	27	90,7	72,6	24,8	95,1	13,9	22,2

### Пример 5

#### Цитотоксичность гуманизированных CAR

[0296] Гуманизированные версии scFvs mAb2 и mAb1 были созданы путем клонирования CDR каждого mAb на человеческие каркасные области, отобранные по гомологии с родительской мышинной последовательностью. Дополнительные гуманизированные версии были получены путем реверсии выбранных аминокислот в их мышинные аналоги. Полученные 10 гуманизированных scFv клонировали в лентивирусный вектор, содержащий конструкции CAR, как описано в примере 1. Затем гуманизированные конструкции CAR на основе mAb2-1-mAb2-5 и mAb1-1-mAb1-5 были протестированы на функциональность *in vitro* в кокультуре с клетками-мишенями, экспрессирующими GPC3. CAR Т-клетки, включающие конструкции CAR на основе mAb2-1-mAb2-5 и mAb1-1-mAb1-5, были получены, как описано в примере 2.

[0297] Цитотоксичность этих CAR Т-клеток оценивали в анализе RTCA xCELLigence на приборе MP (Agilent). Десять тысяч живых клеток-мишеней (клетки Hep3В) высевали за день до анализа и на следующий день 500 или 2000 CAR+ Т-клеток (или нетрансдуцированных (UT) (для соотношения эффектор/мишень (E : T) 1 : 20 или 1 : 5 соответственно) высевали в 96-луночный E-планшет в среду для культивирования клеток-мишеней, следуя рекомендациям производителя. Цитотоксичность наблюдали в течение 6–7 дней с использованием предоставленного программного обеспечения RTCA Pro и регистрировали как % цитолиза. В таблице 13 представлены данные по конечной точке % цитолиза клеток Hep3В через 164 часа. Данные представлены для 2 доноров, донора 1 и донора 2. Как показано в таблице 12, семейство mAb1 (родительское mAb1 и гуманизированные mAb1-1- mAb1-5) CAR Т-клеток обладало более высоким специфическим цитолизом, чем семейство mAb2 CAR.

**Таблица 13. Определение цитотоксичности**

Число высеянных клеток-мишеней	10 000	10 000
Клетка-мишень	Hep3В	SkHep1

Число добавленных Т-клеток (CAR)	500				2000			
Донорские Т-клетки	ДОНОР 1		ДОНОР 2		ДОНОР 1		ДОНОР 2	
Краткое название	% цитолиза	SD	% цитолиза	SD	% цитолиза	SD	% цитолиза	SD
hmAb2-1	36,2	5,2	0,0	5,5	4,8	4,1	9,2	12,6
hmAb2-2	28,9	6,8	0,0	3,5	0,0	6,1	12,5	3,6
hmAb2-3	19,3	11,7	0,0	8,7	0,0	5,1	6,8	4,8
hmAb2-4	29,3	3,9	0,0	0,7	0,0	2,7	5,9	7,2
hmAb2-5	29,6	5,2	0,0	14,2	0,0	5,8	5,7	1,2
hmAb1-2	95,7	2,9	91,3	4,8	0,0	3,7	3,4	4,5
hmAb1-3	97,1	0,1	89,4	4,7	0,0	7,3	9,9	3,7
hmAb1-1	96,4	2,1	93,4	4,7	0,0	5,5	5,1	8,3
hmAb1-4	94,9	1,4	89,6	10,5	0,0	2,3	3,0	7,3
hmAb1-5	99,3	1,3	95,0	2,6	0,0	5,7	5,7	6,4
mmAb2	81,1	5,2	71,0	8,8	0,0	2,8	5,6	15,6
mmAb1	96,1	1,5	86,7	0,7	0,0	5,6	0,0	13,3
hYP7	86,2	16,8	46,9	10,0	0,0	0,2	0,3	8,1
NTD	0,0	12,5	0,0	4,8	0,0	5,5	0,0	10,0

### Пример 6

#### Цитотоксичность на основе проточной цитометрии гуманизированных CAR

[0298] Цитотоксичность Т-клеток, содержащих гуманизированные CAR, дополнительно оценивали с помощью проточной цитометрии. Цитотоксичность определяли по количеству погибших клеток-мишеней (Her3B, JHH5, GPC3 K562 (мышинные), GPC5 K562 (человеческие), родительские K562 и SKHer1) по окончании анализа. CAR Т-клетки получали, как описано в примере 2. Для этого анализа 10 0000 клеток-мишеней, окрашенных CellTrace Violet, и 100 000 CAR+ Т-клеток (или нетрансдуцированных (NTD) клеток) высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном и в среду для культивирования клеток-мишеней. Через 48 ч кокультуры промывали, окрашивали панелью антител для оценки жизнеспособности (Live/Dead Near Infra-Red) и маркерами Т-клеток CD3-BV786, CD8-FITC, CD69-PECy7 (Biolegend), Myc-AF647 (Cell Signaling), а образцы получали на проточном цитометре iQue (Intellicyt). Цитотоксичность измеряли как % мертвых мишеней, оцениваемых по % живых/мертвых клеток в CD3-

отрицательных CellTrace Violet-положительных клетках. Как показано в таблице 14, анализ цитотоксичности на основе проточной цитометрии подтвердил, что гуманизированные hmAb1 CAR Т-клетки были более цитотоксичными, чем гуманизированные CAR Т-клетки на основе mAb2, против клеток-мишеней Нер3В и JHH5. Кроме того, было отмечено, что CAR Т-клетки на основе hmAb1 были более специфичными, чем CAR-Т-клетки на основе YP7, которые продемонстрировали небольшую реактивность к GPC5. Для дальнейшей оценки было выбрано mAb1.

**Таблица 14. Определение цитотоксичности**

Краткое название	Нер3В	JHH5	GPC3 K562 2353 (мышинные)	GPC5 K562 2355 (человеческие)	K562 (родительские)	SkHep1
hmAb2-1	65,8	28,9	24,2	16,2	26,0	27,1
hmAb2-2	70,8	41,3	23,6	16,9	25,2	31,0
hmAb2-3	75,9	35,8	21,6	16,6	27,5	27,6
hmAb2-4	73,7	47,1	22,5	17,3	28,4	30,3
hmAb2-5	71,7	46,1	25,5	15,3	29,3	30,0
hmAb1-2	89,4	75,7	48,3	18,2	35,3	32,0
hmAb1-3	89,9	72,6	50,5	16,3	27,4	28,9
hmAb1-1	91,1	76,6	53,9	17,7	30,6	33,8
hmAb1-4	89,8	73,4	52,7	16,4	29,1	27,3
hmAb1-5	90,5	76,7	52,9	18,5	30,4	33,4
mmAb2	86,7	68,2	48,5	15,2	26,2	30,1
mmAb1	89,1	72,0	50,7	17,9	30,6	45,8
hYP7	75,2	75,8	28,3	42,2	27,7	29,4
NTD	37,0	17,9	15,3	14,3	22,8	17,6
Только опухоли	20,0	9,0	13,8	13,1	17,7	13,3

### Пример 7

#### Оценка *in vivo*

[0299] Т-клетки, трансдуцированные различными конструкциями CAR или нетрансдуцированные (UT), как показано в таблицах 15А–15С и 16, были получены как описано выше и протестированы *in vivo* в модели с ксенотрансплантатами Нер3В на мышах NSG.  $2 \times 10^6$  клеток Нер3В ресуспендировали в 25% Matrigel и имплантировали высоко в подмышечную область мышам NSG в день 0. Через три-четыре дня после этого

объем опухоли измеряли с использованием штангенциркуля на основе ширины и длины опухоли. На 14 день, когда опухоли достигли среднего размера  $\sim 150 \text{ мм}^3$ , животных разделили на группы по 8 мышей (4 для контроля с использованием носителя) так, чтобы средний объем опухоли был сопоставим между группами, и лечили либо носителем PBS, либо нетрансдуцированными Т-клетками, либо GPC3 CAR Т-клетками в количестве  $1 \times 10^6$  CAR+ Т-клеток путем внутривенной инъекции. Инфузию Т-клеток нормализовали добавлением нетрансдуцированных клеток, так что общая доза Т-клеток была равна во всех группах. Процент полного ответа рассчитывали путем деления количества мышей, у которых объем опухоли уменьшился до 0 в двух или более последовательных временных точках, на количество мышей в группе. В модели с подкожными ксенотрансплантатами НерЗВ у мышей гуманизированный mAb1-1 CAR оказался более эффективным, чем другие CAR, включая CAR на основе mAb2, поскольку он был способен уменьшать объем опухоли (таблицы 15А–15С) и вызывал более полные ответы, чем другие протестированные CAR (таблица 16).

