

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490022 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.05.08(51) Int. Cl. C07K 19/00 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2022.07.12

## (54) КОМПОЗИЦИЯ, РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВЕКТОР, КЛЕТКА С НОВЫМ ХИМЕРНЫМ РЕЦЕПТОРОМ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202110793058.6

(72) Изобретатель:

(32) 2021.07.14

Сунь Миньминь, Ли Яньтао, Ван

(33) CN

Ютао, Хао Жуйдун, Чжун Юньпэн, И

(86) PCT/CN2022/105029

Цяююн (CN)

(87) WO 2023/284700 2023.01.19

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Нилова М.И. (RU)

СУЧЖОУ ИММУНОФОКО

БИОТЕКНОЛОДЖИ КО., ЛТД (CN)

(57) Композиция, рекомбинантный вектор, клетка с новым химерным рецептором и их применение. Композиция с новым химерным рецептором содержит обычный химерный антигенный рецептор (CAR) и химерный рецептор NKG2D, содержащий полноразмерную последовательность или усеченный фрагмент NKG2D, DAP10 и/или DAP12, называемый CAR, снабженный SNR. Композиция с химерным рецептором позволяет обычной CAR-T-клетке экспрессировать внеклеточный домен NKG2D и внутриклеточный сигнальный домен, расширяет спектр распознавания CAR-T-антигена, решает проблему гетерогенности опухолей, достигает более низкого уровня высвобождения цитокинов, при одновременном улучшении способности CAR-T уничтожать опухолевые клетки, экспрессирующих целевые антигены, снижает вероятность возникновения цитокинового шторма и повышает безопасность применения CAR-T.

21007	CAR
21067	CAR P2A DAP12ICD DAP10ICD NKG2DFL
21068	CAR P2A DAP12ICD DAP10ICD NKG2DECD+TM
21069	CAR P2A NKG2DECD DAP10FL DAP12ICD
21070	CAR P2A NKG2DECD CD8 HINGE+TM DAP10ECD DAP12ICD
21071	CAR P2A NKG2DECD CD8 HINGE+TM 4-1BB DAP12ICD
21072	CAR P2A NKG2DECD CD28 HINGE+TM+ICD DAP12ICD
21073	CAR DAP12FL
21074	CAR P2A NKG2DFL T2A DAP12FL P2A DAP10FL

A1

202490022

202490022

A1

# **КОМПОЗИЦИЯ, РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВЕКТОР, КЛЕТКА С НОВЫМ ХИМЕРНЫМ РЕЦЕПТОРОМ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

## **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет китайской патентной заявки № 202110793058.6, поданной в Национальное управление интеллектуальной собственности Китая 14 июля 2021 г. и озаглавленной «КОМПОЗИЦИЯ, РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВЕКТОР, КЛЕТКА С НОВЫМ ХИМЕРНЫМ РЕЦЕПТОРОМ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ», которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

## **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

[0002] Настоящее изобретение относится к области биомедицины и, в частности, к композиции, рекомбинантному вектору, клетке с новым химерным рецептором и их применениям.

## **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[0003] Обычные методы лечения опухолей включают хирургическое вмешательство, лучевую терапию, химиотерапию, нацеленную терапию и т. д. В последние годы развивается иммунотерапия, особенно терапия, направленная на иммунные контрольные точки, например, с применением ингибиторов сигнальных путей CTLA-4 и PD-1/PD-L1, а также адоптивная клеточная терапия, например, CAR-T-терапия принесла глубокие изменения в область лечения опухолей. Адоптивная клеточная терапия включает применение клеток TIL, NK, TCR-T, CAR-T/NK/NKT/TIL/Mφ и т. д., среди которых CD19-нацеленная CAR-T-терапия достигла превосходной клинической эффективности при лечении B-клеточных опухолей, и в 2017 году FDA одобрило два препарата CAR-T для лечения B-клеточного лейкоза или лимфомы.

[0004] Хотя был достигнут значительный прогресс в лечении гематологических опухолей с помощью CAR-T-терапии, частота побочных эффектов, таких как цитокиновый шторм, относительно высока при лечении гематологических опухолей. Большинству пациентов, получающих CAR-T-терапию, необходимы вспомогательные меры для смягчения побочных эффектов, вызванных цитокиновым штормом. Одной из важных причин низкой эффективности CAR-T-терапии при лечении солидных опухолей является их гетерогенность. У CAR-T-клеток наблюдается слабая способность уничтожать солидные опухоли и они не способны полностью удалять опухолевые клетки. Кроме того, по сравнению с CAR-T-терапией, применяемой для лечения гематологических опухолей, CAR-T-терапия в отношении солидных опухолей вызывает более высокую частоту и более высокий уровень цитокинового шторма, а также более серьезные побочные эффекты, и характеризуется более низким соотношением клинической пользы и риска, тем самым препятствуя внедрению CAR-T-терапии для лечения пациентов с клиническими солидными опухолями.

**[0005]** В существующих решениях обычно используются двойные мишени для решения проблемы гетерогенности опухолей. Такие решения, применяемые либо во время лечения с применением антител, либо до него, симптоматически ограничивают цитокиновый шторм, или применяются «аварийные выключатели», разработанные для CAR-T-клеток. В случае цитокинового шторма или чрезмерной пролиферации CAR-T-клеток такие антитела нейтрализуют цитокины или удаляют CAR-T-клетки, тем самым смягчая токсические побочные эффекты, ассоциированные с CAR-T-терапией.

**[0006]** На своей поверхности NK-клетки экспрессируют NKG2D и инициируют последующие сигнальные молекулы DAP10 и DAP12 после распознавания соответствующих лигандов, таких как MICA или MICB, тем самым уничтожая клетки-мишени. Т-клетки также экспрессируют NKG2D на своей поверхности и экспрессируют DAP10, но не содержат во внутриклеточном пространстве молекулы DAP12. В нормальных условиях рецепторы NKG2D на поверхности Т-клеток не могут эффективно активировать внутриклеточные сигнальные молекулы после распознавания их лигандов, что приводит к неспособности удалять клетки-мишени. Настоящее изобретение направлено на разработку экспрессии внеклеточного домена NKG2D и внутриклеточного сигнального домена в обычных CAR-T-клетках для расширения спектра распознавания CAR-T-антигенов и одновременного решения проблемы гетерогенности опухолей.

## **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0007]** Для преодоления недостатков предшествующего уровня техники в настоящем изобретении предлагается композиция или слитый белок, рекомбинантный вектор, клетка с новым химерным рецептором и их применение, которые расширяют спектр распознавания CAR-T-антигена, одновременно решая проблему гетерогенности опухолей, снижая вероятность появления цитокинового шторма и повышая безопасность CAR-T-терапии.

**[0008]** Для достижения поставленных целей в настоящем изобретении предлагаются следующие технические решения.

**[0009]** В первом аспекте настоящего изобретения предлагается композиция или слитый белок с новым химерным рецептором, включающие химерный антигенный рецептор и химерный рецептор NKG2D, содержащий полноразмерную последовательность или усеченный фрагмент NKG2D, DAP10 и/или DAP12.

**[0010]** Кроме того, композиция или слитый белок с новым химерным рецептором содержат химерный антигенный рецептор и химерный рецептор NKG2D, и при этом химерный рецептор NKG2D содержит последовательности внеклеточного домена NKG2D и внутриклеточного домена DAP12.

**[0011]** Кроме того, химерный рецептор NKG2D дополнительно содержит костимулирующую молекулу, выбранную из группы, состоящей из CD28, 4-1BB, DAP10, ICOS, OX40 и CD40.

**[0012]** Кроме того, химерный антигенный рецептор содержит внеклеточный домен распознавания, внеклеточный шарнирный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

**[0013]** Кроме того, внеклеточный домен распознавания содержит антитело или его фрагмент, которые распознают опухолеассоциированный антиген или опухолеспецифический антиген.

**[0014]** Кроме того, опухолеассоциированный антиген или опухолеспецифический антиген выбран из группы, состоящей из CD19, BCMA, CD22, CD20, CD123, CD30, CD38, CD138, CD56, CD7, CLL-1, CD10, CD34, CS1, CD16, CD4, CD5, IL-1-RAP, ITGB7, k-IgG, TAC1, TRBC1, MUC1, NKG2D, PD-L1, CD133, CD177, LeY, CD70, ROR1, AFP, AXL, CD80, CD86, DLL3, DR5, FAP, LMP1, MAGE-A1, MAGE-A4, MG7, MUC16, PMEL, ROR2, VEGFR2, CD171, клаудина 18.2, клаудина 6, EphA2, ErbB, Fra, PSCA, cMet, IL13Ra2, EPCAM, EGFR, PSMA, EGFRvIII, GPC3, CEA, HER2, GD2 и мезотелина.

**[0015]** Кроме того, шарнирный домен содержит последовательность, полученную из по меньшей мере одного из следующих элементов: CD8 $\alpha$ , CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, CD40, CD80 и IgG; трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из по меньшей мере одного из следующих элементов: CD2, CD27, LFA-1 (CD11a/CD18), CD8 $\alpha$ , CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, CD40, CD80, CD3 $\zeta$  и CD3 $\epsilon$ ; и внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность, полученную из по меньшей мере одного из следующих элементов: Toll-подобный рецептор, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a/CD18), CD8 $\alpha$ , CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, CD40, CD80, DAP10, DAP12, CD3 $\zeta$  и CD3 $\epsilon$ .

**[0016]** Кроме того, композиция с химерным рецептором содержит соединительный пептид для соединения химерного антигенного рецептора с химерным рецептором, и при этом указанный соединительный пептид представляет собой саморасщепляющийся полипептид, т. е. пептид 2A, включающий F2A, P2A, T2A и E2A, и предпочтительно указанный соединительный пептид представляет собой пептид P2A с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 9.

**[0017]** Кроме того, аминокислотная последовательность химерного рецептора выбрана из последовательности от SEQ ID NO. 1 до SEQ ID NO. 8, и предпочтительно SEQ ID NO. 3 или SEQ ID NO. 6.

**[0018]** Во втором аспекте настоящего изобретения предлагается нуклеиновая кислота, кодирующая композицию или слитый белок с химерным рецептором.

**[0019]** В третьем аспекте настоящего изобретения предлагается вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту.

**[0020]** В четвертом аспекте настоящего изобретения предлагается клетка, которая экспрессирует композицию или слитый белок с химерным рецептором, либо содержит нуклеиновую кислоту или вектор.

[0021] Кроме того, указанная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клеток, НК-клеток, дендритных клеток (DC) и макрофагов.

[0022] Кроме того, Т-клетка выбрана из Т-клетки  $\alpha\beta$ , Т-клетки  $\gamma\delta$  или НКТ-клетки.

[0023] В пятом аспекте настоящего изобретения предлагается биологический агент для лечения опухолей, который содержит клетку в качестве основного активного ингредиента.

[0024] В шестом аспекте настоящего изобретения предлагается способ получения указанной клетки, включающий этап трансфекции клетки вектором.

[0025] В седьмом аспекте настоящего изобретения предлагается применение композиции, нуклеиновой кислоты, вектора или клетки с химерным рецептором для приготовления противоопухолевого лекарственного средства.

[0026] По сравнению с существующей технологией вышеупомянутые технические решения по настоящему изобретению дают следующие технические преимущества:

[0027] Композиция или слитый белок с химерным рецептором согласно настоящему изобретению позволяют обычной CAR-T-клетке экспрессировать внеклеточный домен NKG2D и внутриклеточный сигнальный домен, расширяют спектр распознавания CAR-T-антигена, решают проблему гетерогенности опухолей, обеспечивают более низкий уровень цитокинов, при одновременном улучшении способности CAR-T-клеток уничтожать опухолевые клетки, экспрессирующих целевые антигены, снижают вероятность возникновения цитокинового шторма и повышают безопасность CAR-T-терапии.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

[0028] На ФИГ. 1 показана экспрессия мРНК лигандов CLDN18.2 и NKG2D в моделях PDX, воспроизводящих рак желудка (А), рак поджелудочной железы (В) и рак пищевода (С), согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

[0029] На ФИГ. 2 показана экспрессия белков лигандов CLDN18.2 и NKG2D в тканевых чипах рака желудка согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

[0030] На ФИГ. 3 представлена схематическая структурная диаграмма композиции с химерным акцептором с наименованиями последовательностей 21007 и 21067-21074 согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

[0031] На ФИГ. 4 показаны результаты экспрессии анти-CLDN18.2-CAR и NKG2D в сконструированных CAR-T-клетках согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

[0032] На ФИГ. 5 показан высокий уровень экспрессии CLDN18.2 в сконструированной клеточной линии 293-CLDN18.2 согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

[0033] На ФИГ. 6 показано, что лиганд MICA/B NKG2D экспрессируется в 293Т на

относительно высоком уровне согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

**[0034]** На ФИГ. 7 показан киллерный эффект CAR-T-клеток, снабженных SNR, на клеточную линию 293-CLDN18.2 согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

**[0035]** На ФИГ. 8 показана кратность пролиферация CAR-T-клеток, совместно инкубированных с клеточной линией 293-CLDN18.2, согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

**[0036]** На ФИГ. 9 показан киллерный эффект CAR-T-клеток, снабженных SNR, на клетки 293T согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

**[0037]** На ФИГ. 10 показано, что CAR-T-клетки, снабженные SNR, демонстрируют более низкие уровни секреции цитокинов при уничтожении клеток-мишеней 293-CLDN18.2 согласно варианту осуществления настоящего изобретения, где на ФИГ. 10 A-D показаны уровни секреции IL-2, IFN- $\gamma$ , IL6 и TNF- $\alpha$  соответственно.

**[0038]** На ФИГ. 11 показано, что CAR-T-клетки, снабженные SNR, высвобождают умеренные уровни цитокинов при уничтожении клеток-мишеней, экспрессирующих MICA/B согласно варианту осуществления настоящего изобретения, где на ФИГ. 11 AD показаны уровни секреции IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL6 и IL-2 соответственно.

