

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490396** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.04.09

(22) Дата подачи заявки
2022.08.05

(51) Int. Cl. **C07K 14/705** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)

**(54) НОВЫЙ ХИМЕРНЫЙ РЕЦЕПТОР АНТИГЕНА ПРОТИВ EphA2 И
ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ЕГО ИММУНОЦИТЫ**

(31) **10-2021-0103610**

(32) **2021.08.06**

(33) **KR**

(86) **PCT/KR2022/011685**

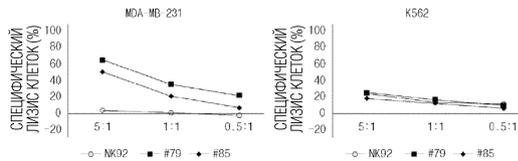
(87) **WO 2023/014182 2023.02.09**

(71) Заявитель:
**КОРЕЯ РИСЕРЧ ИНСТИТЮТ
ОФ БАЙОСАЙЕНС ЭНД
БАЙОТЕКНОЛОДЖИ; ОСОНГ
МЕДИКАЛ ИННОВЕЙШН
ФАУНДЕЙШН (KR)**

(72) Изобретатель:
**Ким Тэ-Дон, Ли Суюн, Чунг Хе-Юнг,
Канг Юнг Джу, Ким Ын Кенг, Ким Ю
Джунг, Ким Дае Йоунг, Ким Юнджи
(KR)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новому антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, специфически связывающему EphA2, к химерному рецептору антигена, содержащему антигенсвязывающий переменный фрагмент антитела, и к иммуноциту, экспрессирующему химерный рецептор антигена.



202490396

A1

A1

202490396

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580444EA/032

НОВЫЙ ХИМЕРНЫЙ РЕЦЕПТОР АНТИГЕНА ПРОТИВ EPH2 И ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ЕГО ИММУНОЦИТЫ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[1] Настоящее изобретение относится к новому антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, специфически связывающему EphA2, к химерному рецептору антигена, содержащему антигенсвязывающий варибельный фрагмент антитела, и к иммуноциту, экспрессирующему химерный рецептор антигена.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[2] Способы лечения злокачественных опухолей непрерывно развивались и изменялись, и такие способы, как хирургия, химиотерапия и радиотерапия, все еще используют в настоящее время. Однако эти общепринятые способы лечения злокачественных опухолей часто являются эффективными только на ранних стадиях, когда злокачественная опухоль не метастазировала, и если злокачественная опухоль уже метастазировала, существует высокая вероятность рецидива в будущем, даже если проводят хирургию. В последние годы исследователи изыскивали способы для использования иммунного ответа для лечения злокачественных опухолей.

[3] В частности, имеет место растущий интерес к видам клеточной терапии, в которых используют иммуноциты для их улучшения или генетической модификации и их повторной инфузии пациенту, например, инфильтрующие опухоль лимфоциты (TIL), химерные рецепторы антигенов (CAR) и Т-клеточные рецепторы (TCR). В частности, химерные рецепторы антигенов, представляющие собой искусственные рецепторы, разработанные для придания антигенной специфичности Т-клеткам или естественным клеткам-киллерам (NK-клеткам), состоят из внеклеточного домена, трансмембранного домена и внутриклеточного передающего сигналы домена, позволяющего рецептору активировать иммуноциты и обеспечивать специфический иммунитет посредством связывания со специфическими для злокачественной клетки антигенами. И Т-клетки, экспрессирующие эти химерные рецепторы антигенов, были названы CAR-Т-клетки (Kershaw *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.* 5(12): 928-940, 2005; Restifo *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.*, 12(4): 269-281, 2012), и естественные клетки-киллеры, экспрессирующие CAR, были названы CAR-NK-клетки.

[4] Внутриклеточный передающий сигналы домен вышеуказанных химерных рецепторов антигенов по большей части основан на внутриклеточном передающем сигналы домене CD3дзэта, передающей сигналы субъединице Т-клеточного рецептора (CAR первого поколения). Их развивали для включения внутриклеточных передающих сигналы доменов костимулирующих молекул, способствующих росту и дифференцировке иммуноцитов. Например, в выпущенных в настоящее время на рынок видах CAR-Т-клеточной терапии используют внутриклеточные передающие сигналы домены костимулирующих молекул CD28 и 4-1BB, соответственно (CAR второго поколения), и

впоследствии, тестируют CAR, содержащие внутриклеточные передающие сигналы домены как CD28, так и 4-1BB (CAR третьего поколения) (Stegen *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 14(7): 499-509, 2015).

[5] С другой стороны, известно, что белок EphA2 (рецептор 2 эфрина типа-A), экспрессируемый с гена EPHA2 у человека, является сверхэкспрессированным в различных типах злокачественных опухолей, включая рак молочной железы, рак предстательной железы, рак легкого и т.д., и как известно, стимулирует рост и инвазию злокачественных клеток. Кроме того, опубликовано, что экспрессия EphA2 является ассоциированной с частотой выживаемости пациентов с злокачественными опухолями. На фоне этого уровня техники, существует потребность в исследовании другого аспекта стратегий и способов для лечения злокачественных опухолей посредством разработки антител, нацеленных на вышеуказанный EphA2, который является особенно сверхэкспрессированным в злокачественных клетках, и в терапевтических средствах на основе CAR-T и CAR-NK с их использованием.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

ТЕХНИЧЕСКАЯ ЗАДАЧА

[6] Целью настоящего изобретения является получение антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые могут специфически связывать EphA2, преимущественно экспрессирующийся в злокачественных клетках.

[7] Кроме того, целью настоящего изобретения является получение нового химерного рецептора антигена, который, при экспрессии в иммунocyтaх, может умножать цитотоксическую или цитолитическую активность против злокачественных клеток.