**Таблица 15А. Контрольные группы лечения**

Дни после имплантации опухоли	Лечение носителем (PBS)				Лечение нетрансдуцированными Т-клетками							
	Объем опухоли ( $\text{мм}^3$ )				Объем опухоли ( $\text{мм}^3$ )							
14	108	126	126	196	196	108	172	196	126	108	108	126
15	126	126	126	196	196	108	196	288	126	172	108	221
18	245	320	288	446	320	172	245	446	288	365	256	320
20	486	550	550	650	650	320	527	936	446	500	365	446
22	527	787	666	787	1008	405	787	1183	650	550	500	600
25	847	1268	1099	1008	1268	726	936	1470	1008	1099	864	1008
27	908	1470	1372	1352	1688	936	1008	1470	1268	1268	1099	1268
29	1224	1470	1688	1437	1800	1008	1080		1268	1568	1099	1268
32	2025	1800	2746	2025	2432	1470				2025	1470	2304
34		2176				2176					2304	

**Таблица 15В. Группы лечения**

Дни после имплантации	Лечение $1 \times 10^6$ YP7 CAR Т-клетками	Лечение $1 \times 10^6$ mAb1-1 CAR Т-клетками
	Объем опухоли ( $\text{мм}^3$ )	Объем опухоли ( $\text{мм}^3$ )

опухоли																
14	196	126	88	196	126	126	126	108	126	196	196	126	108	108	88	172
15	288	144	88	320	126	172	221	172	320	288	320	126	108	108	126	172
18	666	320	172	600	446	288	446	405	550	486	527	288	288	126	172	256
20	864	446	256	787	650	405	600	600	600	787	650	550	365	196	256	256
22	1183	600	500	1268	1080	600	787	787	600	847	908	600	550	288	405	405
25	864	221	75	650	446	126	288	365	787	1008	847	600		320	405	288
27	726	75	0	527	320	0	126	172	787	1268	847	600		221	256	108
29	936	0	0	384	108	0	108	108	787	1268	1268	288		196	196	75
32	936	0	0	384	0	0	108	63	1183	1666	1568	550		108	196	0
34	1268	0	0	700	0	0	172	63	1666	2025	2025	936		75	196	0
36	1568	0	0	700	0	0	172	63	1764			936		0	196	0
39	2176	0	0	847	0	0	256	196	2560			1470		0	108	0
41		0	0	908	0	0	256	288				1688		0	0	0
43		0	0	650	0	0	288	288				1800		0	0	0
46		100	0	446	0	88	405	288				2457		0	0	0
49		113	0	446	0	126	405	288						0	0	0
53		198	75	221	0	352	666	405						126	63	88
55		416	144	75	0	600	666	550						126	108	144
57		750	144	126	0	787	864	550						221	126	162
60		1224	320	172	0	787	1099	787						320	196	162
62		1521	405	172	0	1008	1183	936						352	221	270
64		1960	550	172	0	1268	1372	1183						384	288	384
67		2138	787	196	0	1568	1470	1568						700	405	567
69			1268	221	0	1764	1568	2176						847	550	800
71			1688	320	0	2432	2176							1470	787	1089
74			1913	320	0									1568	1008	1521

**Таблица 15С. Группы лечения**

	Лечение 1e6 mAb1-5 CAR Т-клетками								Лечение 1e6 mAb2 CAR Т-клетками							
Дни после имплантации опухоли	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> )								Объем опухоли (мм <sup>3</sup> )							
14	196	108	144	196	88	108	144	108	196	126	126	126	196	108	144	144
15	288	126	196	320	144	172	288	108	288	196	126	126	288	126	221	288
18	550	256	405	650	446	256	600	172	600	288	126	288	550	256	352	550

20	864	288	600	700	550	288	787	256	650	288	172	405	550	365	486	666
22	1372	550	864	1152	726	405	1008	256	1008	405	256	600	787	550	650	864
25	1372	600	864	1224	787	500	1183	365	1008	446	256	650	1008	666	787	1183
27	2048	650	1008	1764	847	666	1372	550	1183	446	365	787	1268	936	1352	1183
29		847	1470	2025	1080	864	1800	726	1352	600	550	1183	1568	1183		1800
32		1080			1268	1099	2176	1099	1666	787	864	1568	1800	1372		2457
34		1352			2048	2048		1372	2304	1008	1099	2176	2176	2048		
36		1568						1688		1268	1372					
39		2250						2457			2176					

**Таблица 16**

	% полного ответа
Лечение носителем (PBS)	0
Лечение нетрансдуцированными Т-клетками	0
Лечение 1e6 YP7 CAR Т-клетками	50
Лечение 1e6 mAb1-1 CAR Т-клетками	37,5
Лечение 1e6 mAb1-5 CAR Т-клетками	0
Лечение 1e6 mAb2 CAR Т-клетками	0

**Пример 8**

**CAR T + доминантно-негативный рецептор TGF-бета**

[0300] Конструкты лентивирусных векторов были сконструированы для сверхэкспрессии, помимо CAR, усеченной версии рецептора TGF-бета 2, которая не имеет внутреннего сигнального домена и действует как доминантно-негативный рецептор TGF-бета под названием TGFbDNR2. Оба конструкта CAR на основе mAb1-1 и YP7 тестировали с этим усилением TGFbDNR2. CAR-Т-клетки получали, как описано в примере 2. Конструкты CAR T хорошо экспрессировались в Т-клетках (от 60 до 86% CD3+ Т-клеток представляли собой CAR в конце процесса получения; со значениями числа копий вектора от 0,8 до 2). (см. таблицу 17).

**Таблица 17**

	% CAR+	Кол-во копий вектора
mAb1-1_DNR2	86	2,03
hYP7_DNR2	60,3	0,79

UTD	0,6	0
-----	-----	---

**[0301]** Специфическую цитотоксичность оценивали в анализе xCELLigence против клеток-мишеней, экспрессирующих различные уровни GPC3, включая 2 клеточные линии, которые были GPC3-отрицательными, как описано в примере 2. CAR T-клетки проявляли цитотоксичность против GPC3-экспрессирующих мишеней Hep3B и Huh7. mAb1-1 оказалось более специфичным, чем CAR на основе YP7, поскольку обладало минимальным цитолизом против GPC3-отрицательных клеток-мишеней Hep3B-GPC3KO и Sk-Hep1 (таблица 18).

**Таблица 18. Цитотоксичность**

Соотношение эффектор : мишень (E : T)	Высокое E : T				Низкое E : T			
	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000
Число высеванных клеток-мишеней	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000
Клетка-мишень	Hep3B	Huh7	Hep3B-GPC3KO	Sk-Hep1	Hep3B	Huh7	Hep3B-GPC3KO	Sk-Hep1
Число добавленных T-клеток (CAR)	1 000	10 000	10 000	10 000	500	500	500	500
Краткое название	% цитолиза							
mAb1-1_DNR2	100	100	10	1	99	44	0	0
hYP7_DNR2	100	100	100	100	100	31	95	3
Нетрансдуцированный	4	0	9	0	2	0	2	0
Мишень	0	0	0	0	0	0	0	0

### Пример 9

#### CAR T + доминантно-негативный рецептор TGF-бета

**[0302]** Секрецию цитокинов TGFbDNR-усиленными GPC3-специфическими CAR T-клетками оценивали в кокультуре. Двадцать пять тысяч клеток-мишеней и 25 000 CAR+ T или нетрансдуцированных (UTD) клеток были помещены в 96-луночный планшет с плоским дном и в среду для культивирования клеток-мишеней. Через 24 ч супернатанты собирали, разводили в 50 или 2 раза и определяли уровень IFNg с помощью платформы Lumindex и набора Milliplex MAP (EMD Millipore Sigma) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки Hep3B экспрессируют человеческий GPC3, тогда как Hep3B-GPC3KO являются GPC3 отрицательными. Контрольные «только T-клетки»



представляют собой контроль, в котором отсутствует мишень. Эксперимент проводили с клетками от 1 здорового донора. Как показано в таблице 19, концентрация IFN $\gamma$  указана в пг/мл. CAR на основе mAb1-1\_DNR оказался более специфичным, чем CAR на основе YP7\_DNR, поскольку он выделял меньше IFN $\gamma$  против GPC3-отрицательных клеток-мишеней Hep3B-GPC3KO и в отсутствие мишеней.