**[0039]** На ФИГ. 12 представлена схематическая диаграмма CLDN18.2 CAR, снабженных SNR, согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

**[0040]** На ФИГ. 13 представлена диаграмма, демонстрирующая результат экспрессии ULBP2/5/6 клетками A431 согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

**[0041]** На ФИГ. 14 представлена диаграмма, демонстрирующая результаты экспериментов по уничтожению *in vitro* и секреции цитокинов согласно варианту осуществления настоящего изобретения, где столбцы на ФИГ. C и ФИГ. D представляют слева направо unT, 21047, 21326, 21327, 21328 и 21329 соответственно.

**[0042]** На ФИГ. 15 показано влияние SNR на пролиферацию, фенотип памяти и истощение CAR-T-клеток согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

**[0043]** На ФИГ. 16 показан экспериментальный результат исследования эффективности гомогенной экспрессии CLDN18.2 на модели *in vivo* согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

**[0044]** На ФИГ. 17 показан эксперимент по повторному внедрению клеток A431 согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

**[0045]** На ФИГ. 18 показан эксперимент по определению эффективности на модели опухоли A431 согласно варианту осуществления настоящего изобретения, где столбцы на ФИГ. B представляют слева направо PBS, UNT, 21047, 21327, 21328 и 21329 соответственно, и группа PBS совпадает с осью абсцисс.

[0046] На ФИГ. 19 показан результат эксперимента по определению эффективности на модели гетерогенной опухоли CLDN18.2 согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

[0047] На ФИГ. 20 показана схематическая диаграмма EPCAM CAR и CD19 CAR, снабженных SNR, согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

[0048] На ФИГ. 21 показаны результаты экспрессии анти-EPCAM-CAR, анти-CD19-CAR и NKG2D в сконструированной CAR-T-клетке согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

[0049] На ФИГ. 22 представлена диаграмма экспериментальных результатов уничтожения *in vitro* и секреции IFN- $\gamma$  для EPCAM CAR-T согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

[0050] На ФИГ. 23 представлена диаграмма экспериментальных результатов уничтожения *in vitro* и секреции IFN- $\gamma$  для CD19 CAR-T согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

[0051] В настоящем изобретении композицию или слитый белок с химерным рецептором конструируют путем добавления химерного рецептора NKG2D, содержащего полноразмерную последовательность или усеченный фрагмент NKG2D, DAP10 и/или DAP12, на основе экспрессионного вектора обычного химерного антигенного рецептора. Указанный вектор упакован в лентивирус, который используется для трансдукции клеток с целью получения иммунных клеток, нацеленных на CLDN18.2 и одновременно экспрессирующих NKG2D, тем самым повышается безопасность терапии иммунными клетками.

[0052] «Полноразмерная последовательность NKG2D, DAP10 и/или DAP12» означает, что обязательно содержится полноразмерная последовательность NKG2D, а также одна или обе полноразмерные последовательности DAP10 и DAP12.

[0053] В некоторых вариантах осуществления содержится усеченный фрагмент химерного рецептора NKG2D, а также одна или обе полноразмерные последовательности DAP10 и DAP12. Усеченный фрагмент химерного рецептора NKG2D может представлять собой либо усеченный фрагмент внутриклеточного домена (ICD), либо усеченный фрагмент внеклеточного домена (ECD) NKG2D.

[0054] В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается композиция или слитый белок с новым химерным рецептором, содержащие химерный антигенный рецептор и химерный рецептор NKG2D, который содержит полноразмерную последовательность или усеченный фрагмент NKG2D, DAP10 и/или DAP12.

[0055] В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения композиция

или слитый белок с химерным рецептором содержит химерный антигенный рецептор и химерный рецептор NKG2D, при этом указанный химерный рецептор NKG2D содержит последовательности внеклеточного домена NKG2D и внутриклеточного домена DAP12.

**[0056]** В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения химерный рецептор NKG2D дополнительно содержит костимулирующую молекулу, выбранную из группы, состоящей из CD28, 4-1BB, DAP10, ICOS, OX40 и CD40.

**[0057]** В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения химерный антигенный рецептор содержит внеклеточный домен распознавания, внеклеточный шарнирный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

**[0058]** В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения внеклеточный домен распознавания содержит антитело или его фрагмент, которые распознают опухолеассоциированный антиген или опухолеспецифический антиген.

**[0059]** В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения опухолеассоциированный антиген или опухолеспецифический антиген выбран из группы, состоящей из CD19, BCMA, CD22, CD20, CD123, CD30, CD38, CD138, CD56, CD7, CLL-1, CD10, CD34, CS1, CD16, CD4, CD5, IL-1-RAP, ITGB7, k-IgG, TAC1, TRBC1, MUC1, NKG2D, PD-L1, CD133, CD177, LeY, CD70, ROR1, AFP, AXL, CD80, CD86, DLL3, DR5, FAP, LMP1, MAGE-A1, MAGE-A4, MG7, MUC16, PMEL, ROR2, VEGFR2, CD171, клаудина 18.2, клаудина 6, EphA2, ErbB, Fra, PSCA, cMet, IL13Ra2, EPCAM, EGFR, PSMA, EGFRvIII, GPC3, CEA, HER2, GD2 и мезотелина, не ограничиваясь ими.

**[0060]** В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения шарнирный домен содержит последовательность, полученную из по меньшей мере одного из следующих элементов: CD8 $\alpha$ , CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, CD40, CD80 и IgG; трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из по меньшей мере одного из следующих элементов: CD2, CD27, LFA-1 (CD11a/CD18), CD8 $\alpha$ , CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, CD40, CD80, CD3 $\zeta$  и CD3 $\epsilon$ ; и внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность, полученную из по меньшей мере одного из следующих элементов: Toll-подобный рецептор, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a/CD18), CD8 $\alpha$ , CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, CD40, CD80, DAP10, DAP12, CD3 $\zeta$  и CD3 $\epsilon$ .

**[0061]** В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения аминокислотная последовательность химерного антигенного рецептора представляет собой SEQ ID NO. 19.

**[0062]** В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения композиция или слитый белок с химерным рецептором дополнительно содержат соединительный пептид для соединения химерного антигенного рецептора с химерным рецептором, и при этом указанный соединительный пептид представляет собой саморасщепляющийся полипептид, т. е. пептид 2A, включающий F2A, P2A, T2A и E2A, и предпочтительно соединительный

пептид представляет собой P2A с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 9.

**[0063]** В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения аминокислотная последовательность химерного рецептора выбрана из последовательности от SEQ ID NO. 1 до SEQ ID NO. 8, и предпочтительно SEQ ID NO. 3 или SEQ ID NO. 6.

**[0064]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается нуклеиновая кислота, кодирующая композицию или слитый белок с химерным рецептором.

**[0065]** В контексте настоящего документа термин «нуклеиновые кислоты» включает в себя варианты с консервативными заменами (например, заменами вырожденных кодонов) и комплементарными последовательностями, а также варианты, оптимизированные по кодонам, для более эффективной экспрессии в требуемой клетке-хозяине. Нуклеиновая кислота обычно представляет собой РНК или ДНК, включающие ген, молекулу кДНК, молекулу мРНК и их фрагмент, такой как олигонуклеотид. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно является двухцепочечной ДНК. При формировании функциональной связи с другой нуклеиновой кислотой нуклеиновая кислота является «эффективно соединенной». Например, если промотор или энхансер влияет на транскрипцию кодирующей последовательности, то этот промотор или энхансер эффективно соединен с кодирующей последовательностью. При соединении с вектором молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно представляет собой нуклеиновую кислоту ДНК.

**[0066]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается вектор, содержащий нуклеиновую кислоту.

**[0067]** Термин «вектор» относится к средству доставки нуклеиновой кислоты, в которое может быть вставлен полинуклеотид. Если вектор обеспечивает экспрессию вставленного белка, кодируемого полинуклеотидом, такой вектор называется экспрессионным вектором. Вектор может проникать в клетку-хозяина посредством трансформации, трансдукции или трансфекции, таким образом, чтобы элемент генетического материала, переносимый вектором, экспрессировался в клетке-хозяине. Вектор хорошо известен специалисту в данной области и включает, помимо прочего, плазмиду, плазмиду CRISPR/CAS, фагмиду, космиду, искусственную хромосому (например, искусственную дрожжевую хромосому (YAC), искусственную бактериальную хромосому (BAC) или искусственную хромосому, полученную из P1 (PAC)), фаг (фаг  $\lambda$  или фаг M13) и вирус животных. Вирус животных, который может служить вектором, включает, помимо прочего, ретровирус, лентивирус, аденовирус, аденоассоциированный вирус, герпесвирус (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, папилломавирус и вирус папилломы (например, CB40). В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор по настоящему изобретению включает регуляторный элемент, обычно используемый в геномной инженерии, например, энхансер, промотор, сайт внутренней посадки рибосомы (IRES) и другой элемент контроля экспрессии (например, сигнал терминации транскрипции), или сигнал полиаденилирования и последовательность

полиU).

**[0068]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается клетка, которая экспрессирует композицию или слитый белок с химерным рецептором, либо содержит нуклеиновую кислоту или вектор.

**[0069]** Клетка предпочтительно представляет собой клетку-иммунокиллер.

**[0070]** В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клеток, НК-клеток, дендритных клеток (DC) и макрофагов.

**[0071]** Т-клетка в настоящем изобретении может включать подкатегории, хорошо известные в данной области, например, одну или большее количество из следующих клеток: Т-хелперная клетка, цитотоксическая Т-клетка, Т-клетка памяти, регуляторная Т-клетка, МАИТ-клетка, НКТ-клетка и Т-клетка  $\gamma\delta$ . В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения Т-клетка представляет собой Т-клетку  $\alpha\beta$ , Т-клетку  $\gamma\delta$  или НКТ-клетку.

**[0072]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается биологический агент для лечения опухоли, который содержит клетку в качестве основного активного ингредиента, и предпочтительно биологический агент дополнительно содержит фармацевтически приемлемый вектор, разбавитель и/или вспомогательное вещество.

**[0073]** В контексте настоящего документа фраза «фармацевтически приемлемый вектор, разбавитель и/или вспомогательное вещество» включает в себя любое вещество, которое позволяет компоненту оставаться биологически активным при комбинировании с активным компонентом и которое не вызывает реакции иммунной системы субъекта. Пример включает, помимо прочего, любой стандартный вектор-носитель лекарственного средства (например, фосфатно-солевой буферный раствор, воду, эмульсию (например, масляную или водную эмульсию)) и различные типы смачивающих агентов. Типовыми разбавителями для аэрозольного или парентерального введения являются фосфатно-солевой буфер (PBS) или физиологический солевой раствор (0,9%). Композицию, содержащую такой вектор, готовят хорошо известным традиционным способом (см., например, публикации Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; и Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 21st edition, Mack Publishing, 2005).

**[0074]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ получения клетки, включающий этап трансфекции клетки вектором.

**[0075]** В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагается применение композиции, нуклеиновой кислоты, вектора или клетки с химерным рецептором для получения противоопухолевого лекарственного средства.

**[0076]** В предпочтительном варианте осуществления изобретения противоопухолевое лекарственное средство применяют для лечения гетерогенной опухоли.

[0077] В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения гетерогенная опухоль содержит по меньшей мере NKG2DL-позитивные опухолевые клетки и опухолевые клетки, на которые нацелен химерный антигенный рецептор.

[0078] Настоящее изобретение подробно описано с помощью конкретных примеров и графических материалов, приведенных ниже, чтобы лучше понять настоящее описание, но следующие примеры не накладывают ограничений на объем настоящего изобретения.

[0079] В примерах, если не указано иное, указанный способ представляет собой обычный способ; и, если не указано иное, используемый реагент представляет собой обычный коммерчески доступный реагент или реагент, получаемый обычным способом.

#### **[0080] Пример 1. Обнаружение экспрессии лигандов CLDN18.2 и NKG2D в тканях рака желудка**

[0081] Авторы изобретения сначала анализировали экспрессию мРНК CLDN18.2 и NKG2DL в тканях PDX, полученных из раковой ткани желудка, поджелудочной железы и пищевода, используя базу данных PDX (т. е. CrownBio), и получили результаты, приведенные на ФИГ. 1, в которых положительные показатели CLDN18.2 в тканях PDX, полученных из раковых тканей желудка, поджелудочной железы и пищевода, составляли 63%, 82% и 26%, и в большинстве тканей наблюдалась экспрессия по меньшей мере одного лиганда NKG2D или CLDN18.2. Аналогичным образом, авторы изобретения обнаружили экспрессию CLDN18.2 и лигандов NKG2D (т. е. MICA, MICB и ULBP1–6) в тканевых чипах клеток рака желудка (коммерчески доступных от Bioaitech) и получили результаты, согласующиеся с результатами из базы данных PDX, при этом большинство тканей экспрессировали по меньшей мере один лиганд NKG2D или CLDN18.2 (ФИГ. 2). Приведенные выше результаты показывают, что использование нацеливания на NKG2DL может решить проблему гетерогенности опухолей при применении препарата с одним нацеливанием, например, на CLDN18.2.

#### **[0082] Пример 2. Разработка синтетического рецептора природного киллера (SNR)**

[0083] В этом примере описана композиция с новым химерным рецептором (далее называемым двойным CAR, также известным как SNR или CAR-молекула, снабженная SNR, при этом соответствующая CAR-T-клетка называется двойной CAR-T или CAR-T, снабженной SNR), которая содержит анти-CLDN18.2-CAR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 1 (т. е. традиционная CAR-молекула второго поколения клаудин 18.2, именуемая в дальнейшем как 21007) в китайской патентной заявке, опубликованной под номером CN113621073A от 09 ноября 2021 г., и последовательности химерного акцептора, обозначенные как последовательности от SEQ ID NO. 1 до SEQ ID NO. 8 (со структурными последовательностями, показанными на ФИГ. 3). Конкретные аминокислотные последовательности, соответствующие последовательностям с номерами от 21067 до 21074

показаны в Таблице 1 ниже.