[8] Кроме того, целью настоящего изобретения является получение полинуклеотида и экспрессирующего вектора для экспрессии химерных рецепторов антигенов.

[9] Также целью настоящего изобретения является получение иммунocyтa, оказывающего терапевтический эффект против злокачественной опухоли, посредством экспрессии химерного рецептора антигена на его поверхности.

[10] Кроме того, целью настоящего изобретения является получение фармацевтической композиции для лечения злокачественной опухоли с использованием иммунocyтa.

ТЕХНИЧЕСКОЕ РЕШЕНИЕ

[11] Для достижения вышеуказанных целей, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, специфически связывающему рецепторы 2 эфрина типа-A (EphA2), содержащему переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 10, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 11; и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи,

имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 12, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 13, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 14.

[12] В другом аспекте настоящее изобретение относится к химерному рецептору антигена (CAR), содержащему внеклеточный связывающий домен, содержащий антигенсвязывающий участок, специфически связывающий EphA2 (рецептор 2 эфрина типа-A); трансмембранный домен; и внутриклеточный передающий сигналы домен, где антигенсвязывающий участок, специфически связывающий EphA2, представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 10, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 12, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 13, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 14.

[13] В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный рецептор антигена, и к экспрессирующему вектору, содержащему полинуклеотид.

[14] В другом аспекте настоящее изобретение относится к иммуноциту, экспрессирующему химерный рецептор антигена на его поверхности.

[15] В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения злокачественной опухоли, содержащей иммуноцит.

ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ПРЕИМУЩЕСТВО ЭФФЕКТЫ

[16] Антитела по настоящему изобретению, их антигенсвязывающие фрагменты, и химерные рецепторы антигенов с их использованием могут специфически связывать EphA2, преимущественно экспрессирующийся в злокачественных клетках, и таким образом, оказывают эффект значительного усиления цитотоксической или цитолитической активности иммуноцитов и стимуляции секреции цитокинов, по мере того, как происходит передача сигнала в иммуноцитах, в которых экспрессируется химерный рецептор антигена. Кроме того, это оказывает эффект увеличения дегрануляции злокачественных клеток, культивируемых совместно с иммуноцитами.

[17] Таким образом, антитела по настоящему изобретению, химерные рецепторы антигенов с их использованием, и иммуноциты, экспрессирующие CAR, можно использовать для лечения злокачественной опухоли.

[18] Однако эффекты настоящего изобретения не ограничены упомянутыми выше, и другие эффекты, не упомянутые, станут очевидными специалисту в данной области из следующего описания.

ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

[19] ФИГ. 1a представляет собой схематическую диаграмму, представляющую структуру химерного рецептора антигена по настоящему изобретению (EphA2-CAR1), содержащего антигенсвязывающий вариабельный фрагмент (scFv), специфически связывающий EphA2, в качестве внеклеточного домена, и ФИГ. 1b представляет собой карту вектора, представляющую экспрессирующий вектор для экспрессии химерного рецептора антигена.

[20] ФИГ. 2a представляет собой схематическую диаграмму, представляющую структуру химерного рецептора антигена по настоящему изобретению (EphA2-CAR2), содержащего антигенсвязывающий вариабельный фрагмент (scFv), специфически связывающий EphA2, в качестве внеклеточного домена, и ФИГ. 2b представляет собой карту вектора, представляющую экспрессирующий вектор для экспрессии химерного рецептора антигена.

[21] На ФИГ. 3a показаны результаты определения экспрессии двух химерных рецепторов антигенов (EphA2-CAR1 и EphA2-CAR2) в естественных клетках-киллерах (EphA2#79-CAR1-NK-клетках и EphA2#85-CAR1-NK-клетках), в которых гены, кодирующие химерные рецепторы антигенов по настоящему изобретению, введены и экспрессированы, и на ФИГ. 3b показаны результаты определения экспрессии двух химерных рецепторов антигенов (EphA2-CAR1 и EphA2-CAR2) в Т-клетках (EphA2#79-CAR2-Т-клетках и EphA2#85-CAR2-Т-клетках), в которых гены, кодирующие химерные рецепторы антигенов по настоящему изобретению, введены и экспрессированы, соответственно.

[22] На ФИГ. 4 показаны результаты для экспрессии EphA2 в клетках MDA-MB-231, линии клеток рака молочной железы, клетках A549, линии клеток рака легкого, и клетках K562, линии клеток хронического миелоидного лейкоза.

[23] На ФИГ. 5 показаны результаты измерения и сравнения цитотоксичности (цитолитической активности) естественных клеток-киллеров (EphA2#79-CAR1-NK-клеток и EphA2#85-CAR1-NK-клеток), в которых гены, кодирующие химерные рецепторы антигенов по настоящему изобретению, введены и экспрессированы, против клеток MDA-MB-231, экспрессирующих EphA2, и клеток K562, не экспрессирующих EphA2.

[24] На ФИГ. 6 и 7 показаны результаты определения уровней экспрессии секретированного цитокина (IFN- γ , ФИГ. 6) и CD107 α (ФИГ. 7), маркера дегрануляции, в NK-клетках (EphA2#79-CAR1-NK-клетках и EphA2#85-CAR1-NK-клетках), в которых гены, кодирующие химерные рецепторы антигенов по настоящему изобретению, введены и экспрессированы, соответственно, после культивирования совместно с клетками MDA-MB-231, экспрессирующими EphA2, или клетками K562, не экспрессирующими EphA2.

[25] На ФИГ. 8 показаны результаты измерения цитотоксичности (цитолитической активности) Т-клеток (EphA2#79-CAR2-Т-клеток и EphA2#85-CAR2-Т-клеток), в которых гены, кодирующие химерные рецепторы антигенов по настоящему изобретению, введены и экспрессированы, против клеток А549, экспрессирующих EphA2.