**Таблица 19**

Краткое название	Hep3B			Hep3B-GPC3KO			Только Т-клетки		
UTD	30,5	30,5	30,5	30,5	30,5	30,5	7,5	7,8	8,1
mAb1-1_DNR	37710,3	39360,6	44536,0	59,2	30,5	30,5	38,6	30,6	45,5
hYP7_DNR	120842,8	105712,5	101816,5	77435,0	72569,6	66045,7	9805,2	9794,2	9903,2

### Пример 10

#### CAR T + доминантно-негативный рецептор TGF-бета *in vivo*

[0303] Т-клетки, трансдуцированные конструктом CAR на основе mAb1-1\_TGFbDNR или нетрансдуцированные (UT), были получены в результате лейкофереза трех здоровых доноров. Затем Т-клетки тестировали в модели с подкожными ксенотрансплантатами Hep3B у мышей, как описано в примере 7: на 19 день после имплантации опухоли для донора 1, на 17 день после имплантации опухоли для доноров 2 и 3; Доза CAR Т-клеток: 2еб/мышь для донора 1 или 1еб/мышь для доноров 2 и 3; и доза нетрансдуцированных клеток: 5еб/мышь для донора 1, 4еб/мышь для донора 2.

[0304] Последующее наблюдение за объемом опухоли (таблица 20 для донора 1 и таблица 21 для доноров 2–3) показывает, что CAR Т-клетки mAb1-1-DNR способны эффективно контролировать рост опухоли в низких дозах (2еб или 1еб CAR Т-клеток/мышь).

**Таблица 20**

	Лечение 5еб UT Т-клетками — донор 1	Лечение 2еб mAb1-1-DNR CAR Т-клетками — донор 1
--	-------------------------------------	---

Дни после имплантации опухоли	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> )										Объем опухоли (мм <sup>3</sup> )									
	107	207	108	138	123	189	149	86	120	82	117	127	106	125	183	135	115	87	108	151
14	107	207	108	138	123	189	149	86	120	82	117	127	106	125	183	135	115	87	108	151
21	219	423	197	268	263	420	159	368	309	188	213	251	192	252	424	390	351	181	223	438
27	693	904	449	559	464	1036	849	295	619	400	200	198	362	311	580	600	252	186	295	547
30	868	1297	716	863	761	1350	982	472	861	725	170	96	133	256	610	497	150	40	274	448
34	1098	1934	986	1295	1108	1764	1421	693	1111	926	67	0	65	144	428	337	83	18	174	187
38	1600	2491	1263	1583	1495	2059	1652	878	1324	1205	79	8	51	80	531	271	63	18	174	121
42	2149		1558	2263	2026	2578	2306	1086	2176	2158	39	14	23	77	570	112	20	0	113	73
45			2123					1459			36	0	18	63	453	144	0	0	113	68
52								1495			0	0	0	108	274	141	0	0	0	75
56											0	0	0	126	172	150	0	0	0	0
59											0	0	0	0	63	144	0	0	0	0

**Таблица 21**

Дни после имплантации опухоли	Лечение 4e6 UT T-клетками — донор 2										Лечение 1e6 mAb1-1-DNR CAR T-клетками — донор 2					Лечение 1e6 mAb1-1-DNR CAR T-клетками — донор 3								
	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> )										Объем опухоли (мм <sup>3</sup> )					Объем опухоли (мм <sup>3</sup> )								
16	72	76	79	91	93	113	116	188	72	76	81	89	96	110	121	169	74	75	83	86	99	108	131	151
22	95	176	104	133	284	190	242	293	63	170	174	239	239	191	290	226	136	169	129	252	291	348	217	286
28	144	303	204	329	425	474	737	852	51	214	277	235	318	559	436	328	243	224	366	364	667	492	368	468
31	265	587	327	481	753	767	856	1144	0	155	250	145	290	419	392	396	256	492	363	458	757	215	436	459
35	426	816	392	814	1252	888	1136	1423	0	188	108	0	172	420	363	389	298	173	228	210	984	139	334	266
39	729	1330	538	1229	1885	1099	1159	2138	0	250	165	0	172	588	544	414	69	256	83	186	1498	83	415	314
42	1000	1570	709	1637	2312	1375	1283		0	237	229	0	243	545	564	451	163	263	63	83	1800	63	500	442
49									0	315	88	0	117	259	325	231	359	484	0	108		63	857	552
52									0	410	86	0	131	352	256	340	510	795	0	172		63	1022	805
56									0	337	18	0	65	86	112	70	598	932	0	0		69	1197	1051
58									14	285	14	0	63	81	86	69			0	172		93		
62									0	225	0	0	0	0	72	85			0	194		227		
66									0	262	0	0	0		0	63			81	451		438		

**Пример 11**

**CAR T + доминантно-негативный рецептор TGF-бета в модели *in vivo* с низким GPC3**

[0305] Были получены T-клетки, трансдуцированные конструктором CAR на основе mAb1-1\_TGFbDNR или нетрансдуцированные (UT). Затем T-клетки тестировали на модели с подкожными ксенотрансплантатами Huh7 у мышей. Вкратце, готовили 5e6 опухолевых клеток Huh7 в 50% Matrigel и имплантировали в день 0 в бок мышей NSG MHC\_I и MHC-

II с двойным нокаутом. На 10 день мышей с объемом опухоли от 63 до 110 мм<sup>3</sup> регистрировали и распределяли по группам так, чтобы средний объем опухоли при дозировании Т-клеток составлял 80 мм<sup>3</sup>. На 10 день мыши получили в общей сложности 1,57e7 общих Т-клеток на мышь, а мыши, подвергшиеся лечению с помощью CAR T, этот показатель составил 1e7 CAR T-клеток на мышь. Также наблюдали контрольную группу, в которой мыши получали PBS в качестве носителя-контроля.

[0306] Последующее наблюдение объема опухоли (таблица 22) показывает, что mAb1-1-DNR CAR T-клетки были способны эффективно контролировать рост опухоли из опухолевых клеток с низкой экспрессией GPC3.

**Таблица 22**

Дни после имплантации опухоли	Лечение PBS												Лечение 1e7 соответствующими UT T-клетками												Лечение 1e7 mAb1-1-DNR CAR T-клетками											
	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> )												Объем опухоли (мм <sup>3</sup> )												Объем опухоли (мм <sup>3</sup> )											
7	70	70	70	71	71	71	72	72	73	73	73	74	74	74	75	76	77	77	79	80	82	83	83	83	85	88	90	94								
14	85	70	218	111	86	111	63	70	93	108	83	72	76	131	83	63	108	205	307	154	175	203	130	127	398	189	120	144								
19	141	63	699	578	91	411	83	135	174	235	129	108	91	411	117	69	99	397	499	300	262	225	275	137	573	426	141	403								
21	256	75	868	721	74	292	186	261	319	396	295	183	118	717	186	108	127	598	677	350	270	267	377	196	660	432	164	449								
25	776	224	1631	1423	138	613	441	515	578	518	599	519	548	969	405	219	318	1194	1310	198	281	180	211	137	609	286	144	230								
30	1244	448	2378	2712	325	837	565	875	796	877	1081	1027	671	1932	598	387	596	1309	1719	63	176	63	108	108	278	147	75	113								
33	1507	745			604	1088	614	1160	1185	1298	1476	1349	926		818	624	819	1621	2282	36	109	0	63	36	174	146	51	75								
35	2304	1310			1016	1569	1183	1468	1856	1470	1806	1913	1186		1105	1028	1407	2016		32	0	0	0	18	137	282	63	63								
39					1435	1684	1524	1738	1906	2772			1963	1783		1549	1430	1704			0	115	0	63	137	126	473	108	108							
43					1724	2377	2202	2721														0	211	0	108	324	207	824	139	137						
47																						0	172	0	119	458	219	1195	173	213						
50																						0	108	0	224	832	460	1367	200	321						