**[0084]** Таблица 1. Информация о последовательностях анти-CLDN18.2-CAR и композиций с химерным рецептором

<b>Наименование последовательности/ плазмиды</b>	<b>Аминокислотная последовательность</b>
21007	SEQ ID NO. 1 в китайской заявке на патент, опубликованной под номером CN113621073A от 09 ноября 2021 г. относится к
21067	YFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRS DVYSDLNTQRPYYKLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGR GMGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQ KQRCPVVKSKCRENASPFFFCCFIAMGIRFIIMVTIWS AVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPNWICYKNNCYQFF DESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKS YHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDC ALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV (SEQ ID NO. 1)
21068	YFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRS DVYSDLNTQRPYYKLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGR GPFFFCCFIAMGIRFIIMVTIWSAVFLNSLFNQEVQIPL TESYCGPCPNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASC SQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGS WQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDCALYASSFKGYIENC TPNTYICMQRTV (SEQ ID NO. 2)
21069	MIHLGHILFLLLLPVAAAFNQEVQIPLTESYCGPCPNW ICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSK EDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPN LLTIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV QTTPGERSLPAFYPGTSGSCSGCSLSLPLLAGLVAAD AVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRGYFL GRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVY SDLNTQRPYYK (SEQ ID NO. 3)
21070	MALPVTALLLPLALLLHAARPFNQEVQIPLTESYCGPCP KNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLK VYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSI LSPNLLTIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICM QRTVTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCLCARPRR

	SPAQEDGKVYINMPGRGYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO. 4)
21071	MALPVTALLLPLALLLHAARPFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSI LSPNLLTIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHT RGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO. 5)
21072	MALPVTALLLPLALLLHAARPFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSI LSPNLLTIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKPFVWLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO. 6)
21073	MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO. 7)
21074	MALPVTALLLPLALLLHAARPMGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPVVKSCKRENASPF FCCFIAMGIRFIIMVTIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTVGSGEGRGSLTTCGDVEENPGPMGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK GSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCSLSPLLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG (SEQ ID NO. 8)

**[0085]** Как показано на ФИГ. 3, за исключением химерного антигенного рецептора 21007, указанные выше композиции с химерным рецептором также включают следующую информацию о последовательностях:

(1) P2A с аминокислотной последовательностью:

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQ ID NO. 9);

(2) DAP12ICD (внутриклеточный домен) с аминокислотной последовательностью:

YFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO. 10);

(3) DAP10ICD с аминокислотной последовательностью:

LCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG (SEQ ID NO. 11);

(4) NKG2DFL (полноразмерная последовательность) с аминокислотной последовательностью:

MGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPVVKSCKRENASPPFFCCFIA  
VAMGIRFIIMVTIWSAVFLNSLNFQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYE  
SQASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIE  
MQKGDCALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV (SEQ ID NO. 12);

(5) шарнир CD8 (шарнирный домен) с аминокислотной последовательностью:

TTTTAPRPPTPARTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO. 13);

(6) CD8 TM (трансмембранный домен) с аминокислотной последовательностью:

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO. 14);

(7) DAP10FL с аминокислотной последовательностью:

MIHLGHILFLLLLPVAAAQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCSLSLPLLAGLVAADAVASLLI  
VGAVFLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG (SEQ ID NO. 15);

(8) DAP12FL с аминокислотной последовательностью:

MGGLEPCSRLLLLPLLLAVSGLRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVY  
FLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRP YYK (SEQ ID NO. 16);

(9) DAP12ECD + TM (внеклеточный домен и трансмембранный домен) с аминокислотной последовательностью:

LRPVQAQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAV (SEQ ID NO. 17);

(10) T2A с аминокислотной последовательностью:

GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP (SEQ ID NO. 18).

**[0086] Пример 3. Конструирование плазмиды и вирусная упаковка CAR-молекул,**

## **снабженных синтетическими рецепторами натуральных киллеров (SNR)**

**[0087]** В этом примере описывается CAR-T-клетка, снабженная SNR, экспрессирующая указанный выше химерный рецептор, и способ конструирования CAR-T-клетки, снабженной SNR, который включает следующие этапы:

**[0088]** 1. Конструирование экспрессионного вектора: CAR-молекулу, снабженную SNR, и скелет лентивирусного вектора конструировали с помощью CRO с использованием технологии синтеза целого гена. Фрагмент CAR, снабженный SNR, клонировали в лентивирусный вектор посредством обычного молекулярного клонирования, и наименования сконструированных плазмид показаны выше в Таблице 1. Доказано, что каждая плазида была успешно сконструирована путем верификации полной последовательности вставленного фрагмента.

**[0089]** 2. Лентивирусная упаковка и измерение титра

**[0090]** День 1:

**[0091]** 1)  $5 \times 10^6$  клеток 293Т инокулировали среду в культуральном флаконе T75, объем культуры составлял 20 мл.

**[0092]** День 2:

**[0093]** 2) Перед упаковкой вирусов убеждались, что конфлюэнтность клеток 293Т составляет от 70 до 80 %, и меняли равные объемы жидкостей.

**[0094]** 3) Приготовление и трансфекция трансфекционного комплекса:

пробирку А и пробирку В подготавливали соответствующим образом, система показана ниже, и пробирку А и пробирку В переворачивали или встряхивали на низкой скорости для равномерного смешивания;

пробирка А: среда Opti-MEM (2 мл) + Lipofectamine 3000 (55 мкл);

пробирка В: среда Opti-MEM (2 мл) + P3000 (46 мкл) + хелперная плазида (18 мкг) + основная плазида с CAR, снабженным SNR (6 мкг);

культуральную среду из пробирки А добавляли в пробирку В, хорошо перемешивали встряхиванием и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут; и

флакон, в котором заменяли жидкость на этапе 3, поворачивали так, чтобы среда находилась на другой стороне флакона; и добавляли смесь содержимого пробирки А и пробирки В, осторожно встряхивали и хорошо перемешивали, а затем флакон медленно обратно поворачивали с возвращением среды в исходное положение, после чего инкубацию продолжали в течение 48 часов.

**[0095]** День 4:

**[0096]** 4) Через 2 дня инкубации после трансфекции, собирали и центрифугировали надосадочную жидкость при 500 g в течение 10 минут, надосадочную жидкость фильтровали

в центрифужную пробирку емкостью 50 мл через фильтр 0,45 мкм, центрифужную пробирку закрывали парафильмом и центрифугировали при 10000 g при температуре 4 °С в течение ночи, и наблюдали образование белого осадка вирусов; а после отбрасывания надосадочной жидкости центрифужную пробирку переворачивали для стекания надосадочной жидкости, осадок растворяли в 200 мкл среды AIM-V, отбирали 2 мкл смеси для измерения титра в соответствии с последующим этапом и оставшуюся смесь хранили при температуре –80 °С.

**[0097]** 5) 2 мкл ресуспендированной надосадочной жидкости с вирусами добавляли к 198 мкл среды 1640 для разведения вирусов, затем 2 мкл, 10 мкл и 50 мкл разведенных вирусов добавляли в 3 лунки, каждая из которых содержала  $2 \times 10^5$  Т-клеток Jurkat на 24-луночном планшете, и для усиления вирусной инфекции добавляли полибрен в конечной концентрации 5 мкг/мл.

**[0098]** День 6:

**[0099]** 6) Для измерения титра вирусов использовали антитело против VHH-FITC, при этом титр находился в диапазоне от  $2,5 \times 10^7$  до  $1,2 \times 10^8$ , что могло отвечать требованиям обычного эксперимента по конструированию CAR-T *in vitro*.

**[00100]** 3. Конструирование клетки CAR-T, снабженной синтетическим рецептором природного киллера (SNR)

**[00101]** Упакованный лентивирус использовали для инфицирования Т-клеток с целью обнаружения экспрессии анти-CLDN18.2-CAR и NKG2D в Т-клетках, получая результаты, показанные на ФИГ. 4.

**[00102]** Как можно видеть из ФИГ. 4, анти-CLDN18.2-CAR-Т-клетки демонстрировали более низкий уровень экспрессии NKG2D, а CAR-Т-клетки, снабженные SNR, имели более высокий уровень экспрессии NKG2D, чем анти-CLDN18.2-CAR-Т-клетки, при этом на нормальном уровне экспрессируя анти-CLDN18.2-CAR. Это указывает на то, что химерный рецептор NKG2D успешно экспрессируется на поверхности клеток CAR-Т, снабженных SNR.

**[00103]** Пример 4

**[00104]** Этот пример предназначен для верификации киллерного эффекта CAR-Т-клеток, снабженных SNR, в отношении клеток-мишеней, при этом конкретные этапы и результаты были следующими:

**[00105]** (1) Линию клеток 293-CLDN18.2, сверхэкспрессирующую антиген CLDN18.2, конструировали на основе клеток 293, и эта клеточная линия обладала высокой экспрессией CLDN18.2 (как показано на ФИГ. 5).

**[00106]** (2) Обнаружение экспрессии лиганда NKG2D MICA/B в клеточной линии: определяли уровень экспрессии MICA/B в клеточной линии 239Т, при этом уровень экспрессии MICA/B был выше в указанной клеточной линии 293Т (как показано на ФИГ. 6).

**[00107]** (3) Клетки CAR-Т и 293-CLDN18.2 смешивали в соотношениях эффекторные

клетки/клетки-мишени 2:1 и 0,5:1, смесь инкубировали в течение 5 часов, киллерный эффект CAR-T на клетки-мишени определяли с помощью проточной цитометрии посредством аннексина V, анти-CLDN18.2-CAR-T-клетки и CAR-T-клетки, снабженные SNR, оказывали более сильный киллерный эффект на клетки 293-CLDN18.2 чем unT (нетрансдуцированные T)-клетки, и клетки 21069 и 21072 в соотношении эффекторные клетки/клетки-мишени равном 2:1 обладали более сильным киллерным эффектом, чем обычные CAR-T-клетки (21007) (как показано на ФИГ. 7). Кроме того, 293-CLDN18.2 инкубировали совместно с CAR-T-клетками, и кратность пролиферации CAR-T-клеток 21069 и 21072, снабженных SNR, была значительно выше, чем у обычных CAR-T-клеток (21007) (как показано на ФИГ. 8).

**[00108]** Клетки CAR-T и клетки 293T смешивали в соотношениях эффекторные клетки/клетки-мишени 2:1 и 0,5:1, смеси инкубировали в течение 5 часов, киллерный эффект клеток CAR-T на клетки-мишени определяли с помощью проточной цитометрии посредством аннексина V, анти-CLDN18.2-CAR-T-клетки и CAR-T-клетки, снабженные SNR, оказывали более сильный киллерный эффект на клетки-мишени, экспрессирующие MICA/B, чем unT (нетрансдуцированные T)-клетки, и клетки 21069 и 21072 в соотношении эффекторные клетки/клетки-мишени равном 2:1 обладали более сильным киллерным эффектом, чем обычные CAR-T-клетки (как показано на ФИГ. 9).

#### **[00109] Пример 5**

**[00110]** Этот пример подтверждает, что CAR-T-клетки, снабженные SNR, демонстрируют более низкие уровни секреции цитокинов при уничтожении клеток-мишеней 293-CLDN18.2, при этом конкретные этапы и результаты были следующими:

**[00111]** Использовали клеточную линию 293-CLDN18.2, сконструированную в Примере 4; и клетки CAR-T и 293-CLDN18.2 смешивали в соотношении эффекторные клетки/клетки-мишени 2:1, смесь инкубировали в течение 24 часов и высвобождение цитокинов CAR-T-клетками определяли с помощью проточной цитометрии. Использовали набор для обнаружения множества цитокинов от Biolegend, на каждый образец в новом 96-луночном планшете V-типа добавляли 15 мкл надосадочной жидкости инкубированных эффекторных клеток и клеток-мишеней, разбавленную смесь из 15 мкл магнитных гранул на образец и 15 мкл буфера для анализа на образец, и 96-луночный планшет V-типа герметизировали герметизирующей мембраной для планшетов, встряхивали при 500 об/мин при комнатной температуре в течение 2 часов и центрифугировали при 250 g в течение 5 минут. Надосадочную жидкость отбрасывали, добавляли по 200 мкл промывочного буфера на образец, и смесь центрифугировали при 250 g в течение 5 минут. Надосадочную жидкость отбрасывали, добавляли 15 мкл детектирующего антитела на образец, и смесь встряхивали при 500 об/мин при комнатной температуре в течение 1 часа и добавляли 15 мкл SA-PE на образец, смесь встряхивали при 500 об/мин при комнатной температуре в течение 30 минут и центрифугировали при 250 g в течение 5 минут. Надосадочную жидкость отбрасывали, добавляли по 200 мкл промывочного буфера на образец, и смесь центрифугировали при 250 g

в течение 5 минут. Надосадочную жидкость отбрасывали, добавляли по 150 мкл промывочного буфера на образец, и смесь тестировали с помощью прибора. Полученные результаты показали, что когда анти-CLDN18.2-CAR-T и CAR-T-клетки, снабженные SNR, уничтожали клетки-мишени 293-CLDN18.2, то клетки 21067, 21068, 21069, 21070, 21072 и другие CAR-T-клетки, снабженные SNR, характеризовались значительно более низкими уровнями секреции IFN- $\gamma$ , IL2, IL6 и TNF- $\alpha$  (как показано на ФИГ. 10).

**[00112] Пример 6**

**[00113]** Этот пример подтверждает, что CAR-T-клетки, снабженные SNR, высвобождают умеренные уровни цитокинов при уничтожении клеток-мишеней, экспрессирующих MICA/B, при этом конкретные этапы и результаты были следующими:

**[00114]** Клетки CAR-T и 293T смешивали в соотношении эффекторные клетки/клетки-мишени 2:1, смесь инкубировали в течение 24 часов, и высвобождение цитокинов CAR-T определяли с помощью проточной цитометрии. Когда анти-CLDN18.2-CAR-T-клетки и CAR-T-клетки, снабженные SNR, уничтожали клетки-мишени 293T, то клетки 21068, 21069, 21070, 21072 и другие CAR-T-клетки, снабженные SNR, характеризовались умеренным уровнем секреции IFN- $\gamma$  и более низкими уровнями секреции TNF- $\alpha$ , IL2 и IL6 (как показано на ФИГ. 11).