[26] На ФИГ. 9а показан результат подтверждения того, экспрессируется ли EphA2 в клетках Н460, линии клеток рака легкого; на ФИГ. 9b показан результат подтверждения цитотоксичности (цитолитической активности) естественных клеток-киллеров (EphA2#79-CAR1-NK-клеток), в которых гены, кодирующие химерные рецепторы антигенов по настоящему изобретению, введены и экспрессированы, против клеток Н460; ФИГ. 9с представляет собой схематическую диаграмму, представляющую способ из эксперимента для подтверждения активности естественных клеток-киллеров, в которых гены, кодирующие химерные рецепторы антигенов по настоящему изобретению, введены и экспрессированы, у экспериментальных животных, подвергнутых инъекции клеток Н460; и на ФИГ. 9d и 9е показаны результаты подтверждения противораковой активности по цитотоксичности (цитолитической активности), против клеток Н460, естественных клеток-киллеров, в которых гены, кодирующие химерные рецепторы антигенов по настоящему изобретению, введены и экспрессированы, как измерено по размеру (ФИГ. 9d) и массе (ФИГ. 9е) опухоли, соответственно.

[27] На ФИГ. 10а и ФИГ. 10b показаны результаты противораковой активности по цитотоксичности (цитолитической активности), против клеток А549, Т-клеток (EphA2#79-CAR2-Т-клеток и EphA2#85-CAR2-Т-клеток), в которых гены, кодирующие химерные рецепторы антигенов по настоящему изобретению, введены и экспрессированы, у экспериментальных животных, подвергнутых инъекции клеток А549-Luciferase, как измерено по размеру (ФИГ. 10а) и массе (ФИГ. 10b) опухоли, соответственно. Кроме того, на ФИГ. 10с показан результат подтверждения присутствия EphA2-CAR2-Т-клеток в крови мышей; и на ФИГ. 10d показан результат подтверждения присутствия EphA2-CAR2-Т-клеток в опухолях.

НАИЛУЧШИЙ СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[28] Далее в настоящем описании, настоящее изобретение описано подробно.

[29] 1. Новые антитела к EphA2, их антигенсвязывающие фрагменты и содержащие их химерные рецепторы антигенов (CAR), и полинуклеотиды и экспрессирующие векторы для экспрессии CAR.

[30] В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу к EphA2 и его антигенсвязывающему фрагменту, которые могут специфически связывать EphA2.

[31] В рамках изобретения, термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая является иммунологически реактивной посредством специфического связывания с эпитопом антигена. Антитело может включать моноклональное антитело, поликлональное антитело, антитело со структурой полноразмерной цепи (полноразмерное антитело), функциональный фрагмент, имеющий по меньшей мере функцию связывания антигена (антигенсвязывающие фрагменты), и

рекомбинантное антитело, и более конкретно, антитело по настоящему изобретению может представлять собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Моноклональное антитело относится к молекуле антитела одного молекулярного состава, полученной из популяции по существу идентичных антител, и такое моноклональное антитело имеет одну специфичность связывания и аффинность для конкретного эпитопа. Полноразмерное антитело представляет собой структуру, имеющую две полноразмерных легких цепи и две полноразмерных тяжелых цепи, где каждая легкая цепь может быть связана с тяжелой цепью посредством дисульфидной связи. Антитело содержит полипептид тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC), где каждая из тяжелой и легкой цепей может содержать переменную область и константную область.

[32] Константная область представляет собой участок, опосредующий связывание антитела с различными типами клеток иммунной системы (например, Т-клетками) и тканями хозяина, включая компоненты системы комплемента, и т.п. Константная область служит для таких же функций, независимо от типа антигена, если антитело принадлежит к такому же типу, происходящему из такого же вида, и его аминокислотная последовательность является идентичной или высоко сходной среди антител. Константную область можно разделить на константную область тяжелой цепи (которая может быть сокращенно обозначена как C_H) и константную область легкой цепи (которая может быть сокращенно обозначена как C_L). Константная область тяжелой цепи может принадлежать к типу гамма (γ), мю (μ), альфа (α), дельта (δ) и/или эпсилон (ϵ), с подклассами гамма1 (γ_1), гамма2 (γ_2), гамма3 (γ_3), гамма4 (γ_4), альфа1 (α_1) и/или альфа2 (α_2). Константная область легкой цепи имеет типы каппа (κ) и лямбда (λ). IgG имеет подтипы, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[33] Переменная область представляет собой участок антитела, имеющий специфичность для антигена, который можно разделить на переменную область тяжелой цепи (которая может быть сокращенно обозначена как V_H) и переменную область легкой цепи (которая может быть сокращенно обозначена как V_L). Переменная область может включать три определяющие комплементарность области (CDR) и четыре каркасные области (FRs). CDR могут представлять собой кольцеобразные области, вовлеченные в узнавание антигена, и аминокислотная последовательность CDR может определять их специфичность для антигена. CDR могут быть обозначены как CDR1, CDR2, CDR3, в этом порядке, и в зависимости от того, представляют ли они собой CDR полипептида тяжелой цепи или легкой цепи, они могут быть обозначены как CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 для переменной области тяжелой цепи и CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 для переменной области легкой цепи. Сходным образом, FR могут быть обозначены как FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4 для переменной области тяжелой цепи и FR-L1, FR-L2, FR-L3, FR-L4 для переменной области легкой цепи. Кроме того, CDR и FR могут быть аранжированы в следующем порядке в каждой переменной области.

[34] В рамках изобретения термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к любому фрагменту гуманизированного антитела по настоящему изобретению, который

сохраняет функцию связывания антигена антитела. Антигенсвязывающий фрагмент может быть обозначен взаимозаменяемо с терминами «фрагмент», «фрагмент антитела» и т.п., и антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой, но без ограничения этим, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и т.п.