### Пример 12

#### Картирование эпитопов для mAb1-1

[0307] Эпитоп для mAb1-1 определяли методом высококачественного масс-спектрометрического (МС) анализа с использованием матричной лазерной десорбции/ионизации (MALDI). Вкратце, рекомбинантный человеческий GPC3 (rhGPC3) и одноцепочечный вариабельный фрагмент, слитый с кристаллизуемым доменом фрагмента мышинового IgG2A (scFv-Fc), анализировали по отдельности методом высококачественной MALDI-спектрометрии с использованием время-пролетного масс-спектрометра Autoflex II MALDI Time-of-flight (ToF) ToF (Bruker) со специализированным детектором, предназначенным для обнаружения больших молекулярных комплексов с высокой чувствительностью. Образцы разводили и смешивали 1 : 1 с матрицей синапиновой кислоты (10 мг/мл) в ацетонитриле : воде (1 : 1,

об/об), TFA 0,1% (набор K200 MALDI) и наносили на пластину MALDI (SCOUT 384). После кристаллизации при комнатной температуре образец вводили в спектрометр для анализа.

**[0308]** RhGPC3 и mAb1-1 scFv смешивали с большим молярным избытком scFv по отношению к GPC3, а затем поперечно сшивали смесью химических поперечносшивающих агентов. Образцы инкубировали в течение 3 часов с поперечносшивающим реагентом. Поперечношитые образцы получали, как описано выше, и определяли характеристики высокомолекулярной MALDI-масс-спектрометрией.

**[0309]** Затем rhGPC3 расщепляли с использованием набора протеаз (т. е. трипсин, химотрипсин, Asp-N, эластаза и термолизин) и анализировали с помощью nLC-LTQ-Orbitrap MC/MC-анализа. Анализировали полученные пептиды. Наконец, комплекс rhGPC3-scFv-Fc подвергали мультиферментативному расщеплению тем же набором протеаз и анализировали с помощью жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения (nLC-LTQ-Orbitrap MS). Были идентифицированы девять поперечношитых пептидов между rhGPC3 и mAb1-1 scFv-Fc, что указывало на то, что mAb1-1 связывается с эпитопом на rhGPC3, включая аминокислоты Thr55, Lys68, Ser74, Arg75, Lys80, Thr84, Arg258 и Ser263, где позиции аминокислот пронумерованы как в базе данных Uniprot для записи Q8IYG2 (Q8IYG2\_HUMAN) (UniProt Consortium, 2021).

### Пример 13

#### Измерение аффинности mAb1-1 GPC3

**[0310]** Константу кинетики связывания mAb1-1 scFv mFc с его мишенью, GPC3, определяли с помощью Sartorius Octet Red96 с биосенсорами АМС. mAb1-1 scFv-Fc разводили до 2 г/мл и захватывали на 7 наконечников биосенсоров АМС при перемешивании. Один биосенсор оставался незаполненным для сравнения. Две партии рекомбинантного человеческого GPC3 (Q25-H559)-6xHis (rhGPC3) в концентрации 464,3, 154,8, 51,59, 17,2, 5,73, 1,911 и 0 нМ использовали в качестве аналитов. Фазу ассоциации измеряли в течение 90 секунд и измеряли диссоциацию в течение 120 секунд. Все измерения были скорректированы на исходное отклонение путем вычитания контрольного датчика, находящегося только в рабочем буфере. Данные анализировали с использованием модели взаимодействия 1 : 1 с общей аппроксимацией отдельно для каждой партии аналита с использованием программного обеспечения Octet.

**[0311]** Для анализа YP7 scFv mFc YP7 scFv mFc захватывали на один наконечник биосенсора АМС и оценивали связывание с rhGPC3 при одной концентрации 500 нМ. Фазу ассоциации измеряли в течение 90 секунд, а диссоциацию — в течение 120 секунд.

Данные для YP7 были проанализированы с использованием модели взаимодействия 1 : 1 с применением индивидуальной аппроксимации для одной концентрации.

[0312] Значения KD mAb1-1 scFv-Fc для партий 1 и 2 rhGPC3 определяли как 32,7 и 35,2 нМ соответственно. Хотя эти значения демонстрируют хорошую воспроизводимость, аппроксимация указывает на то, что в измерении взаимодействия может существовать некоторое сложное связывание. Из одной концентрации аналита значение KD YP7 для rhGPC3 составило 8,73 нМ.

**Таблица 23**

scFv-Fc	rhGPC3	K <sub>D</sub> (нМ)	k <sub>on</sub> (1/Мс)	k <sub>off</sub> (1/с)
mAb1-1	Партия 1	32,7	2,18 E+05	7,12 E-03
	Партия 2	35,2	2,23 E+05	7,85 E-03
YP7	Партия 2	8,73	7,73 E+04	6,75 E-04

#### Пример 14

##### Связывание mAb1-1 и YP7 с нецелевыми белками, экспрессируемыми на плазматической мембране

[0313] mAb1-1 и YP7 scFv-Fcs подвергали скринингу на связывание с библиотекой белков плазматической мембраны, индивидуально экспрессированных в клетках НЕК293. Клетки НЕК293 подвергали обратной трансфекции в двух повторностях на микроматрицах, которые были помечены экспрессионными векторами, кодирующими ZsGreen, а затем одним из 5484 человеческих мембранных белков или секретируемых клеточной поверхностью белков. На дополнительные предметные стекла наносили векторы, кодирующие 371 гетеродимер. В качестве положительного контроля для обеспечения минимального уровня трансфекции на каждом предметном стекле были представлены клетки, обратно трансфицированные hEGFR-IRES-ZsGreen1 в четырех повторностях. Микроматрицы фиксировали и окрашивали scFvs и анти-EGFR, а связывание определяли с помощью флуоресцентного вторичного антитела. Первичные совпадения, выявленные в ходе первичного скрининга, были подтверждены в ходе вторичного скрининга наряду с дополнительными контролями. Векторы, кодирующие первичные совпадения, повторно упорядочивали и экспрессировали в клетках НЕК293 на новых предметных стеклах и проводили скрининг на фиксированных и нефиксированных клетках. Для обеих мишеней было обнаружено среднее связывание с GPC3. Было обнаружено и подтверждено нецелевое слабое связывание YP7 с CPG5 (изоформы 1 и 2)

Нецелевое слабое связывание mAb1-1 с CDH1 обнаруживали и подтверждали при вторичном скрининге и с помощью анализа с помощью проточной цитометрии трансфицированных клеток HEK293.

**Таблица 24**

Образец	Идентификатор гена	Первичный скрининг (фиксированные клетки)		Подтверждающий скрининг (фиксированные клетки)		Подтверждающий скрининг (живые клетки)
		Повт. 1	Повт. 2	Повт. 1	Повт. 2	
<b>mAb1-1</b> (2 мкг/мл)	GPC3	Сильное	Сильное	Сильное	Сильное	Сильное
	CDH1	Оч. слабое	Оч. слабое	Слабое	Слабое	Слабое
<b>УР7</b> (10 мкг/мл)	GPC3	Сильное	Средн./сильное	Средн./сильное	Средн./сильное	Н/П
	SPG5 (изоформа 1)	Слабое	Слабое	Слабое	Слабое	Н/П
	CSPG5 (изоформа 2)	Слабое	Слабое/средн.	Слабое	Слабое/средн.	Н/П

### Пример 15

#### Перекрестная реактивность mAb1-1 с нормальными тканями человека

[0314] Были разработаны способы определения специфического окрашивания тканей, экспрессирующих GPC3, с помощью mAb1-1 scFv-Fc (исследуемый препарат) с использованием криосрезов плаценты человека, клеток Huh7 и Hep3В в качестве положительного контроля и клеток SK-HEP1 в качестве отрицательного контроля. Затем оценивали связывание mAb1-1 с панелью нормальных тканей человека на криосрезках от по меньшей мере 3 доноров в двух концентрациях. Отрицательные контроли включали моноклональное IgG2a мыши с различной специфичностью (контрольный препарат), а также условия без окрашивающего реагента (контроль анализа). В качестве положительного контроля ткани окрашивали поликлональным антителом кролика, которое связывается с  $\beta_2$ -микроглобулином (проверка ткани). Результаты приведены в таблице 25. mAb1-1 не связывается с клеточными мембранами в нормальных здоровых

тканях, за исключением клеток базального эпителия слизистой оболочки желудка, где описана экспрессия GPC3.