**[00115] Пример 7. Конструирование клеток CLDN18.2 CAR-T, снабженных SNR**

**[00116]** На основании приведенных выше результатов авторы изобретения выбрали структуры SNR в молекулах 21067, 21070, 21071 и 21072 для дальнейшей верификации. Авторы изобретения встроили вышеуказанные SNR в CAR-молекулу 21047 второго поколения для образования новых CAR-молекул 21326, 21327, 21328 и 21329. Структуры и последовательности новых CAR-молекул показаны на ФИГ. 12 и в таблице ниже. Исходя из способа по Примеру 2, авторы изобретения сконструировали плазмиды, лентивирусы и CAR-T-клетки с указанными выше молекулами.

Наименование последовательности/плазмиды	Аминокислотная последовательность
21047	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGSIFNIPVMGWYRQAPGKQRELVAGISTGGTTNY GDSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCNVL VMSGIGSTLEVWGQGLTVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGT IHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLLVVGGLVACYSLLVT VAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYP PRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE

	AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR (SEQ ID NO. 19)
21326	YFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYQELQGQRSDV YSDLNTQRPYYKLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRGMG WIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPV VKSKCRENASPFFCCFIAMGIRFIIMVTIWSAVFLNSLF NQEVQIPLTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYES QASCMSQNASLLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPT NGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDALYASSFKGYIENC STPNTYICMQRTV (SEQ ID NO. 20)
21327	MALPVTALLPLALLHAARPFNQEVQIPLTESYCGPCPKN WICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSK EDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLL TIEMQKGDALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRVTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCLCARPRRSPAQEDGKVYI NMPGRGYFLGRLVPRGRGAAEAATRKRITETESPYQELQ GQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO. 21)
21328	MALPVTALLPLALLHAARPFNQEVQIPLTESYCGPCPKN WICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSK EDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLL TIEMQKGDALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRVTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI YIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELYFLGRLVPRGRGAAEA ATRKRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO. 22)
21329	MALPVTALLPLALLHAARPFNQEVQIPLTESYCGPCPKN WICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSK EDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLL TIEMQKGDALYASSFKGYIENCSTPNTYICMQRVIEVM YPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVV VGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSLLHSDYMNMTPRR PGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSYFLGRLVPRGRGAAEAAT RKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (SEQ ID NO. 23)

**[00117] Пример 8. Обнаружение способности CLDN18.2 CAR-T-клеток, снабженных SNR, уничтожать клетки-мишени**

[00118] Чтобы проверить возможность SNR успешно уничтожать NKG2DL-позитивные клетки, авторы изобретения использовали ULBP-позитивные опухолевые клетки A431 для выявления способности SNR к уничтожению. Конкретные этапы и результаты были следующими:

[00119] (1) Обнаружение экспрессии NKG2D-лиганда ULBP2/5/6 в клеточной линии: определяли уровень экспрессии NKG2D-лиганда в клеточной линии A431, при этом уровень экспрессии ULBP2/5/6 был выше в указанной клеточной линии A431 (как показано на ФИГ. 13).

[00120] (2) Клетки CAR-T, NUGC4 и A431 смешивали в соотношениях эффекторные клетки/клетки-мишени 3:1, 1:1 и 0,3:1, смеси инкубировали в течение 5 часов, и киллерный эффект CAR-T-клеток на клетки-мишени выявляли с помощью проточной цитометрии посредством аннексина V. Результаты показаны на фигуре. Молекулы 21327 и 21329 при высоком соотношении эффекторные клетки/клетки-мишени демонстрировали более высокую эффективность уничтожения NUGC4, чем молекулы 21047. Кроме того, молекула 21047 оказалась не способна вызывать уничтожение клеток A431, тогда как 21326–21329 могли эффективно уничтожать A431. Анализ обнаружения множества цитокинов показал, что уровень секреции IFN- $\gamma$  для молекулы 21047 был выше, чем уровни секреции для молекул 21326–21329 при уничтожении NUGC4, но уровни секреции IFN- $\gamma$  для молекул 21327–21329 при уничтожении клеток A431, обычно были ниже, чем при уничтожении NUGC4 (как показано на ФИГ. 14). Полученные результаты показали, что все 4 конструкции SNR могут способствовать нацеливанию и уничтожению CLAUDIN18.2- и NKG2DL-позитивных клеток, а также вызывать более низкий уровень секреции цитокинов.

**[00121] Пример 9. SNR повышает способность пролиферации и уровень памяти CAR-T-клеток, одновременно снижая уровень их истощения**

[00122] Авторы изобретения дополнительно проанализировали эффект SNR на CAR-T-клетки *in vitro*. Результаты показаны на ФИГ. 15. По сравнению с молекулой 21047 степень пролиферации каждой молекулы была значительно увеличена, тогда как экспрессия каждого из маркеров истощения (PD1, LAG3 и TIM3) была значительно снижена. Дальнейший анализ доли клеток памяти в центре памяти показал, что доля Tscm-клеток для молекулы 21327 была значительно выше, чем для других молекул. Упомянутые выше преимущества могут быть связаны с функциями сигнального домена, используемого в SNR.

**[00123] Пример 10. Исследование эффективности с помощью модели гомогенной экспрессии CLDN18.2 *in vivo***

[00124] Для изучения эффективности указанных выше молекул *in vivo* авторы изобретения сконструировали подкожно трансплантируемую модель опухоли NUGC4 (CLDN18.2+, NKG2DL-), и каждый раз вводили CAR-T, когда объем опухоли достигал 100 мм<sup>3</sup>. Результаты исследования показали, что по сравнению с молекулой 21047, молекула 21327 может удалять опухолевую ткань примерно на 10 дней раньше, что указывает на ее большую эффективность. Кроме того, эффективность молекул 21326 и 21329 была ниже, чем у молекулы 21047. Об эффективности молекулы 21328 не удалось сделать вывод из-за преждевременной гибели мышей (А на ФИГ. 16). Приведенные выше результаты показали, что по сравнению с обычной CAR-T-молекулой 21047 второго поколения молекула 21327 обладала более сильной способностью удалять опухоли с гомогенной экспрессией CLDN18.2.

[00125] В ходе дальнейшего анализа вес мышей, получавших молекулы 21328, значительно снижался в течение периода исследования, и наблюдали гибель мышей, что указывает на то, что эти молекулы обладали значительной токсичностью *in vivo*. У одной мыши также наблюдали потерю веса во время исследования молекулы 21047, но мыши не погибли. Кроме того, молекулы 21326, 21327 и 21329 не продемонстрировали значимой токсичности на протяжении всего периода исследования (В на ФИГ. 16). Аналогичным образом, авторы изобретения дополнительно анализировали уровни экспрессии цитокинов в крови мышей, и полученные результаты показали, что молекулы 21326, 21327 и 21329 характеризовались более низкими уровнями секреции *in vivo* для IFN-гамма (С на ФИГ. 16) и TNF-альфа (D на ФИГ. 16), и такие результаты соответствовали результатам по оценке безопасности.

[00126] Приведенные выше результаты показали, что молекула 21327 продемонстрировала более высокую эффективность и меньшую токсичность, чем обычная молекула CAR-T второго поколения. Это указывало на то, что конструкция SNR эффективно повышала эффективность и безопасность CAR-T.

[00127] Дополнительно изучали способность CAR-T-клеток предотвращать рецидив CLDN18.2-негативной опухоли после удаления CLDN18.2-позитивных опухолей. Авторы изобретения использовали клетки A431 (CLDN18.2-, NKG2DL+) для проведения эксперимента по повторному прививанию опухолей мышам в группах изучения 21047 и 21327 после удаления опухолей. Результаты исследования показали, что по сравнению с молекулой 21047 молекулы 21327 могут значимо ингибировать рост опухоли A431 (ФИГ. 17). Приведенные выше результаты указывают на то, что добавление SNR может ингибировать рецидив CLDN18.2-негативной опухоли.

#### [00128] Пример 11. Эксперимент по оценке эффективности SNR на модели опухоли NKG2DL+

[00129] Для дальнейшей проверки способности каждой группы молекул SNR ингибировать опухоли авторы изобретения сконструировали модель подкожного трансплантата опухоли

A431 на мышах (CLDN18.2-, NKG2DL+), и для каждой CAR-T вводили CAR-T-клетки, когда объем опухоли достигал 60 мм<sup>3</sup>, с получением результатов, продемонстрированных на ФИГ. 18, на которой данные показывают, что молекулы 21327 и 21329 могут ингибировать рост клеток A431, а молекула 21329 оказывает лучший ингибирующий эффект на опухоль, чем 21327. Молекула 21047 почти не обладала ингибирующим действием на опухоль, и полученные данные также показали, что SNR-структуры молекул 21327 и 21329 могут специфически распознавать NKG2DL и инициировать киллерный эффект.

**[00130] Пример 12. Эксперимент по оценке эффективности с использованием модели гетерогенной опухоли CLDN18.2**

**[00131]** Для дальнейшего изучения возможности SNR улучшать способность CAR-T ингибировать гетерогенные опухоли, авторы изобретения дополнительно сконструировали клеточную линию A431-18.2 и смешали эту клеточную линию с клетками A431, чтобы сформировать модель опухоли A431/A431-18.2. CAR-T вводили примерно через 7 дней после инокуляции опухоли. Полученные результаты показали, что в модели гетерогенной опухоли, несмотря на то, что обычные CAR-T-молекулы второго поколения могут пролиферировать и секретировать IFN-гамма *in vivo*, обычные CAR-T-молекулы второго поколения не смогли значимо ингибировать рост опухоли, что указывает на наличие некоторого количества CLDN18.2-негативных опухолей, которые все еще сохраняли возможность нормально расти, в то время как CLDN18.2-позитивные опухолевые клетки погибали. Молекула 21327 со SNR-структурой эффективно ингибировала рост смешанных опухолевых клеток. Результаты анализа уровней секреции IFN-γ показали, что не было значимой разницы между уровнями секреции для молекул 21047 и 21327 *in vivo* (ФИГ. 19). Таким образом, результаты показали, что добавление SNR эффективно помогало CAR-T-клеткам ингибировать ткани гетерогенной опухоли.

**[00132] Пример 13. Конструирование CAR-T-клеток EPCAM, снабженных SNR, и CAR-T-клеток CD19.**

**[00133]** Основываясь на приведенных выше результатах, авторы встроили SNR из 21327 в CAR-молекулу EPCAM второго поколения (21002) с образованием новой CAR-молекулы 22162, а также встроили SNR из 21329 в CAR-молекулу CD19 второго поколения (21144) с образованием молекулы 22163 (ФИГ. 20). Последовательность показана в таблице ниже. Исходя из способа по Примеру 2, авторы изобретения сконструировали плазмиды, лентивирусы и CAR-T-клетки с каждой из указанных выше молекул. Упакованный лентивирус использовали для инфицирования Т-клеток и в Т-клетках определяли экспрессию анти-EPCAM-CAR, анти-CD19 CAR и NKG2D. Результаты показаны на ФИГ. 21.

**[00134]** Как можно видеть из ФИГ. 21, анти-EPCAM-CAR-T-клетки демонстрировали более

высокий уровень экспрессии NKG2D, и анти-CD19-CAR-T-клетки, снабженные SNR, также характеризовались более высоким уровнем экспрессии NKG2D, при этом экспрессируя EPCAM CAR и CD19 CAR на нормальном уровне. Это указывает на то, что химерный рецептор NKG2D успешно экспрессируется на поверхности клеток CAR-T, снабженных SNR.

Наименование последовательности/пептиды	Аминокислотная последовательность
21002	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTNYWINWVRQAPGQGLEWIGNI YPSYIYTNYNQEFKDKVTLTVDESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRSPYGYDEYGLDYWGQGTITVTVSSGG GGS GGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVMTCK SSQSLLNTRNQKNYLTWYQQKPGKAPKLLIYWASTR ESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQNDY VYPLTFGQGTKLEIKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVK GKHLCPSPFPGPSKPFWLVVVGGVLACYSLLVTV FIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYA PPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQUALPPR (SEQ ID NO. 24)
22162	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTNYWINWVRQAPGQGLEWIGNI YPSYIYTNYNQEFKDKVTLTVDESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRSPYGYDEYGLDYWGQGTITVTVSSGG GGS GGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVMTCK SSQSLLNTRNQKNYLTWYQQKPGKAPKLLIYWASTR ESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQNDY VYPLTFGQGTKLEIKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVK GKHLCPSPFPGPSKPFWLVVVGGVLACYSLLVTV FIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYA PPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT KDTYDALHMQUALPPR GSGATNFSLLKQAGDVEENPG PMALPVTALLLPLALLHAARPFNQEVQIPLTESYCGP CPKNWICYKNNCYQFFDESKNWHYESQASCMSQNAS

	<p>LLKVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQW  EDGSILSPNLLTIEMQKGDALYASSFKGYIENCSTPN  TYICMQRVTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA  AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL  YCLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRGYFLGRLVPRG  RGAAEAATRKRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNT  QRPYYK (SEQ ID NO. 25)</p>
21144	<p>MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLG  DRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSR  LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQG  NTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK  LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP  RKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQV  FLKMNSLQTDDBTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ  GTSVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKH  LCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF  WVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR  DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR  EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK  DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT  YDALHMQUALPPR (SEQ ID NO. 26)</p>
22163	<p>MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLG  DRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSR  LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQG  NTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK  LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPP  RKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQV  FLKMNSLQTDDBTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQ  GTSVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKH  LCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF  WVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR  DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR  EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQK  DKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT  YDALHMQUALPPRGSATNFSLLKQAGDVEENPGPM  ALPVTALLLPLALLHARPENQEVQIPLTESYCGPCP  KNWICYKNNCYQFFDESKNWNYESQASCMSQNASLL  KVYSKEDQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWED  GSILSPNLLTIEMQKGDALYASSFKGYIENCSTPNTY</p>

	ICMQRTVTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCL CARPRRSPAQEDGKVYINMPGRGYFLGRLVPRGRGA AEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPY YK (SEQ ID NO. 27)
--	---

**[00135] Пример 14. Определение уровня секреции цитокинов ЕрСАМ CAR-T-клетками, снабженными SNR**

**[00136]** Чтобы проверить способность ЕрСАМ CAR-T-клеток, снабженных SNR, уничтожать гетерогенные опухоли, авторы изобретения изучали уровень высвобождения цитокинов во время уничтожения позитивных по ЕрСАМ-мишени клеток (HCT116) или негативных по мишени клеток (MIA PaCa2).