[35] Fab представляет собой структуру, имеющую переменные области легкой цепи и тяжелой цепи, константную область легкой цепи и первую константную область (домен CH1) тяжелой цепи, и имеющую один антигенсвязывающий участок. Fab' отличается от Fab тем, что он имеет шарнирную область, содержащую один или несколько остатков цистеина на С-конце домена CH1 тяжелой цепи. F(ab')₂ образуется посредством дисульфидной связи остатков цистеина в шарнирной области Fab'. Fv относится к минимальному фрагменту антитела, имеющему только переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи. Двухцепочечный Fv представляет собой Fv, в котором области тяжелой и легкой цепи связаны нековалентными связями, и одноцепочечный Fv представляет собой Fv, в котором области тяжелой и легкой цепи связаны ковалентными связями, как правило, через пептидный линкер, или напрямую на С-конце, который может формировать подобную димеру структуру, подобно двухцепочечному Fv. Антигенсвязывающий фрагмент можно получать с использованием, но без ограничения, протеолитических ферментов (например, посредством протеолитического расщепления полноразмерного антитела с использованием папаина получают фрагменты Fab и посредством протеолитического расщепления полноразмерного антитела с использованием пепсина получают фрагменты F(ab')₂), или посредством способов генетической рекомбинации.

[36] Линкер может представлять собой пептидный линкер, имеющий длину приблизительно 10-25 аминокислот. Например, линкер может включать гидрофильную аминокислоту, такую как глицин (G) и/или серин (S). Линкер может содержать, например, (GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n или (G_nS)_m (где n, m составляют 1-10, соответственно), например, но без ограничения, (G_nS)_m (где n, m составляют 1-10, соответственно).

[37] В рамках изобретения термин «эпитоп» относится к специфическому участку антигена, который иммуноглобулин, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может специфически узнавать и связывать. Эпитоп может быть сформирован из последовательных аминокислот или из непоследовательных аминокислот, сближенных посредством третичного сворачивания белка.

[38] «Специфически связывает» может означать связывание с другой молекулой с аффинностью связывания, большей чем фоновое связывание, например, внеклеточный домен может связываться с антигеном-мишенью с аффинностью приблизительно 10⁻⁵ М или более, или K_a (равновесной константой ассоциации для конкретного взаимодействия связывания, имеющей единицу 1/М). Аффинность может являться такой, что равновесная константа диссоциации (K_d) специфического взаимодействия связывания, имеющая единицу М, составляет от 10⁻⁵ М до 10⁻¹³ М или менее, или лежит в вышеуказанном диапазоне.

[39] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 10, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 11; и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 12, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 13, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 14; и специфически связывает рецептор 2 эфрина типа-A (EphA2).

[40] Переменная область тяжелой цепи может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 15.

[41] Переменная область легкой цепи может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 16.

[42] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению может дополнительно содержать, например, константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи антитела человеческого происхождения, и константную область тяжелой цепи и/или константную область легкой цепи антитела человеческого происхождения можно использовать, независимо от типов или аминокислотных последовательностей, при условии, что она не создает помех для способности антитела или антигенсвязывающего фрагмента специфически связывать EphA2.

[43] Вышеупомянутые аминокислотные последовательности могут включать варианты, имеющие различные последовательности из-за делеции, вставки, замены аминокислотных остатков, или их комбинации, если они не влияют на структуру, функцию, активность или т.п. содержащих их полипептидов. Кроме того, аминокислотные последовательности могут содержать аминокислоты, подвергнутые общепринятым модификациям, известным в данной области, таким как фосфорилирование, сульфатирование, акрирование, гликозилирование, метилирование, фарнезилирование и т.п. Гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в соответствии с настоящим изобретением, включает не только те, которые содержат аминокислотные последовательности, описанные выше, но также те, которые имеют по существу такую же аминокислотную последовательность или ее варианты. Значение имеющего по существу идентичную аминокислотную последовательность может включать, но без ограничения, аминокислотную последовательность, имеющую 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более, или 99,5% или более гомологию с аминокислотными последовательностями, описанными выше.

[44] В рамках изобретения термин «химерный рецептор антигена (CAR)» относится к синтетическому белку, сконструированному для узнавания антигена-мишени

и клеток, экспрессирующих антиген, и, после связывания, индукции иммунного ответа на них. химерный рецептор антигена может включать внеклеточный связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный передающий сигналы домен. Химерный рецептор антигена, экспрессированный на поверхности иммуноцитов, может узнавать и связывать специфические антигены, такие как антигены, экспрессированные на поверхности злокачественных клеток, посредством антигенсвязывающих участков, содержащихся во внеклеточном домене, и запускать передачу сигналов внутри иммуноцита для изменения активности иммуноцита, таким образом, нацеливания только на специфические антигены для запуска иммунного ответа.

[45] Химерный рецептор антигена (CAR) по настоящему изобретению содержит внеклеточный связывающий домен, содержащий антигенсвязывающий участок, специфически связывающий рецептор 2 эфрина типа-A (EphA2); трансмембранный домен; и внутриклеточный передающий сигналы домен.

[46] Антигенсвязывающий участок, специфически связывающий EphA2, может представлять собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) антитела против EphA2, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 10, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 12, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 13, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 14.

[47] Когда химерный рецептор антигена по настоящему изобретению экспрессируется на поверхности иммуноцита, связывание антигена-мишени EphA2 с рецептором может приводить к передаче сигналов внутри иммуноцита, усилению цитотоксичности (или цитолитической активности) иммуноцита и/или стимуляции секреции цитокинов иммуноцита. Усиление цитотоксичности (или цитолитической активности) и/или стимуляция секреции цитокинов могут являться такими, что иммуноцит проявляет цитотоксичность (или цитолитическую активность) и/или секретирует цитокины на более высоком уровне, чем цитотоксичность (или цитолитическая активность) и/или секреция цитокинов, проявляемые иммуноцитом в отсутствие антигена.