**Таблица 25**

Ткань	Источник	Прогон	Исследуемый препарат (mAb1-1)	Контрольный препарат (MsIgG2a)	Контроль анализа			Проверка ткани (окрашивание ткани)	Комментарии к тканям / неспецифические результаты
			2 мкг/мл	0,5 мкг/мл	2 мкг/мл	0,5 мкг/мл	мл		
Материал для положительного контроля									
Криосрезы клеток Нер3В	СМ1543-1	1,2,4	1-3+ (част.)	1-3+ (част.)	Отр.	Отр.	Отр.	н/з	От слабого до сильного мембранного и цитоплазматического окрашивания частого положительного контроля — клеток Нер3В — при использовании обеих концентраций GS-1138451. Отсутствие окрашивания клеток положительного контроля при концентрации MsIgG2a или на контрольных стеклах для анализа.
Материал отрицательного контроля									
Криосрезы клеток SK-HEP-1	СМ1545-1	1,2,4	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	н/з	Отсутствие окрашивания клеток отрицательного контроля SK-HEP-1 при концентрации GS-1138451 или MsIgG2a или на контрольных стеклах для анализа.

Ткань	Источник	Прогон	Исследуемый препарат	Контрольный препарат	Контроль анализа			Проверка ткани (окрашивание ткани)	Комментарии к тканям / неспецифические результаты
			(mAb1-1)	(MsIgG2a)	2 мкг/мл	0,5 мкг/мл	2 мкг/мл		

Дополнительный контрольный материал

Криосрезы плаценты человека (трофобласты)	HT2652-1	1,2,4	1-3+ (отд.)	1-2+ (от редк. до отд.)	Отр.	Отр.	Отр.	н/з	От слабого до сильного мембранного и цитоплазматического окрашивания отдельных трофобластов с помощью 2 мкг/мл GS-1138451. Окрашивание уменьшалось до от слабого до умеренного и от редкого до отдельных клеток с помощью 0,5 мкг/мл GS-1138451. Отсутствие окрашивания элементов ткани плаценты человека при концентрации MsIgG2a или на контрольных стеклах для анализа.
Криосрезы клеток Huh-7	CM1544-1	1,2,4	1-3+ (част.)	1-3+ (от отд. до част.)	Отр.	Отр.	Отр.	н/з	От слабого до сильного мембранного и цитоплазматического окрашивания частых клеток Huh-7 с помощью 2 мкг/мл GS-1138451. Частота окрашивания с помощью 0,5 мкг/мл GS-1138451 уменьшалась до отдельных-частых клеток. Отсутствие окрашивания клеток Huh-7 при концентрации MsIgG2a или на контрольных стеклах для анализа.



Ткань	Источник	Прогон	Исследуемый препарат (mAb1-1)	Контрольный препарат (MsIgG2a)	Контроль анализа		Проверка ткани (окрашивание ткани)	Комментарии к тканям / неспецифические результаты	
					2 мкг/мл	0,5 мкг/мл			
					2 мкг/мл	0,5 мкг/мл		<p>Общие комментарии: Если не указано иное, все образцы тканей были признаны пригодными для интерпретации. Фоновое окрашивание из-за неполного гашения эндогенной миелопероксидазы или эндогенных/ экзогенных пигментов, описанных для отдельных тканей.</p> <p>Предметные стекла пронумерованы в соответствии со следующей схемой:  Предметное стекло 1 (mAb1-1, 2 мкг/мл),  Предметное стекло 2 (mAb1-1, 0,5 мкг/мл),  Предметное стекло 3 (MsIgG2a, 2 мкг/мл),  Предметное стекло 4 (MsIgG2a, 0,5 мкг/мл),  Предметное стекло 5 (контроль анализа [без первичного антитела]),  Предметное стекло 6 (анти-β<sub>2</sub>-микроглобулин [контроль окрашивания ткани]).</p>	
Надпочечник	НТ 2342-2	1,3,4	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Отсутствует ткань на предметном стекле 3 в прогоне 1. Окрашивание повторили в прогоне 4, а интерпретация основана на оценке предметных стекол, окрашенных в прогоне 4.
Надпочечник	НТ 2924-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание отдельных ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Надпочечник	НТ 2478-1	1,3,4	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Отсутствует ткань на предметном стекле 3 в прогоне 1. Окрашивание повторили в прогоне 4, а интерпретация основана на оценке предметных стекол, окрашенных в прогоне 4.

Ткань	Источник	Прогон	Исследуемый препарат (mAb1-1)	Контрольный препарат (MsIgG2a)		Контроль анализа		Проверка ткани (окрашивание ткани)	Комментарии к тканям / неспецифические результаты
				2 мкг/мл	0,5 мкг/мл	2 мкг/мл	0,5 мкг/мл		
Мочевой пузырь (мочевывод.)	НТ 1316-3	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Мочевой пузырь (мочевывод.)	НТ 1328-4	1,3	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Слизистая не представлена в срезах. Ткань указана как не оцененная (Н/О). Замена на НТ 3128-1 в прогоне 4.
Мочевой пузырь (мочевывод.)	НТ 3128-1	4,5	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Замена на НТ 1328-4. Присутствует скудная слизистая. Окрашивание отдельных ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Мочевой пузырь (мочевывод.)	НТ 1244-13	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Клетки крови	НТ 3257	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Остаточная эндогенная пероксидаза (гранулоциты).
Клетки крови	НТ 3014	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Остаточная эндогенная пероксидаза (гранулоциты). Неплотная насыщенность клетками на предметном стекле 4.
Клетки крови	НТ 3015	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Остаточная эндогенная пероксидаза (гранулоциты).
Кровеносные сосуды (эндотелий)	Все ткани		Подробно об отдельных тканях						
Таблица 1									
Костный мозг	НТ 2173-2	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание от редких до отдельных ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Костный мозг	НТ 2194-2	1,3,4	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание на предметном стекле 1 в прогоне 1 отсутствует. Окрашивание повторили в прогоне 4, а интерпретация основана на оценке предметных стекол, окрашенных в прогоне 4.

Ткань	Источник	Прогон	Исследуемый препарат (mAb1-1)	Контрольный препарат (MsIgG2a)		Контроль анализа		Проверка ткани (окрашивание ткани)	Комментарии к тканям / неспецифические результаты
				2 мкг/мл	0,5 мкг/мл	2 мкг/мл	0,5 мкг/мл		
Костный мозг	НТ 2207-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание от редких до отдельных ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Мозжечок	НТ 3065-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание редких ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Мозжечок	НТ 2277-6	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание редких ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Мозжечок	НТ 2117-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Кора головного мозга	НТ 614-12	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание от отдельных до частых ядер на предметном стекле 1 и редких ядер на предметном стекле 2. Окрашивание ядер иногда включает мембрану ядра.
Кора головного мозга	НТ 3143-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание редких ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Кора головного мозга	НТ 2297-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание редких ядер на предметном стекле 1; специфичность оценена как неопределенная.
Шейка матки	НТ 2970-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Внешнее устье
Шейка матки	НТ 2974-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Внутреннее устье и эндоцервикальные железы Неспецифическое окрашивание слизистой на нескольких стеклах; не исключало возможности интерпретации.
Шейка матки	НТ 2910-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Внутреннее устье и эндоцервикальные железы