**[00137]** CAR-T-клетки смешивали с HCT116 или MIA PaCa2 в соотношении эффекторные клетки/клетки-мишени 1:1, смесь инкубировали в течение 24 часов, а затем собирали надосадочную жидкость для определения уровня секреции цитокинов с помощью ELISA. Результаты анализа на IFN- $\gamma$  показаны на ФИГ. 22. При уничтожении HCT116 под действием молекулы 22162 секретировалось от 50 000 до 60 000 пг/мл IFN- $\gamma$ , что эквивалентно уровню секреции обычных CAR-T-молекул второго поколения. Во время уничтожения негативных по ЕрСАМ-мишени клеток MIA PaCa2 молекула SNR увеличивала уровень секреции IFN- $\gamma$  клетками CAR-T. Таким образом, молекула SNR способствовала свойству ЕрСАМ CAR-T уничтожать ЕрСАМ-негативные клетки.

**[00138] Пример 15. Обнаружение способности CD19 CAR-T-клеток, снабженных SNR, уничтожать клетки-мишени**

**[00139]** Чтобы проверить способность CD19 CAR-T-клеток, снабженных SNR, уничтожать гетерогенные опухоли, авторы изобретения изучали уровень высвобождения цитокинов во время уничтожения позитивных по CD19-мишени клеток (Raji) или негативных по мишени клеток (MIA PaCa2).

CAR-T-клетки смешивали с клетками Raji или MIA PaCa2 в соотношении эффекторные клетки/клетки-мишени 1:1, смесь инкубировали в течение 24 часов, а затем собирали надосадочную жидкость для определения уровня секреции цитокинов с помощью ELISA. Результаты анализа на IFN- $\gamma$  показали, что при уничтожении клеток Raji под действием молекулы 22163 секретировалось от 30 000 до 40 000 пг/мл IFN- $\gamma$ , что значительно превышало уровень секреции обычных CAR-T-молекул второго поколения. Во время уничтожения негативных по CD19-мишени клеток MIA PaCa2 молекула SNR увеличивала уровень секреции IFN- $\gamma$  клетками CAR-T. Таким образом, молекула SNR способствовала свойству CD19 CAR-T уничтожать CD19-негативные клетки.

**[00140]** Конкретные варианты осуществления настоящего изобретения подробно описаны выше, но они использованы только в качестве примеров, и настоящее изобретение не ограничивается описанными выше конкретными вариантами осуществления. Для специалистов в данной области понятно, что любая эквивалентная модификация и замена в настоящем изобретении также входят в объем настоящего изобретения. Следовательно, все эквивалентные преобразования и модификации, выполненные без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения, должны находиться в пределах объема настоящего изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция или слитый белок с новым химерным рецептором, содержащие химерный антигенный рецептор и химерный рецептор NKG2D, который содержит полноразмерную последовательность или усеченный фрагмент NKG2D, DAP10 и/или DAP12.
2. Композиция или слитый белок с химерным рецептором по п. 1, содержащие химерный антигенный рецептор и химерный рецептор NKG2D, при этом указанный химерный рецептор NKG2D содержит последовательности внеклеточного домена NKG2D и внутриклеточного домена DAP12.
3. Композиция или слитый белок с химерным рецептором по п. 2, отличающиеся тем, что химерный рецептор NKG2D дополнительно содержит костимулирующую молекулу, выбранную из группы, состоящей из CD28, 4-1BB, DAP10, ICOS, OX40 и CD40.
4. Композиция или слитый белок с химерным рецептором по п. 1, отличающиеся тем, что химерный антигенный рецептор содержит внеклеточный домен распознавания, внеклеточный шарнирный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен.
5. Композиция или слитый белок с химерным рецептором по п. 4, отличающиеся тем, что внеклеточный домен распознавания химерного антигенного рецептора содержит антитело или его фрагмент, которые распознают опухолеассоциированный антиген или опухолеспецифический антиген, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из CD19, VCMA, CD22, CD20, CD123, CD30, CD38, CD138, CD56, CD7, CLL-1, CD10, CD34, CS1, CD16, CD4, CD5, IL-1-RAP, ITGB7, k-IgG, TAC1, TRBC1, MUC1, NKG2D, PD-L1, CD133, CD177, LeY, CD70, ROR1, AFP, AXL, CD80, CD86, DLL3, DR5, FAP, LMP1, MAGE-A1, MAGE-A4, MG7, MUC16, PMEL, ROR2, VEGFR2, CD171, клаудина 18.2, клаудина 6, EphA2, ErbB, Fra, PSCA, cMet, IL13Ra2, EPCAM, EGFR, PSMA, EGFRvIII, GPC3, CEA, HER2, GD2 и мезотелина.
6. Композиция или слитый белок с химерным рецептором по п. 4, отличающиеся тем, что шарнирный домен содержит последовательность, полученную из по меньшей мере одного из следующих элементов: CD8 $\alpha$ , CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, CD40, CD80 и IgG; трансмембранный домен содержит последовательность, полученную из по меньшей мере одного из следующих элементов: CD2, CD27, LFA-1, CD8 $\alpha$ , CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, CD40, CD80, CD3 $\zeta$  и CD3 $\epsilon$ ; и внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность, полученную из по меньшей мере одного из следующих элементов: Toll-подобный рецептор, CD2, CD27, LFA-1, CD8 $\alpha$ , CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, CD40, CD80, DAP10, DAP12, CD3 $\zeta$  и CD3 $\epsilon$ .
7. Композиция или слитый белок с химерным рецептором по п. 1, дополнительно содержащие соединительный пептид для соединения химерного антигенного рецептора с химерным рецептором, при этом указанный соединительный пептид представляет собой саморасщепляющийся полипептид, т. е. пептид 2A, включающий пептид (F2A) вируса ящура

(FMDV), пептид (P2A) тешовируса свиней (PTV-1), пептид (T2A) вируса *Thosea asigna* (TaV) и пептид (E2A) вируса ринита лошадей (ERAV), предпочтительно соединительный пептид представляет собой пептид P2A с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 9.

8. Композиция или слитый белок с химерным рецептором по п. 1, отличающиеся тем, что аминокислотная последовательность химерного рецептора выбрана из последовательности от SEQ ID NO. 1 до SEQ ID NO. 8, и предпочтительно SEQ ID NO. 3 или SEQ ID NO. 6.

9. Нуклеиновая кислота, кодирующая композицию или слитый белок с химерным рецептором по любому из пп. 1–8.

10. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 9.

11. Клетка, экспрессирующая композицию или слитый белок с химерным рецептором по любому из пп. 1–8 или содержащая нуклеиновую кислоту по п. 10 или вектор по п. 11.

12. Клетка по п. 11, отличающаяся тем, что указанная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клеток, НК-клеток, дендритных клеток (DC) и макрофагов; и предпочтительно клетка представляет собой Т-клетку  $\alpha\beta$ , Т-клетку  $\gamma\delta$  или НКТ-клетку.

13. Биологический агент для лечения опухоли, содержащий клетку по п. 11 или 12 в качестве основного активного ингредиента.

14. Способ получения клетки по п. 11 или 12, включающий этап трансфекции клетки вектором по п. 11.

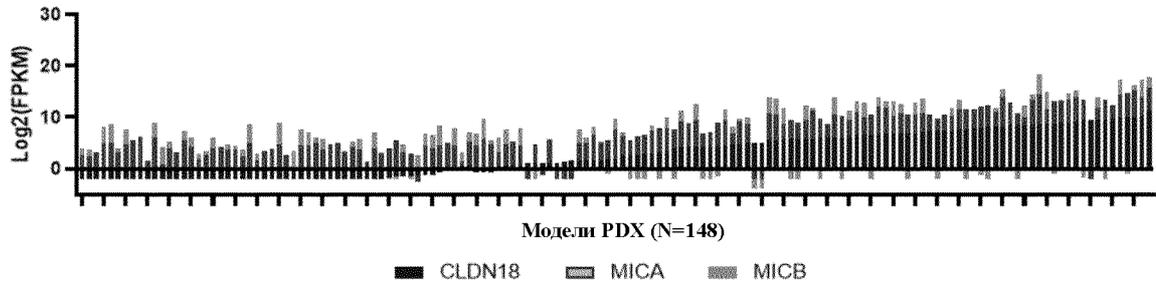
15. Применение композиции или слитого белка с химерным рецептором по любому из пп. 1–8, нуклеиновой кислоты по п. 9, вектора по п. 10 или клетки по п. 11 или 12 для получения противоопухолевого лекарственного средства.

16. Применение по п. 15, отличающееся тем, что противоопухолевое лекарственное средство применяют для лечения гетерогенной опухоли.

17. Применение по п. 16, отличающееся тем, что гетерогенная опухоль содержит по меньшей мере NKG2DL-позитивные опухолевые клетки и опухолевые клетки, на которые нацеливается химерный антигенный рецептор.

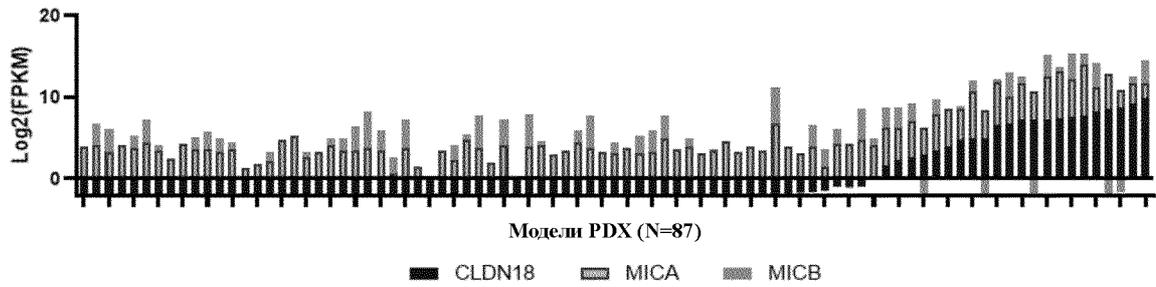
**A**

**Экспрессия мишеней на моделях PDX рака желудка**



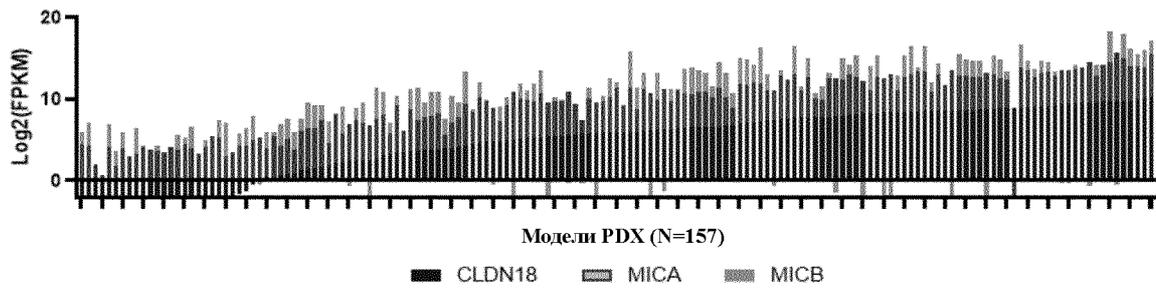
**B**

**Экспрессия мишеней на моделях PDX рака пищевода**



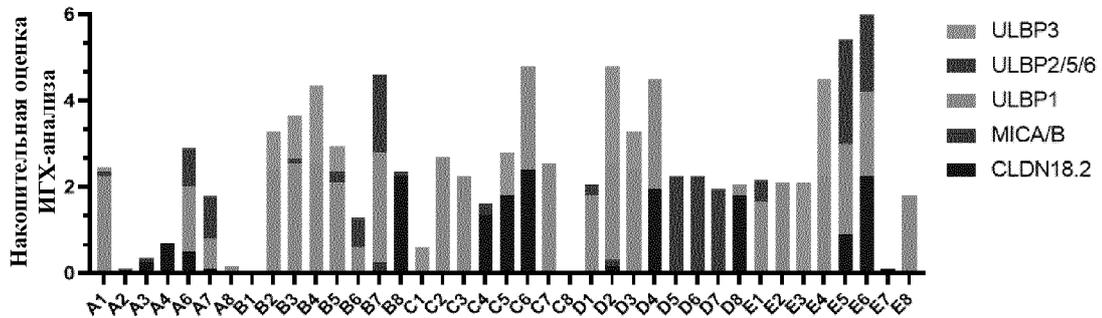
**C**

**Экспрессия мишеней на моделях PDX рака поджелудочной железы**



**ФИГ. 1**

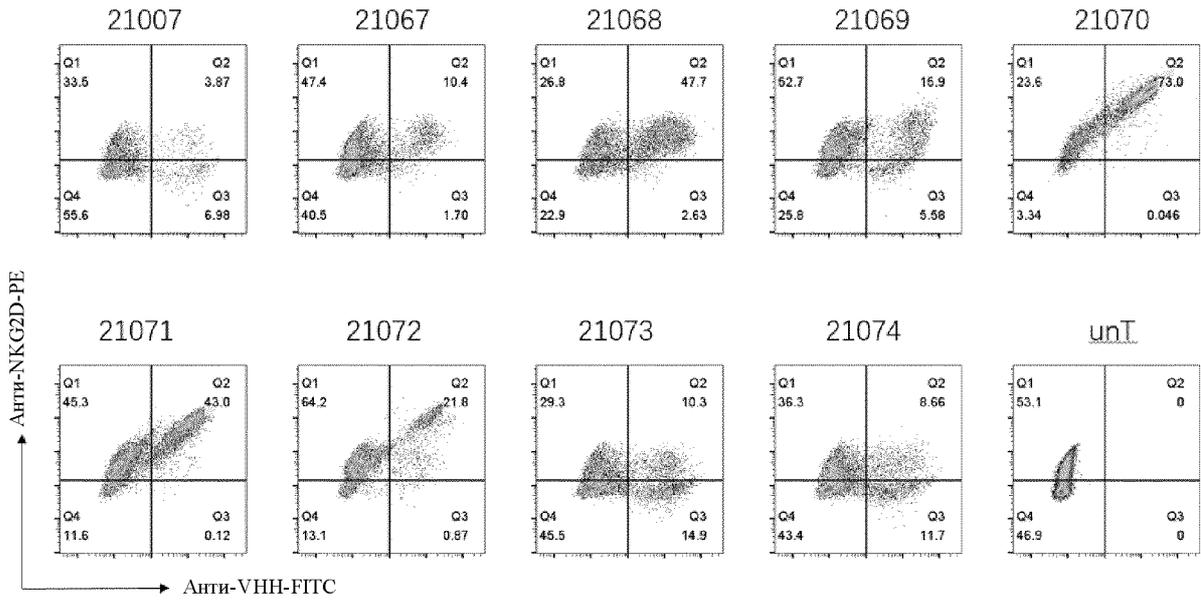
Экспрессия CLDN18.2 и NKG2DL на опухолевых тканях желудка