[48] Внеклеточный домен может дополнительно содержать по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из шарнирного домена и спейсерного домена. Антигенсвязывающий участок внеклеточного домена может быть соединен с трансмембранным доменом через шарнирный домен и/или спейсерный домен.

[49] Шарнирный домен может играть важную роль в расположении внеклеточного домена, поскольку он позволяет физическое отделение антигенсвязывающего участка от

поверхности иммуноцита, на котором экспрессируется химерный рецептор антигена, для обеспечения надлежащего межклеточного контакта, надлежащего связывания антиген/антигенсвязывающий участок и надлежащей активации химерного рецептора антигена. Химерный рецептор антигена может содержать один или несколько шарнирных доменов между внеклеточным доменом и трансмембранным доменом. Шарнирные домены могут происходить из природных, синтетических, полусинтетических или рекомбинантных источников. Шарнирный домен может содержать аминокислотную последовательность шарнирной области природного иммуноглобулина или шарнирной области измененного иммуноглобулина. Измененная шарнирная область может содержать (а) природную шарнирную область, имеющую изменение аминокислоты для вплоть до 30% (например, замену или делецию аминокислоты для вплоть до 25%, 20%, 15%, 10% или 5%), (b) изменение аминокислоты для вплоть до 30% (например, замену или делецию аминокислоты для вплоть до 25%, 20%, 15%, 10% или 5%) из длины по меньшей мере 10 аминокислот (например: по меньшей мере 12, 13, 14 или 15 аминокислот), или (с) часть природной шарнирной области, содержащую коровую шарнирную область (которая может иметь длину 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15, или по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот). В конкретных вариантах осуществления, один или несколько остатков цистеина в природной шарнирной области иммуноглобулина могут быть заменены на один или несколько других аминокислотных остатков (например, один или несколько остатков серина). Альтернативно или дополнительно, измененная шарнирная область иммуноглобулина может иметь другой аминокислотный остаток, такой как остаток пролина из шарнирной области иммуноглобулина дикого типа, замененный на цистеин. Шарнирный домен может представлять собой шарнирный домен, происходящий из внеклеточного домена трансмембранного белка типа 1, такого как CD8, CD4, CD28 и CD7, но можно использовать любой шарнирный домен, способный соединять антигенсвязывающий участок, трансмембранный домен и внутриклеточный передающий сигналы домен через клеточную мембрану, без ограничения. Кроме того, он может представлять собой шарнирную область дикого типа из этих молекул или может являться модифицированным.

[50] Спейсерный домен может быть обозначен как соединяющий домен, может содержать шарнирный домен, происходящий, например, из происходящего из CD28 шарнирного домена и/или происходящего из CD8 шарнирного домена, и может содержать весь или часть из происходящего из CD28 и/или происходящего из CD8 шарнирного домена.

[51] Шарнирный домен и/или спейсерный домен может представлять собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из эпитопа Мус, шарнирного домена CD8 и Fc, и более конкретно, может содержать эпитоп Мус и шарнирный домен CD8. Более конкретно, эпитоп Мус может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, шарнирный домен CD8 может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19.

[52] «Трансмембранный домен» относится к частичной области, которая соединяет и сливает внеклеточный домен и внутриклеточные передающие сигналы домены вместе, и служит для заякоривания химерного рецептора антигена в плазматической мембране иммуноцита. Трансмембранный домен может происходить из природных, синтетических, полусинтетических или рекомбинантных источников. Трансмембранный домен может происходить из одного из выбранных из группы, состоящей из цепи альфа (α), бета (β) или дзета (ζ) Т-клеточного рецептора (TCR), CD28, CD3 эпсилон (ϵ), CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154, но без ограничения этим.

[53] Трансмембранный домен может быть прикреплен к внеклеточному домену через линкер. Например, линкер может представлять собой короткий олигопептидный или полипептидный линкер длиной 2-10 аминокислот, и может представлять собой, например, дуплекс глицин (G)-серин (S), но без ограничения этим.

[54] Внутриклеточный передающий сигналы домен соответствует части, которая служит для передачи сигналов, образованных при связывании химерного рецептора антигена с антигеном, в цитоплазму иммуноцита, для запуска функций иммуноцита (например, активации, включая высвобождение цитотоксических (или цитолитических) факторов против клеток-мишеней, с антигеном на которых связываются химерные рецепторы антигенов, продукцию цитокинов, пролиферацию и цитотоксическую или цитолитическую активность, или другие клеточные ответы, запускаемые связыванием антигена). Внутриклеточный передающий сигналы домен может являться частью белка, который передает оперативные функциональные сигналы и направляет клетку на осуществление специализированных функций.

[55] Внутриклеточный передающий сигналы домен может представлять собой внутриклеточный передающий сигналы домен, ранее использованный в разработке химерных рецепторов антигенов. Конкретно, внутриклеточный передающий сигналы домен может содержать только цитоплазматический домен CD3 ζ , как используют в CAR первого поколения. И, как используют в CAR второго поколения, слитый белок, в котором цитоплазматический домен CD3 ζ комбинируют с костимулирующим доменом (CD28 или CD137/4-1BB) для усиления реакционной способности для иммуноцитов. Кроме того, можно использовать более одного костимулирующего домена, что использовали в CAR третьего поколения, костимулирующий домен можно сливать с 4-1BB, CD28 или OX40 для достижения размножения и персистенции содержащих CAR иммуноцитов *in vivo*. Кроме того, как используют в CAR четвертого поколения, можно использовать дополнительные гены, кодирующие цитокины, такие как IL-12 или IL-15, для дополнительной экспрессии иммунобелков (цитокинов) на основе CAR. Кроме того, внутриклеточный передающий сигналы домен может дополнительно содержать цепь рецептора интерлейкина, например, IL-2R β , для усиления иммуноцитов, как используют в CAR пятого поколения.