Ткань	Источник	Прогон	Исследуемый препарат (mAb1-1)	Контрольный препарат (MsIgG2a)		Контроль анализа		Проверка ткани (окрашивание ткани)	Комментарии к тканям / неспецифические результаты
				0,5 мкг/мл	2 мкг/мл	0,5 мкг/мл	2 мкг/мл		
Пищевод	НТ 2110-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Неспецифическое окрашивание слизистой на нескольких стеклах; не исключало возможности интерпретации. Окрашивание редких ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Пищевод	НТ 2277-7	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Пищевод	НТ 2580-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Глаз	НТ 3048-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Сетчатка, сосудистая оболочка, склеры. Эндогенный пигмент меланин.
Глаз	НТ 2383-4	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Сетчатка, сосудистая оболочка, склеры. Эндогенный пигмент меланин.
Глаз	НТ 3041-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Сетчатка, сосудистая оболочка, склера, роговица, конъюнктива. Эндогенный пигмент меланин.
Фаллопиева труба (маточная труба)	НТ 2974-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание от отдельных до частых ядер в слизистой и редких ядер в стромальных клетках на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Фаллопиева труба (маточная труба)	НТ 2573-1	1,3	М	М	М	М	М	М	Фаллопиева труба в срезах не присутствует. Ткань указана как отсутствующая (Отс.). Замена на НТ 2970-1 в прогоне 4.
Фаллопиева труба (маточная труба)	НТ 2970-1	4,5	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Замена на НТ 2573-1. Окрашивание от отдельных до частых ядер в слизистой и редких ядер в стромальных клетках на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.

Ткань	Источник	Прогон	Исследуемый препарат (mAb1-1)	Контрольный препарат (MsIgG2a)		Контроль анализа		Проверка ткани (окрашивание ткани)	Комментарии к тканям / неспецифические результаты
				2 мкг/мл	0,5 мкг/мл	2 мкг/мл	0,5 мкг/мл		
Фаллопиева труба (маточная труба)	НТ 1953-1	1,3	М	М	М	М	М	М	Фаллопиева труба в срезах не присутствует. Ткань указана как отсутствующая (Отс.). Замена на НТ 2941-1 в прогоне 4.
Фаллопиева труба (маточная труба)	НТ 2941-1	4,5	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Замена на НТ 1953-1. Окрашивание от отдельных до частых ядер в слизистой и редких ядер в стромальных клетках на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Сердце	НТ 2791-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание редких ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Сердце	НТ 1270-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Сердце	НТ 2789-2	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание редких ядер на предметном стекле 1; специфичность оценена как неопределенная.
Почка ( клубочек, каналец)	НТ 2276-12	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Неспецифическое окрашивание содержимого трубчатого просвета на нескольких предметных стеклах; не исключало возможности интерпретации.
Почка ( клубочек, каналец)	НТ 1188-6	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Почка ( клубочек, каналец)	НТ 2114-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание редких ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Толстый кишечник (толстая кишка)	НТ 2169-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Неспецифическое окрашивание слизистой на нескольких стеклах; не исключало возможности интерпретации. Остаточная эндогенная пероксидаза (редкие оседлые лейкоциты).

Ткань	Источник	Прогон	Исследуемый препарат (mAb1-1)	Контрольный препарат (MsIgG2a)		Контроль анализа		Проверка ткани (окрашивание ткани)	Комментарии к тканям / неспецифические результаты
				2 мкг/мл	0,5 мкг/мл	2 мкг/мл	0,5 мкг/мл		
Толстый кишечник (толстая кишка)	НТ 2051-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Неспецифическое окрашивание слизистой на нескольких стеклах; не исключало возможности интерпретации. Остаточная эндогенная пероксидаза (редкие оседлые лейкоциты).
Толстый кишечник (толстая кишка)	НТ 2149-1	1,3	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Слизистая не представлена надлежащим образом в срезах. Ткань указана как не оцененная (Н/О). Замена на НТ 2170-1 в прогоне 4.
Толстый кишечник (толстая кишка)	НТ 2170-1	4,5	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Замена на НТ 2149-1. Неспецифическое окрашивание слизистой на нескольких стеклах; не исключало возможности интерпретации. Остаточная эндогенная пероксидаза (редкие оседлые лейкоциты).
Печень	НТ 1243-9	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Эндогенный желчный/билирубиновый пигмент.
Печень	НТ 3057-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Эндогенный желчный/билирубиновый пигмент. Остаточная эндогенная пероксидаза (редкие оседлые лейкоциты). Окрашивание отдельных ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Печень	НТ 3065-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Эндогенный желчный/билирубиновый пигмент. Окрашивание редких ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Лимфатический узел	НТ 2182-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Остаточная эндогенная пероксидаза (редкие оседлые лейкоциты).

Ткань	Источник	Прогон	Исследуемый препарат (mAb1-1)	Контрольный препарат (MsIgG2a)		Контроль анализа		Проверка ткани (окрашивание ткани)	Комментарии к тканям / неспецифические результаты
				2 мкг/мл	0,5 мкг/мл	2 мкг/мл	0,5 мкг/мл		
Лимфатический узел	НТ 2165-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Небольшой образец; оценен как адекватный. Экзогенный углеродный пигмент.
Лимфатический узел	НТ 2252-1	1,3	М	М	М	М	М	М	Лимфатический узел в срезах не присутствует. Ткань указана как отсутствующая (Отс.). Замена на НТ 2406-1 в прогоне 4.
Лимфатический узел	НТ 2406-1	4,5	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Замена на НТ 2252-1. Остаточная эндогенная пероксидаза (редкие оседлые лейкоциты). Экзогенный углеродный пигмент. Окрашивание отдельных ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Легкое	НТ 3056-1	1,3						Пол.	Экзогенный углеродный пигмент.
Эпителиальные клетки, бронхиоллярные клетки (цитоплазма, цитоплазматические гранулы)			1-2+ (редко)	1+ (очень редко)	Отр.	Отр.	Отр.		
Другие элементы			Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.		
Легкое	НТ 3131-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Экзогенный углеродный пигмент. Окрашивание отдельных ядер на предметном стекле 1; специфичность оценена как неопределенная.
Легкое	НТ 3130-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Экзогенный углеродный пигмент. Окрашивание от отдельных до частых ядер на предметном стекле 1; специфичность оценена как неопределенная.

Ткань	Источник	Прогон	Исследуемый препарат (mAb1-1)	Контрольный препарат (MsIgG2a)		Контроль анализа		Проверка ткани (окрашивание ткани)	Комментарии к тканям / неспецифические результаты
				2 мкг/мл	0,5 мкг/мл	2 мкг/мл	0,5 мкг/мл		
Молочная железа	НТ 2345-2	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Незначительное неспецифическое окрашивание внеклеточного материала в просветах протоков железы на нескольких предметных стеклах; не исключало возможности интерпретации.
Молочная железа	НТ 654-6	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Незначительное неспецифическое окрашивание внеклеточного материала в просветах протоков железы на нескольких предметных стеклах; не исключало возможности интерпретации.
Молочная железа	НТ 2349-4	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Незначительное неспецифическое окрашивание внеклеточного материала в просветах протоков железы на нескольких предметных стеклах; не исключало возможности интерпретации.
Мышца, поперечно-полосатая (скелетная)	НТ 1909-11	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Мышца, поперечно-полосатая (скелетная)	НТ1974-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Мышца, поперечнополосатая (скелетная)	НТ 1975-2	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Срезы также содержали периферический нерв.
Нерв, периферический	НТ 3159-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Нерв, периферический	НТ 3147-1	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Нерв, периферический	НТ 1179-2	1,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Небольшой образец; оценен как адекватный.
Яичник	НТ 2431-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Небольшой образец; оценен как адекватный.