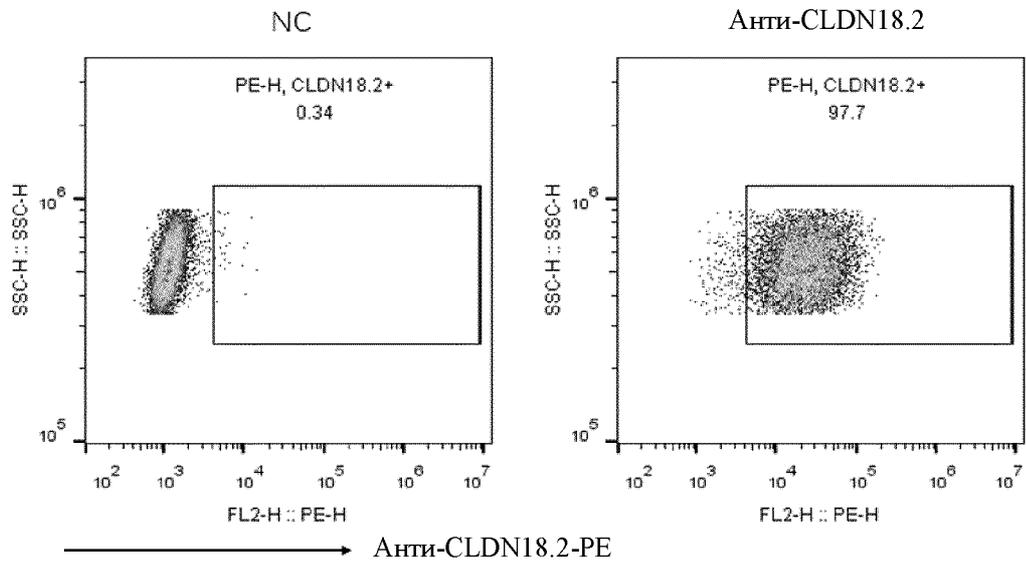
ФИГ. 2

21007	CAR						
21067	CAR	P2A	DAP12ICD	DAP10ICD	NKG2DFL		
21068	CAR	P2A	DAP12ICD	DAP10ICD	NKG2DECD+TM		
21069	CAR	P2A	NKG2DECD	DAP10FL	DAP12ICD		
21070	CAR	P2A	NKG2DECD	CD8 HINGE+TM	DAP10ECD	DAP12ICD	
21071	CAR	P2A	NKG2DECD	CD8 HINGE+TM	4-1BB	DAP12ICD	
21072	CAR	P2A	NKG2DECD	CD28 HINGE+TM+ICD	DAP12ICD		
21073	CAR	DAP12FL					
21074	CAR	P2A	NKG2DFL	T2A	DAP12FL	P2A	DAP10FL