[56] Внутриклеточный передающий сигналы домен может происходить из по меньшей мере одного, выбранного из группы, состоящей из Т-клеточного рецептора (TCR) дзэта (ζ), FcR гамма (γ), FcR бета (β), CD3 гамма (γ), CD3 дельта (δ), CD3 эпсилон (ϵ), CD3 дзэта (ζ), CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

[57] Более конкретно, активация иммуноцитов посредством внутриклеточного передающего сигналы домена может быть опосредована двумя различными классами внутриклеточных передающих сигналы доменов. Например, активация иммуноцитов может быть опосредована передающими первичные сигналы доменами, инициирующими зависимую от антигена первичную активацию, и передающими костимулирующие сигналы доменами, действующими независимо от антигена образом для предоставления вторичной передачи сигналов. Таким образом, внутриклеточный передающий сигналы домен может содержать передающий первичные сигналы домен и передающий костимулирующие сигналы домен.

[58] «Передающий первичные сигналы домен» относится к передающему сигналы домену, который регулирует активацию иммуноцита стимулирующим или ингибирующим образом. Передающий первичные сигналы домен, действующий стимулирующим образом, может содержать передающий сигналы мотив, известный как иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы или ITAM. ITAM, содержащие передающий первичные сигналы домен, могут происходить из по меньшей мере одного, выбранного из группы, состоящей из, но без ограничения, TCR ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD66d и т.п. Более конкретно, передающий первичные сигналы домен может представлять собой, но без ограничения, CD3 ζ (дзэта).

[59] «Передающий костимулирующие сигналы домен» относится к внутриклеточному передающему сигналы домену костимулирующей молекулы. Такие передающие костимулирующие сигналы домены могут происходить по меньшей мере из одного, выбранного из группы, состоящей из CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), LFA-1 (CD11a/CD18), GITR, MyD88, DAP10, DAP12, PD-1, LIGHT, NKG2C, EphA2, CD83 и т.п., но без ограничения этим. Конкретно, костимулирующая молекула может представлять собой, но без ограничения, DAP10.

[60] Химерный рецептор антигена может содержать два или более внутриклеточных передающих сигналы доменов, и когда он содержит два или более внутриклеточных передающих сигналы доменов, внутриклеточные передающие сигналы домены могут быть соединены в сериях друг с другом. Альтернативно, они могут быть соединены через полипептидный линкер, состоящий из 2-10 аминокислот, где линкерная последовательность может представлять собой, например, последовательность из последовательных глицина-серина. Линкер может содержать, например, $(GS)_n$, $(GGS)_n$, $(GSGGS)_n$ или $(G_nS)_m$, где каждый из n и m составляет от 1 до 10, и может представлять собой, например, $(G_nS)_m$ (каждый из n и m составляет от 1 до 10), но без ограничения этим.

[61] Химерный рецептор антигена может дополнительно содержать стимулирующий иммунную функцию фактор для иммуноцита, например, стимулирующий иммунную функцию фактор может представлять собой сигнальную последовательность интерлейкина. Сигнальная последовательность интерлейкина может характеризоваться индукцией экспрессии интерлейкина (IL)-12, IL-8, IL-2 или т.п., но без ограничения этим. Кроме того, если иммуноцит представляет собой Т-клетку, стимулирующий иммунную функцию фактор может представлять собой сигнальную последовательность IL-7, CCL19 или т.п., но без ограничения этим.

[62] В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения, химерные рецепторы антигенов по настоящему изобретению получали посредством конструирования химерных рецепторов антигенов (EphA2-CAR1), содержащих scFv из двух антител против EphA2 (#79 и #85), имеющих такую же аминокислотную последовательность, как описано ранее, CD28, связанный с Мус и шарнирным доменом, в качестве трансмембранного домена и внутриклеточного передающего сигналы домена, и CD3-дзета и DAP10 в качестве внутриклеточного передающего сигналы домена. В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения, химерные рецепторы антигенов по настоящему изобретению получали посредством конструирования химерных рецепторов антигенов (EphA2-CAR2), содержащих scFv из двух антител против EphA2 (#79 и #85) с такой же аминокислотной последовательностью, как описано ранее, в качестве внеклеточного домена, CD8 в качестве шарнирного домена и трансмембранного домена, CD3-дзета и 41-BB, в качестве внутриклеточного передающего сигналы домена.

[63] Как описано выше, химерный рецептор антигена по настоящему изобретению может быть экспрессирован на поверхности иммуноцита для узнавания и связывания EphA2, что может усиливать цитотоксическую или цитолитическую активность иммуноцита, или индуцировать иммуноцит для секреции цитокинов. Таким образом, когда антигенсвязывающий участок химерного рецептора антигена узнает и связывает антиген в присутствии злокачественных клеток, экспрессирующих EphA2, может быть индуцирована передача сигнала для усиления цитотоксической или цитолитической активности иммуноцита и/или стимуляции секреции цитокинов, таким образом, делая его полезным в качестве химерного рецептора антигена с высокой цитотоксической или цитолитической активностью для атаки злокачественных клеток.

[64] В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду и экспрессирующему вектору для экспрессии химерного рецептора антигена.

[65] Полинуклеотид содержит последовательность, кодирующую химерный рецептор антигена.

[66] В рамках изобретения термин «полинуклеотид» исчерпывающим образом включает молекулу ДНК (гДНК и кДНК) и РНК, где основной строительный блок, нуклеотид, включает не только природный нуклеотид, но также аналог, сахара или основания которого являются модифицированными.