Ткань	Источник	Прогон	Исследуемый препарат (mAb1-1)	Контрольный препарат (MsIgG2a)		Контроль анализа		Проверка ткани (окрашивание ткани)	Комментарии к тканям / неспецифические результаты
				0,5 мкг/мл	2 мкг/мл	0,5 мкг/мл	2 мкг/мл		
Яичник	НТ 2435-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Яичник	НТ 2443-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Поджелудочная железа	НТ 2248-2	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание от отдельных до частей ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная
Поджелудочная железа	НТ 2049-2	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание отдельных ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Поджелудочная железа	НТ 2039-2	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Неспецифическое окрашивание цитоплазмы отдельных ацинарных эпителиальных клеток на нескольких предметных стеклах; затрудняло, но не исключало возможности интерпретации. Окрашивание отдельных ядер на предметном стекле 1; специфичность оценена как неопределенная.
Плацента	НТ 2919-1	2,3						Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Трофобласты (мембрана, цитоплазма)			1-3+ (отд.)	1-3+ (редко)	Отр.	Отр.	Отр.		
Другие элементы			Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.		
Плацента	НТ 2392-1	2,3						Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Трофобласты (мембрана, цитоплазма)			1-3+ (част.)	1-3+ (от отд. до част.)	Отр.	Отр.	Отр.		
Другие элементы			Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.		
Плацента	НТ 1702-1	2,3						Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Трофобласты (мембрана, цитоплазма)			1-3+ (отд.)	1-3+ (от редк. до отд.)	Отр.	Отр.	Отр.		
Другие элементы			Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.		

Ткань	Источник	Прогон	Исследуемый препарат (mAb1-1)	Контрольный препарат (MsIgG2a)		Контроль анализа		Проверка ткани (окрашивание ткани)	Комментарии к тканям / неспецифические результаты
				2 мкг/мл	0,5 мкг/мл	2 мкг/мл	0,5 мкг/мл		
Предстательная железа	НТ 562-7	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание отдельных ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Предстательная железа	НТ 1730-3	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Предстательная железа	НТ 1926-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Гипофиз	НТ 3112-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Аденогипофиз. Окрашивание отдельных ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Гипофиз	НТ 3114-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Аденогипофиз и нейрогипофиз. Окрашивание отдельных ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Гипофиз	НТ 3199-1	2,3						Пол.	Аденогипофиз и нейрогипофиз.
Эпителиальные клетки, аденогипофиз (цитоплазма)			1-3+ (от редк. до отд.)	1-3+ (от редк. до отд.)	Отр.	Отр.	Отр.		
Другие элементы			Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.		
Паращитовидная железа	НТ 3012-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Паращитовидная железа	НТ 3153-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Паращитовидная железа	НТ 3152-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Слонная железа	НТ 3061-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Экзогенный пигмент из краски для маркировки тканей.
Слонная железа	НТ 3057-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Слонная железа	НТ 1226-6	2,3	М	М	М	М	М	М	Слонная железа в срезах не присутствует. Ткань указана как отсутствующая (Отс.). Замена на НТ 2297-1 в прогоне 4.

Ткань	Источник	Прогон	Исследуемый препарат (mAb1-1)	Контрольный препарат (MsIgG2a)		Контроль анализа		Проверка ткани (окрашивание ткани)	Комментарии к тканям / неспецифические результаты
				0,5 мкг/мл	2 мкг/мл	0,5 мкг/мл	2 мкг/мл		
Слюнная железа	НТ 2297-1	4,5	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Замена на НТ 1226-6. Окрашивание отдельных ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Кожа	НТ 2842-3	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Кожа	НТ 2930-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Эндогенный пигмент меланин.
Кожа	НТ 2936-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Эндогенный пигмент меланин.
Тонкий кишечник	НТ 2965-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Неспецифическое окрашивание слизистой на нескольких стеклах; не исключало возможности интерпретации. Остаточная эндогенная пероксидаза (редкие оседлые лейкоциты).
Тонкий кишечник	НТ 2662-1	2,3	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Н/О	Слизистая не представлена в срезах. Ткань указана как не оцененная (Н/О). Замена на НТ 2859-1 в прогоне 4.
Тонкий кишечник	НТ 2859-1	4,5	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Замена на НТ 2662-1. Неспецифическое окрашивание слизистой на нескольких стеклах; не исключало возможности интерпретации. Остаточная эндогенная пероксидаза (редкие оседлые лейкоциты). Окрашивание отдельных ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.

Ткань	Источник	Прогон	Исследуемый препарат (mAb1-1)	Контрольный препарат (MsIgG2a)		Контроль анализа		Проверка ткани (окрашивание ткани)	Комментарии к тканям / неспецифические результаты
				2 мкг/мл	0,5 мкг/мл	2 мкг/мл	0,5 мкг/мл		
Тонкий кишечник	НТ 2697-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Неспецифическое окрашивание слизистой на нескольких стеклах; не исключало возможности интерпретации. Остаточная эндогенная пероксидаза (редкие оседлые лейкоциты). Окрашивание отдельных ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Селезенка	НТ 1910-11	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Остаточная эндогенная пероксидаза (редкие оседлые лейкоциты). Окрашивание от отдельных до частых ядер на предметном стекле 1 и случайных ядер на предметном стекле 2; специфичность оценена как неопределенная.
Селезенка	НТ 2342-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Остаточная эндогенная пероксидаза (редкие оседлые лейкоциты).
Селезенка	НТ 2336-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Остаточная эндогенная пероксидаза (редкие оседлые лейкоциты). Окрашивание от редких до отдельных ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Спинной мозг	НТ 1047-3	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Эндогенный пигмент меланин. Окрашивание от редких до отдельных ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная. Окрашивание ядер иногда включает мембрану ядра.

Ткань	Источник	Прогон	Исследуемый препарат (mAb1-1)	Контрольный препарат (MsIgG2a)		Контроль анализа		Проверка ткани (окрашивание ткани)	Комментарии к тканям / неспецифические результаты
				2 мкг/мл	0,5 мкг/мл	2 мкг/мл	0,5 мкг/мл		
Спинальный мозг	НТ 2118-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание от отдельных до частых ядер на предметном стекле 1 и от редких до отдельных ядер на предметном стекле 2; специфичность оценена как неопределенная. Окрашивание ядер иногда включает мембрану ядра.
Спинальный мозг	НТ 2884-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание от отдельных до частых ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная. Окрашивание ядер иногда включает мембрану ядра.
Желудок	НТ 2939-1	2,3						Пол.	Образец состоял только из слизистой. Неспецифическое окрашивание слизистой на нескольких стеклах; не исключало возможности интерпретации.
Эпителиальные клетки, слизистая (базальная мембрана, базальная цитоплазма)			1-2+ (от редк. до отд.)	1-2+ (редко)	Отр.	Отр.	Отр.		
Другие элементы			Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.		
Желудок	НТ 3162-1	2,3,4						Пол.	Окрашивание на предметном стекле 1 в прогоне 2 отсутствует. Окрашивание повторили в прогоне 4, а интерпретация основана на оценке предметных стекол, окрашенных в прогоне 4.
Эпителиальные клетки, слизистая (базальная мембрана, базальная цитоплазма)			1-2+ (от редк. до отд.)	1-2+ (редко)	Отр.	Отр.	Отр.		
Другие элементы			Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.		
Желудок	НТ 3018-1	2,3						Пол.	Неспецифическое окрашивание слизистой на нескольких стеклах; не исключало возможности интерпретации.

Ткань	Источник	Прогон	Исследуемый препарат (mAb1-1)	Контрольный препарат (MsIgG2a)	Контроль анализа		Проверка ткани (окрашивание ткани)	Комментарии к тканям / неспецифические результаты
					2 мкг/мл	0,5 мкг/мл		
Эпителиальные клетки, слизистая (базальная мембрана, базальная цитоплазма)			1-2+ (от редк. до отд.)	1-2+ (от редк. до отд.)	Отр.	Отр.	Отр.	
Другие элементы			Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	
Яички	НТ 1316-3	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол. Комментарии по тканям отсутствуют.
Яички	НТ 2276-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол. Комментарии по тканям отсутствуют.
Яички	НТ 3064-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол. Комментарии по тканям отсутствуют.
Щитовидная железа	НТ 682-4А	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол. Комментарии по тканям отсутствуют.
Щитовидная железа	НТ 483	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол. Окрашивание редких ядер на предметном стекле 1; специфичность оценена как неопределенная.
Щитовидная железа	НТ 478	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол. Окрашивание частых ядер на предметных стеклах 1 и 2; специфичность оценена как неопределенная.
Тимус	НТ 1405-3	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол. Незначительное неспецифическое окрашивание телец Гассали на нескольких предметных стеклах; не исключало возможности интерпретации. Остаточная эндогенная пероксидаза (редкие оседлые лейкоциты).
Тимус	НТ 1495-12	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол. Комментарии по тканям отсутствуют.
Тимус	НТ 1404-3	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол. Незначительное неспецифическое окрашивание телец Гассали на нескольких предметных стеклах; не исключало возможности интерпретации. Остаточная эндогенная пероксидаза (редкие оседлые лейкоциты).