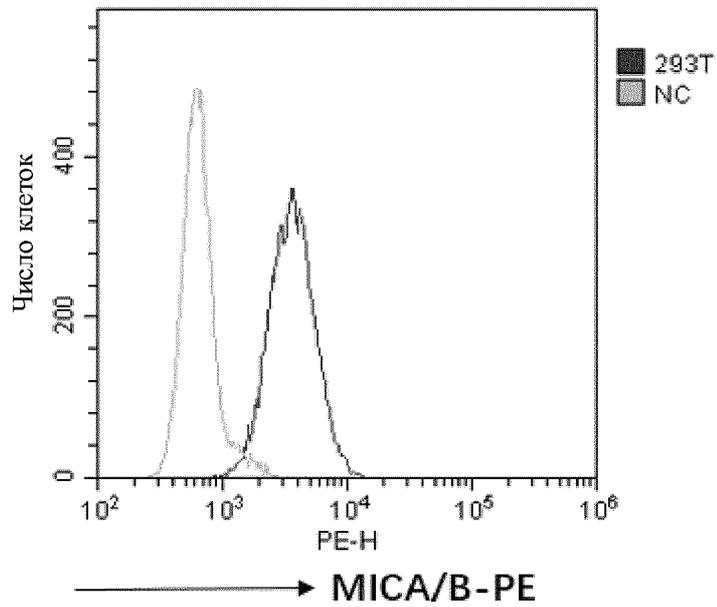
ФИГ. 3



ФИГ. 4

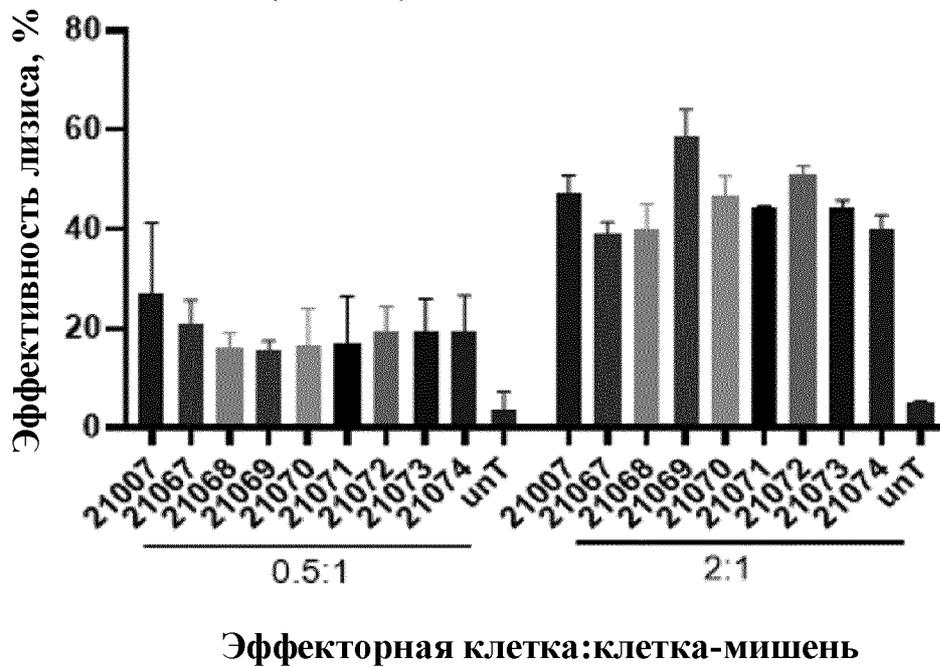


ФИГ. 5

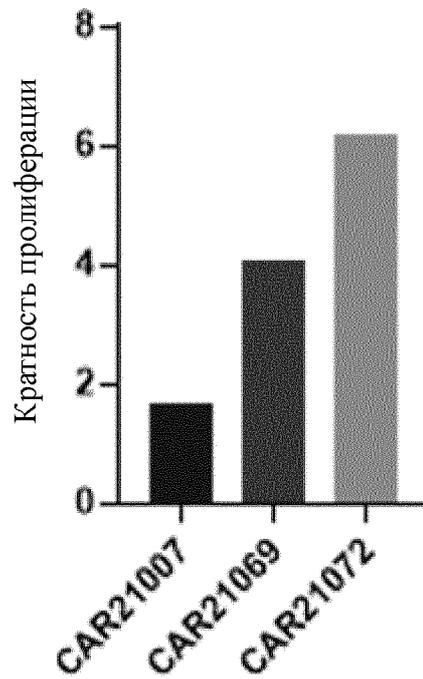


ФИГ. 6

### Двойные CAR-T уничтожают 293-18.2 (FACS)

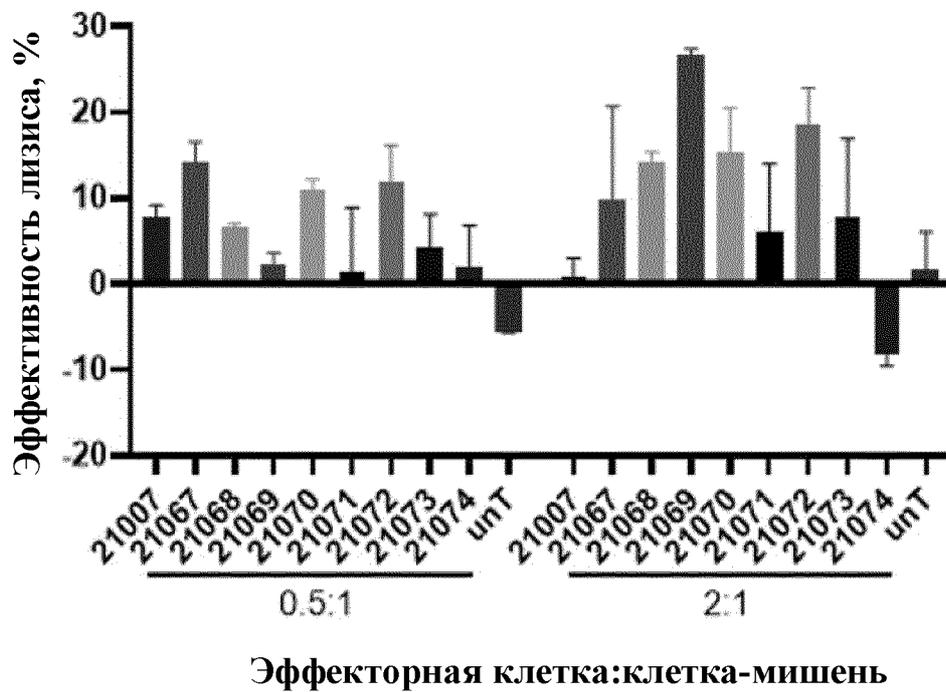


ФИГ. 7

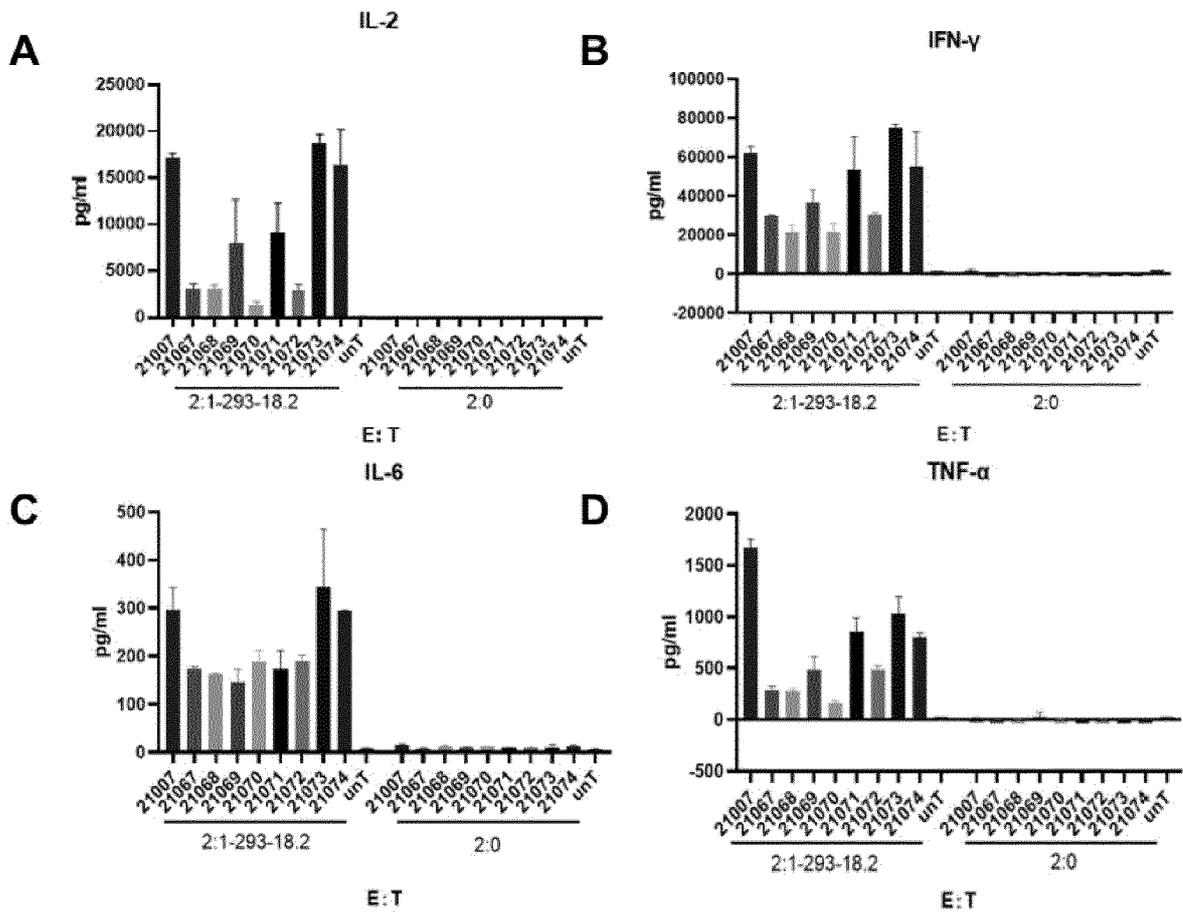


ФИГ. 8

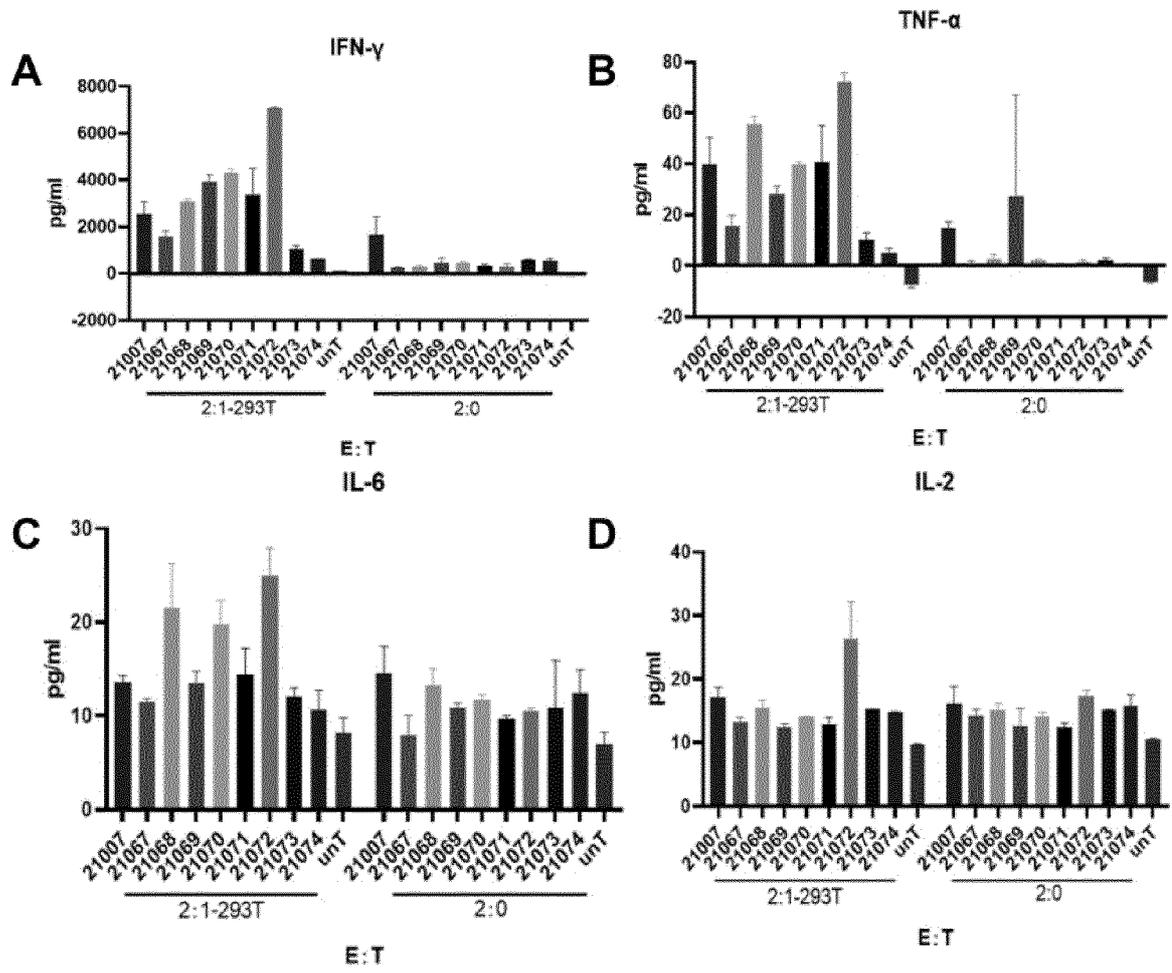
### Двойные CAR-T уничтожают 293Т (FACS)



ФИГ. 9



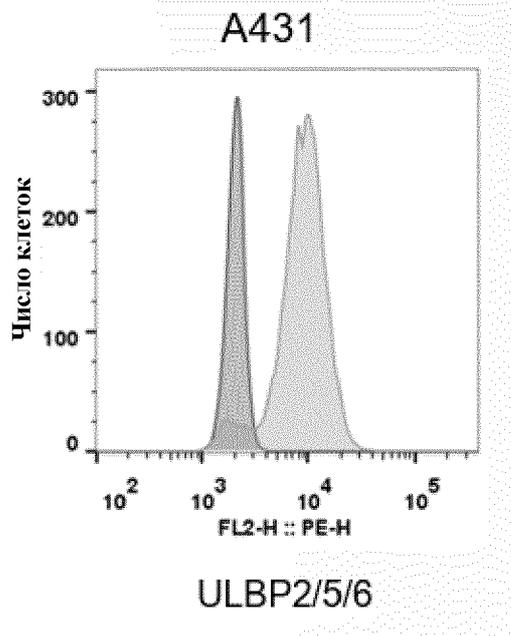
ФИГ. 10



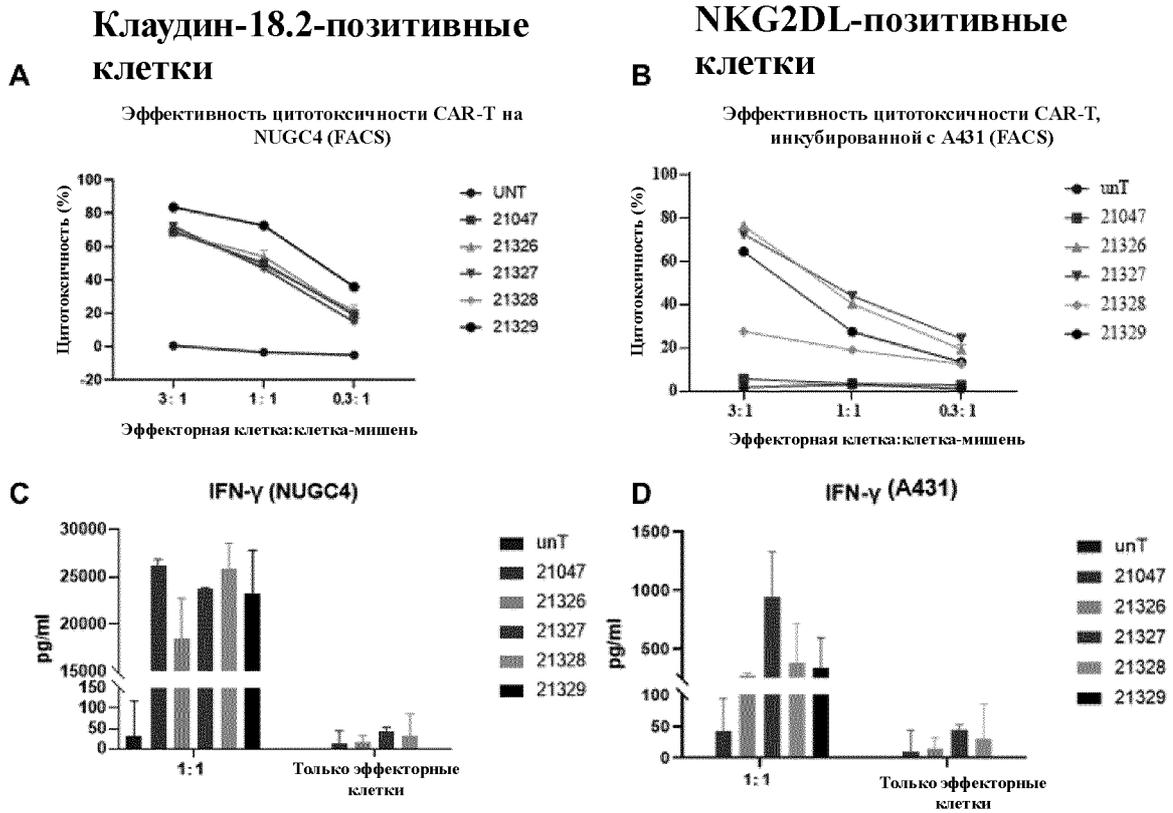
ФИГ. 11

21047	CAR					
21326	CAR	P2A	DAP12ICD	DAP10ICD	NKG2DFL	
21327	CAR	P2A	NKG2DECD	CD8 HINGE+TM	DAP10ECD	DAP12ICD
21328	CAR	P2A	NKG2DECD	CD8 HINGE+TM	4-1BB	DAP12ICD
21329	CAR	P2A	NKG2DECD	CD28 HINGE+TM+ICD	DAP12ICD	