[67] «Кодирующий химерный рецептор антигена» означает, что полинуклеотид кодирует генетическую информацию, таким образом, что белок, имеющий аминокислотную последовательность химерного рецептора антигена по настоящему изобретению, может быть синтезирован посредством нормальных процессов экспрессии белка, таких как транскрипция и трансляция. Объем настоящего изобретения включает полинуклеотиды, кодирующие не только белки, имеющие точно такую же аминокислотную последовательность, как и химерный рецептор антигена, но также белки, имеющие по существу такую же аминокислотную последовательность, как этот белок, или белки, имеющие такую же и/или сходную активность, как этот белок, как описано выше.

[68] Конкретно, полинуклеотид по настоящему изобретению может содержать последовательность, кодирующую антигенсвязывающий переменный фрагмент антитела против EphA2, специфически связывающий EphA2, и более конкретно, может содержать последовательность SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

[69] Кроме того, полинуклеотид по настоящему изобретению может содержать не только нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенсвязывающие переменные фрагменты, но также нуклеотидные последовательности, кодирующие другую часть внеклеточного домена, ассоциированную с ними, трансмембранные домены, и/или внутриклеточные передающие сигналы домены, соответственно.

[70] Описание антител, антигенсвязывающих переменных фрагментов, внеклеточных доменов, трансмембранных доменов, внутриклеточных передающих сигналы доменов, и т.п. для химерных рецепторов антигенов является таким же, как описано ранее для них.

[71] Полинуклеотид может содержать последовательность SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23, или SEQ ID NO: 24, или SEQ ID NO: 25. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения, полинуклеотиды, содержащие SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23, получали для конструирования и экспрессии химерных рецепторов антигенов (EphA2-CAR1), содержащих scFv из двух антител против EphA2 (#79 и #85), в качестве внеклеточного домена, и CD28, связанный с Мус и шарнирным доменом, в качестве трансмембранного домена и внутриклеточного передающего сигналы домена, и CD3-дзэта и DAP10, в качестве внутриклеточного передающего сигналы домена, соответственно. В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения, полинуклеотиды, содержащие SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 25, получали для конструирования и экспрессии химерных рецепторов антигенов (EphA2-CAR2), содержащих scFv из двух антител против EphA2 (#79 и #85), в качестве внеклеточного домена, CD8, в качестве шарнирного домена и трансмембранного домена, и CD3-дзэта и DAP10, в качестве внутриклеточного передающего сигналы домена, соответственно.

[72] Полинуклеотид по настоящему изобретению может содержать последовательность, по существу идентичную последовательностям, перечисленным выше. Последовательность, по существу идентичная последовательностям, включает,

например, последовательность, которая, при транскрипции и трансляции, может приводить к синтезу белков, имеющих идентичную аминокислотную последовательность с САР, и может иметь нуклеотидную последовательность с 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 по меньшей мере 99,5% гомологией с последовательностями, перечисленными выше, но без ограничения этим.

[73] Полинуклеотид, кодирующий химерный рецептор антигена, может содержать оптимизированную последовательность, в зависимости от типа организма, в котором он должен быть введен и экспрессирован, и транскрипционной, трансляционной или другой системы экспрессии организма. Это обусловлено вырожденностью кодонов, в результате чего могут существовать различные комбинации нуклеотидных последовательностей, которые могут кодировать белок, подлежащий экспрессии, все из которых включены в объем настоящего изобретения. Модификация полинуклеотида, в соответствии с оптимизацией кодонного состава, может определяться типом организма, в котором химерный рецептор антигена по настоящему изобретению следует экспрессировать и применять, например, полинуклеотид по настоящему изобретению может представлять собой полинуклеотид, модифицированный посредством оптимизации для выбора кодонов у млекопитающих, приматов, и более конкретно, может являться модифицированным посредством оптимизации для экспрессии и функционирования у человека.

[74] Экспрессирующий вектор по настоящему изобретению содержит полинуклеотид.

[75] Поскольку полинуклеотид содержит последовательность, кодирующую химерный рецептор антигена по настоящему изобретению, экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид, может быть использован для продукции химерного рецептора антигена, может служить для переноса полинуклеотида в конкретные клетки или организм для экспрессии химерного рецептора антигена, или может быть использован для хранения полинуклеотида.

[76] Экспрессирующий вектор можно конструировать в прокариотической или эукариотической клетке в качестве хозяина.

[77] Например, если экспрессирующий вектор конструируют в прокариотической клетке, сильный промотор, способный управлять транскрипцией (например, промотор *tac*, промотор *lac*, промотор *lacUV5*, промотор *lpp*, промотор pL λ , промотор pR λ , промотор *rac5*, промотор *amp*, промотор *recA*, промотор SP6, промотор *trp* и промотор T7), участок связывания рибосомы для инициации трансляции, и последовательность терминации транскрипции/трансляции. Когда *E. coli* (например, HB101, BL21, DH5 α и т.д.) используют в качестве клетки-хозяина, участки промотора и оператора пути биосинтеза триптофана *E. coli* (Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158: 1018-1024, 1984) и левый промотор фага λ (pL λ promoter, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14: 399-445, 1980) можно использовать в качестве регуляторных участков. Если *Bacillus* используют в

качестве клетки-хозяина, промотор гена белка токсина из *Bacillus churriensis* (*Appl. Environ. Microbiol.*, 64:3932-3938, 1998; *Mol. Gen. Genet.*, 250: 734-741, 1996) или любой промотор, поддающийся экспрессии в *Bacillus*, можно использовать в качестве регуляторного участка. Экспрессирующие векторы можно конструировать из плазмид, часто используемых в данной области (например, pCL, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHС79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, серий pGEX, серий pET и pUC19), фагов (например, λ gt4- λ B, λ -Charon, λ Δz1 и M13) или вирусов (например, SV40).