Ткань	Источник	Прогон	Исследуемый препарат (mAb1-1)	Контрольный препарат (MsIgG2a)		Контроль анализа		Проверка ткани (окрашивание ткани)	Комментарии к тканям / неспецифические результаты
				2 мкг/мл	0,5 мкг/мл	2 мкг/мл	0,5 мкг/мл		
Миндалевидная железа	НГ 2962-2	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Остаточная эндогенная пероксидаза (редкие оседлые лейкоциты).
Миндалевидная железа	НГ 3122-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Остаточная эндогенная пероксидаза (редкие оседлые лейкоциты).
Миндалевидная железа	НГ 3171-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Эндогенный гемовый пигмент.
Мочеточник	НГ 2765-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Мочеточник	НГ 2726-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.
Мочеточник	НГ 1763-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Эндогенный гемовый пигмент. Окрашивание редких ядер на предметном стекле 1; специфичность оценена как неопределенная.
	Таблиц а 2								
Матка (эндометрий)	НГ 3075-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание редких ядер на предметном стекле 1; специфичность оценена как неопределенная.
Матка (эндометрий)	НГ 2910-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Окрашивание редких ядер на предметном стекле 1; специфичность оценена как неопределенная.
Матка (эндометрий)	НГ 3074-1	2,3	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Отр.	Пол.	Комментарии по тканям отсутствуют.

± — неопределенный, 1+ — слабый, 2+ — средний, 3+ — сильный, 4+ — интенсивный, Отр. — отрицательный, Пол. — положительный, М — отсутствует, Н/О — не оценивали, Н/Окр. — не окрашен, отд. — отдельные, част. — частые. Модификаторы частоты были включены для получения приблизительного процента окрашивания ожидаемого количества клеток данного типа или тканевого элемента в данной локализации. Частота клеток с окрашиванием была идентифицирована следующим образом: очень редкие (< 1% клеток конкретного типа); редкие (1–5% клеток конкретного типа); от редких до отдельных (> 5 –25% клеток конкретного типа); отдельные (> 25 –50% клеток конкретного типа); от отдельных до частых (> 50 –75% клеток конкретного типа); частые (> 75 –100% клеток конкретного типа).

[0315] В целом, в приведенной ниже формуле изобретения используемые термины не следует толковать как ограничивающие формулу изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в описании и формуле изобретения, но следует считать как

включающие все возможные варианты осуществления вместе с полным объемом эквивалентов, на которые претендует такая формула изобретения. Соответственно, формула изобретения не ограничивается настоящим описанием.



## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий связывающий GPC3 домен, причем связывающий GPC3 домен содержит последовательности трех определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) с SEQ ID NO: 3 и последовательности трех CDR легкой цепи (LCDR) вариабельной области легкой цепи (LCVR) с SEQ ID NO: 14.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, в котором связывающий GPC3 домен содержит первый домен, содержащий три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и второй домен, содержащий три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), причем

- (i) HCDR1 имеет последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 5–7;
- (ii) HCDR2 имеет последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 8–10;
- (iii) HCDR3 имеет последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 11–13;
- (iv) LCDR1 имеет последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 16–18;
- (v) LCDR2 имеет последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 19–21; и
- (vi) LCDR3 имеет последовательность в соответствии с любой из SEQ ID NO: 22–24.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–2, которое содержит первый домен, содержащий три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), и второй домен, содержащий три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), причем:

HCDR и LCDR содержат:

- (i) HCDR1 в соответствии с любой из SEQ ID NO: 5–7; HCDR2 в соответствии с любой из SEQ ID NO: 8–10; HCDR3 в соответствии с любой из SEQ ID NO: 11–13; LCDR1 в соответствии с любой из SEQ ID NO: 16–18; LCDR2 в соответствии с любой из SEQ ID NO: 19–21; LCDR3 в соответствии с любой из SEQ ID NO: 22–24.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–3, которое содержит первый переменный домен тяжелой цепи, содержащий три HCDR, и переменный домен легкой цепи, содержащий три LCDR, причем:

(i) переменный домен тяжелой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 45; и

(ii) переменный домен легкой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 47.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, которое содержит первый переменный домен тяжелой цепи, содержащий три HCDR, и переменный домен легкой цепи, содержащий три LCDR, причем:

(i) переменный домен тяжелой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 3 и переменный домен легкой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 14;

(ii) переменный домен тяжелой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 27 и переменный домен легкой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 29;

(iii) переменный домен тяжелой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 33 и переменный домен легкой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 35;

(iv) переменный домен тяжелой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 39 и переменный домен легкой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 41; или

(v) переменный домен тяжелой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 45 и переменный домен легкой цепи по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 47.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–5, в котором три HCDR и три LCDR состоят из одного полипептида.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–6, в котором антигенсвязывающий фрагмент содержит scFv.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7, в котором scFv содержит аминокислотную последовательность в соответствии с одной из SEQ ID NO: 25, 31, 37, 43 или 49.
9. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1–8.
10. Химерный антигенный рецептор, состоящий из антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1–8.
11. Химерный антигенный рецептор по п. 10, дополнительно содержащий трансмембранный домен 4-1BB/CD137, альфа-цепь Т-клеточного рецептора, бета-цепь Т-клеточного рецептора, 2B4, CD3 эпсилон, CD4, CD5, CD8 альфа, CD9, CD16, CD19, CD22, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, NKG2D или дзета-цепь Т-клеточного рецептора или любую их комбинацию.
12. Нуклеиновая кислота, содержащая химерный антигенный рецептор по п. 10 или 11.
13. Рекombинантный вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты по п. 9 или 12.
14. Рекombинантный вектор или нуклеиновая кислота по п. 12 или 13, в котором рекombинантный вектор дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую доминантный негативный рецептор TGF $\beta$  (DN TGF $\beta$ R), содержащий: внеклеточный домен (ECD) TGF- $\beta$  рецептора и трансмембранный домен (TMD), причем рекombинантный полипептид не содержит аминокислотных остатков, ответственных за передачу сигналов и фосфорилирование, которые присутствуют в рецепторе TGF- $\beta$  дикого типа.
15. Клетка-хозяин, трансдуцированная с помощью нуклеиновой кислоты по п. 9 или 12 или рекombинантного вектора по п. 13 или 14.
16. Клетка-хозяин, трансформированная с помощью: нуклеиновой кислоты по п. 9 или 12 и

нуклеиновой кислоты, кодирующей доминантный негативный рецептор TGF $\beta$  (DN TGF $\beta$ R).

17. Клетка-хозяин по п. 15 или 16, которая трансформируется с помощью нуклеиновой кислоты, кодирующей мембраносвязанный химерный рецептор суши-домена IL-15-IL-15R  $\alpha$ .

18. Клетка-хозяин по любому из пп. 15–17, которая содержит iPSC, T-клетку или NK-клетку.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая T-клетку и/или NK-клетку по п. 18.

20. Способ лечения заболевания у нуждающегося в этом пациента, включающий введение пациенту T-клетки и/или NK-клетки по п. 18 или фармацевтической композиции по п. 19.

21. Способ по п. 20, в котором заболевание представляет собой гепатоцеллюлярную карциному, плоскоклеточную карциному легкого, рак пищевода (адено и плоскоклеточную карциному), рак головы и шеи, рак желудка, меланому, мезотелиому, рак шейки матки, рак яичников, рак молочной железы, рак яичка, холангиокарциному, рак толстой кишки, липосаркому, шванному или любую их комбинацию.

22. Способ индуцирования иммунного ответа у субъекта или иммунизации субъекта против гепатоцеллюлярной карциномы, который включает введение субъекту T-клетки и/или NK-клетки по п. 18 или фармацевтической композиции по п. 19.

23. Способ по любому из пп. 20–22, в котором T-клетка и/или NK-клетка является аллогенной для пациента.