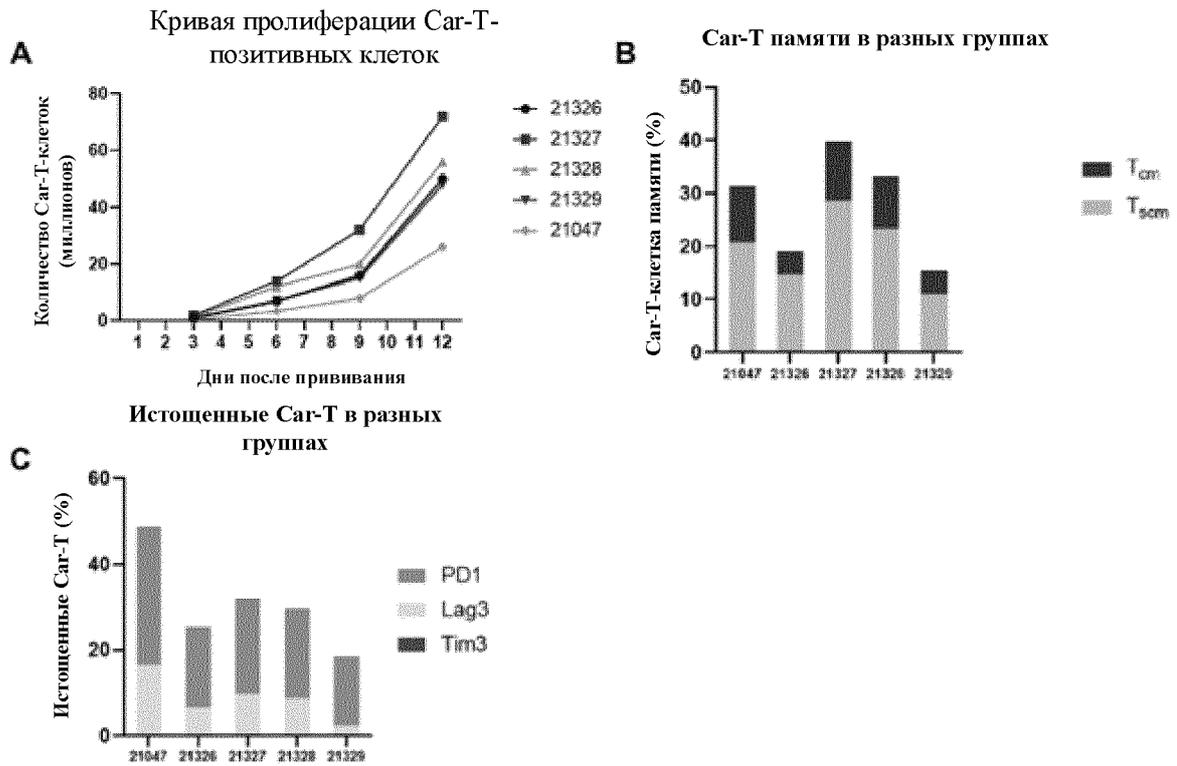
ФИГ. 12



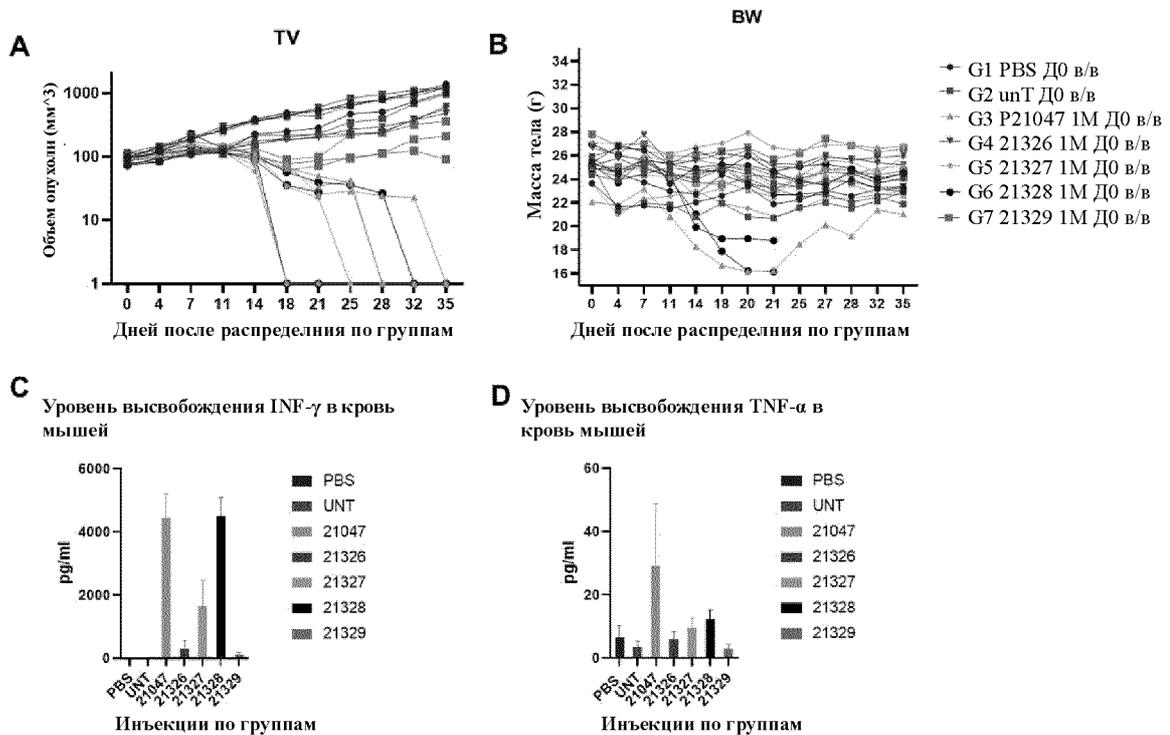
ФИГ. 13



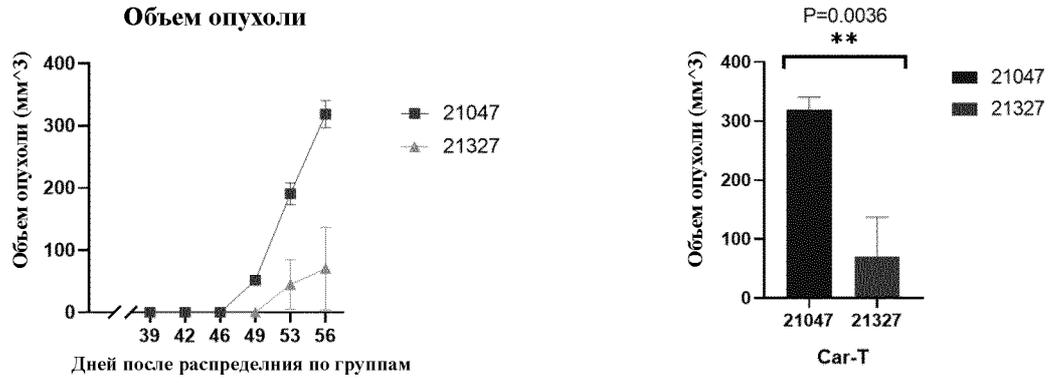
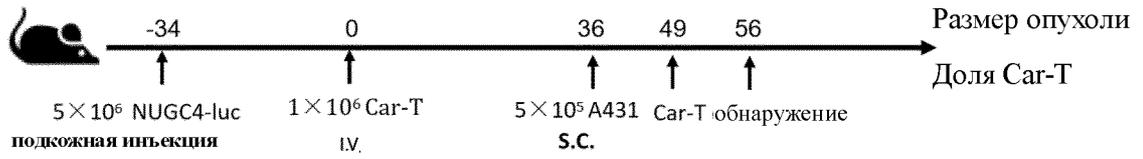
ФИГ. 14



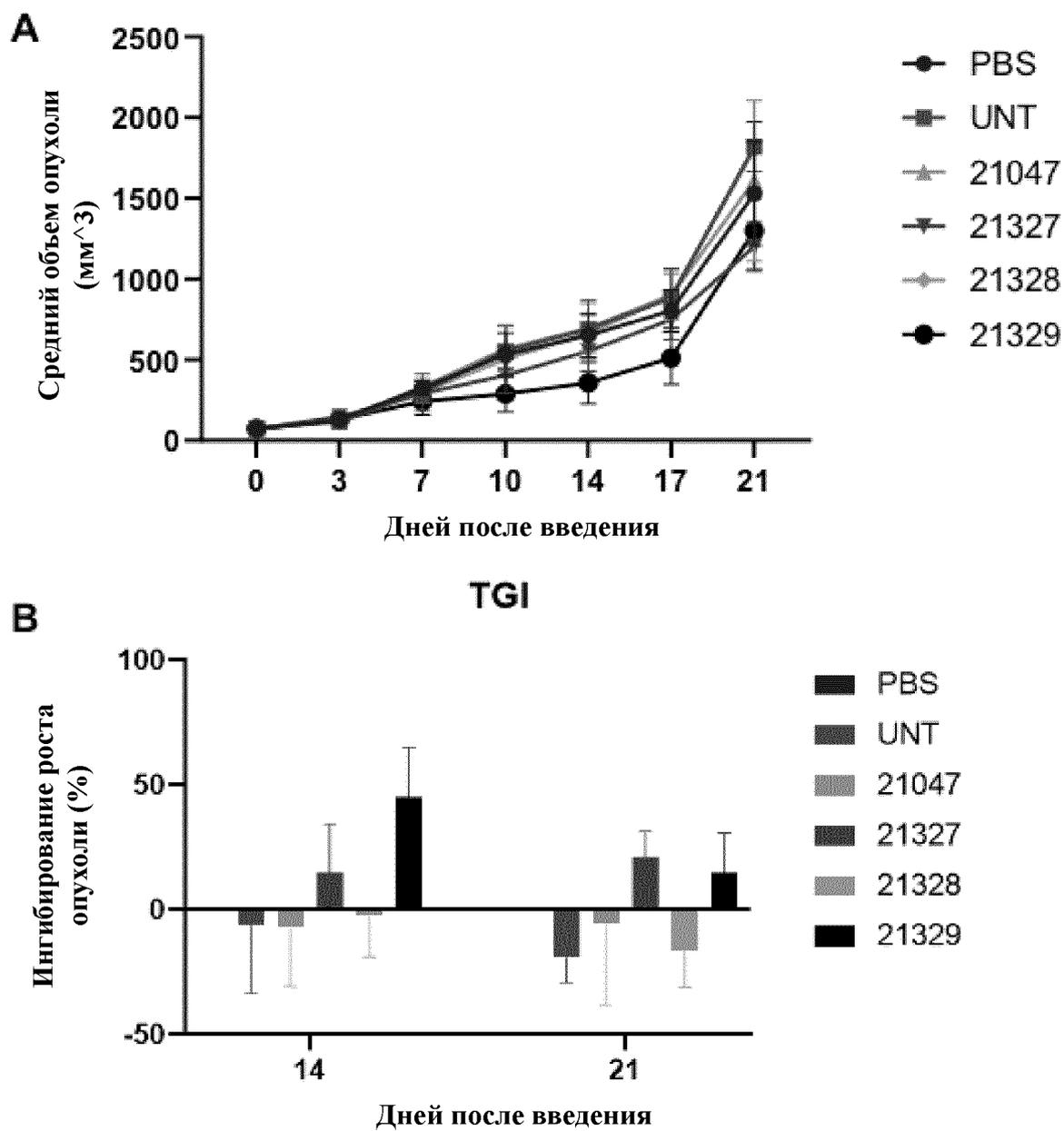
ФИГ. 15



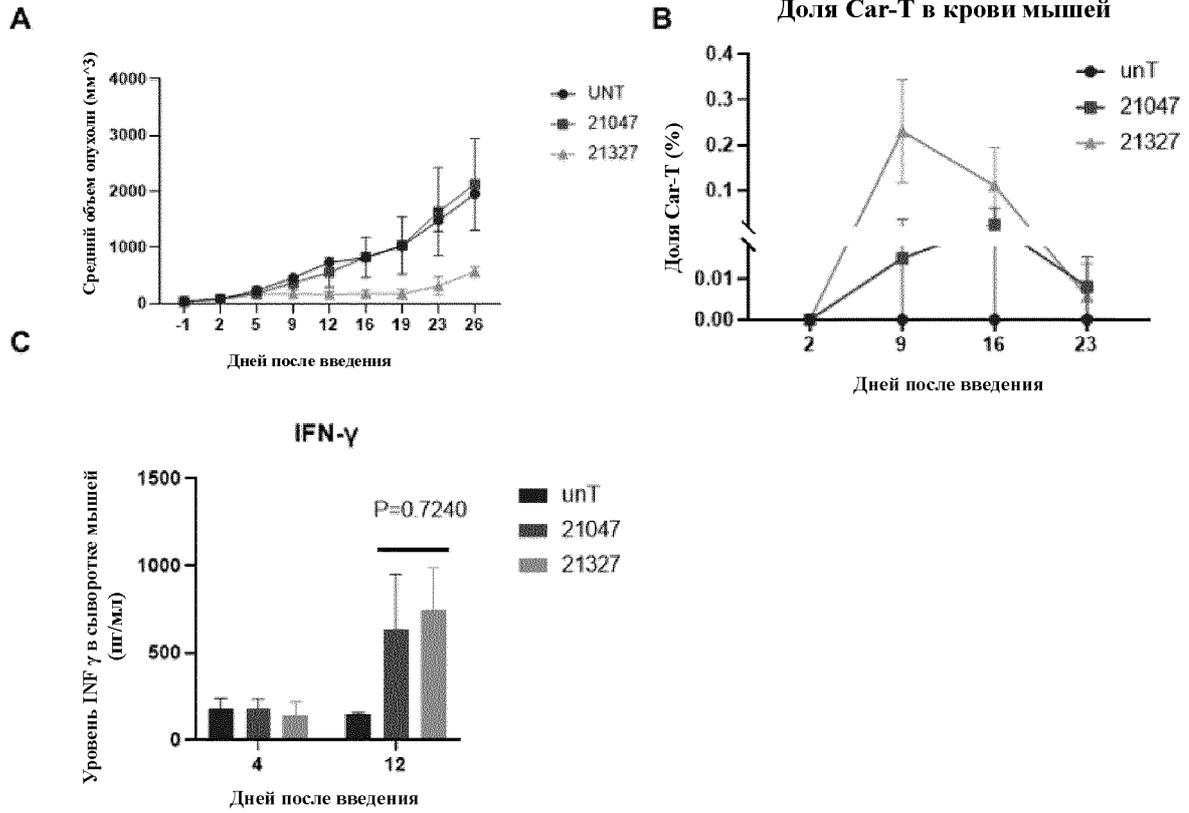
ФИГ. 16



ФИГ. 17



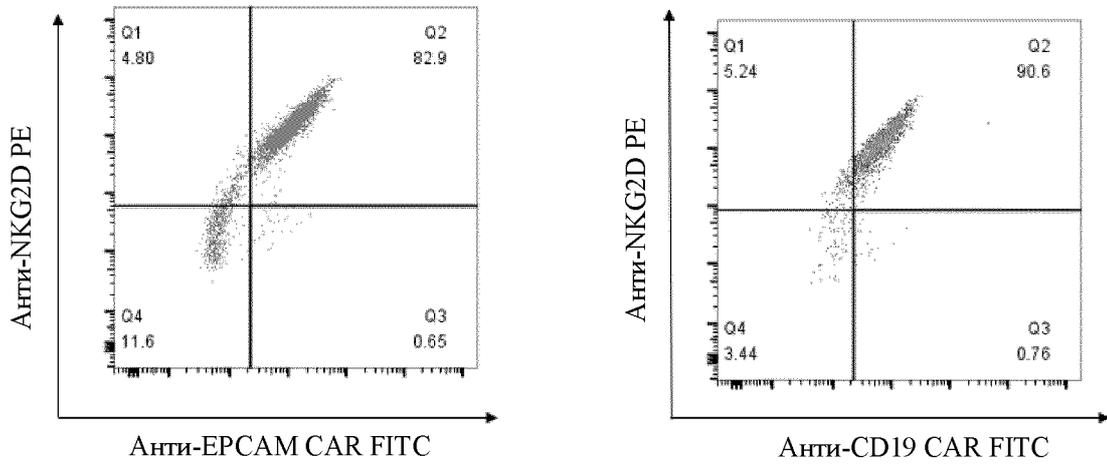
ФИГ. 18



ФИГ. 19

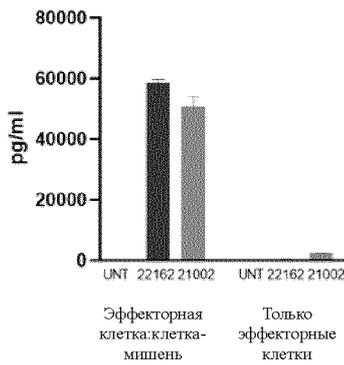
21002	EpCAM CAR					
21144	CD19 CAR					
22162	EpCAM CAR	P2A	NKG2DECD	CD8 HINGE+TM	DAP10ECD	DAP12ICD
22163	CD19 CAR	P2A	NKG2DECD	CD28 HINGE+TM+ICD	DAP12ICD	

ФИГ. 20

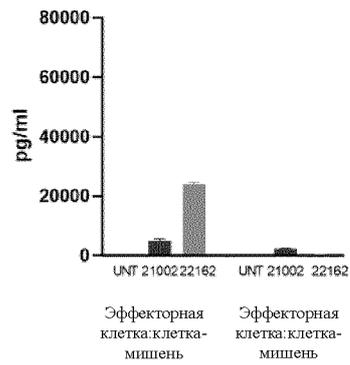


ФИГ. 21

Высвобождение IFN-γ из совместной культуры Саг-Т-клеток с клетками HCT116

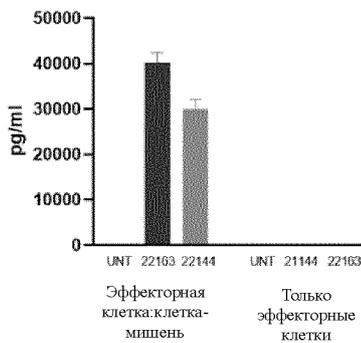


Высвобождение IFN-γ из совместной культуры Саг-Т-клеток с MIA-PaCa2

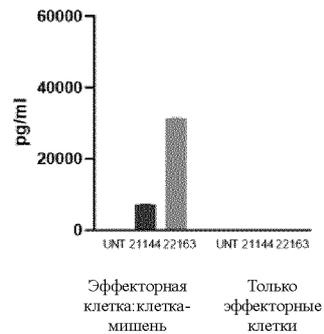


ФИГ. 22

Высвобождение IFN-γ из совместной культуры Саг-Т-клеток с клетками Raji



Высвобождение IFN-γ из совместной культуры Саг-Т-клеток с клетками MIA-PaCa2



ФИГ. 23