[78] Если экспрессирующий вектор нацелен на эукариотическую клетку в качестве хозяина, промотор, происходящий из генома клетки млекопитающего (например, промотор металлотионеина, промотор β-актина, промотор гемоглобина человека и промотор мышечного креатина человека) или промотор, происходящий из вируса млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса, промотор 75K вируса осповакцины, промотор SV40, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор tk HSV, промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор LTR HIV, промотор вируса Молони, промотор вируса Эпштейна-Барр (EBV) и промотор вируса саркомы Рауса (RSV)) может быть использован, и как правило, имеет последовательность для полиаденилирования в качестве последовательности терминации транскрипции. Экспрессирующий вектор может представлять собой вектор, имеющий промотор CMV.

[79] Кроме того, экспрессирующий вектор можно сливать с дополнительной последовательностью для облегчения очистки экспрессированного с него антигена. Дополнительная последовательность, подлежащая слиянию, может включать, например, глутатион-S-трансферазу (Pharmacia, USA), связывающий мальтозу белок (NEB, USA), FLAG (IBI, USA) и 6x His (гексагистидин; Quiagen, USA). Кроме того, при условии, что белок, экспрессируемый посредством экспрессирующего вектора по настоящему изобретению, представляет собой химерный рецептор антигена, экспрессированный белок можно легко очищать посредством колонки с белком А или т.п., без необходимости дополнительной последовательности для очистки с учетом этого свойства.

[80] Экспрессирующий вектор может содержать ген устойчивости к антибиотику, общеупотребительный в данной области в качестве селективного маркера, например, ген устойчивости к ампициллину, гентамицину, карбенициллину, хлорамфениколу, стрептомицину, канамицину, генетицину, неомицину и тетрациклину.

[81] 2. Иммуноциты, экспрессирующие химерные рецепторы антигенов для EphA2 на их поверхности

[82] В другом аспекте настоящее изобретение относится к иммуноциту, отличающемуся тем, что он проявляет усиленную цитотоксическую или цитолитическую активность против злокачественных клеток, экспрессирующих EphA2.

[83] Иммуноцит экспрессирует на его поверхности химерный рецептор антигена по настоящему изобретению, как описано выше.

[84] Химерный рецептор антигена является таким же, как описано ранее в «1. Новые антитела против EphA2, их антигенсвязывающие фрагменты и содержащие их химерные рецепторы антигенов (CAR), и полинуклеотиды и экспрессирующие векторы для экспрессии CAR». Конкретно, химерный рецептор антигена может содержать антигенсвязывающий участок, способный к специфическому связыванию с антигеном EphA2, экспрессированным на злокачественной клетке.

[85] Иммуноцит может представлять собой любую клетку, способную индуцировать иммунитет для вызова желательного терапевтического эффекта, например, но без ограничения, любую клетку, выбранную из группы, состоящей из естественных клеток-киллеров (NK-клеток), Т-клеток, естественных Т-клеток-киллеров (NKT-клеток), индуцированных цитокином клеток-киллеров (CIK), макрофагов и дендритных клеток. Таким образом, иммуноцит, экспрессирующий химерный рецептор антигена на его клеточной поверхности, в соответствии с настоящим изобретением, может представлять собой CAR-NK-клетку (естественную клетку-киллера с химерным рецептором антигена), CAR-T-клетку (Т-клетку с химерным рецептором антигена), CAR-NKT-клетку (естественную Т-клетку-киллера с химерным рецептором антигена), CAR-макрофаг (макрофаг с химерным рецептором антигена) и т.п.

[86] Т-клетка может представлять собой, но без ограничения, цитотоксический Т-лимфоцит (CTL), инфильтрующие опухоль лимфоциты (TIL), Т-клетку, выделенную из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), и т.п.

[87] CAR-NK-клетка, представляющая собой клетку, в которой химерный рецептор антигена введен в естественную клетку-киллера, имеет то преимущество, что является способной устранять проблемы персистирующей токсичности, риска аутоиммунных заболеваний, реакции трансплантат против хозяина (GVHD) и нецелевой токсичности иммунотерапии злокачественных опухолей с использованием общепринятых основанных на Т-клетках терапевтических средств CAR-T, так же как является способной к нацеливанию на различные злокачественные клетки посредством включения/выключения ответа, и может быть использована в качестве терапевтического средства общего назначения.

[88] Иммуноцит по настоящему изобретению экспрессирует на его клеточной поверхности химерный рецептор антигена, содержащий антигенсвязывающий переменный фрагмент (scFv) антитела, способный к специфическому узнаванию и связыванию EphA2, который может специфически экспрессироваться в злокачественных клетках, в качестве внеклеточного домена. Таким образом, в присутствии злокачественных клеток, экспрессирующих EphA2, может происходить передача сигнала посредством химерного рецептора антигена, которая далее усиливает цитотоксическую или цитолитическую активность иммуноцита и увеличивает секрецию цитокинов. Таким образом, иммуноцит по настоящему изобретению может иметь активность для атаки и лечения злокачественных клеток.

[89] В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения, химерные рецепторы антигенов, содержащие антигенсвязывающие переменные фрагменты двух специфических для EphA2 антител по настоящему изобретению, в качестве внеклеточных доменов, экспрессировали на поверхности естественных клеток-киллеров и Т-клеток. Каждую из двух естественных клеток-киллеров культивировали совместно с клетками MDA-MB-231, линией клеток рака молочной железы, экспрессирующей EphA2, и каждую из двух Т-клеток культивировали совместно с клетками A549, линией клеток рака легкого, экспрессирующей EphA2. Цитотоксичность (или цитолитическая активность) усиливалась, уровень секреции цитокинов являлся значимо увеличенным, и степень дегрануляции являлась также увеличенной, подтверждая, что иммуноцит по настоящему изобретению оказывает терапевтический эффект на злокачественные клетки, экспрессирующие EphA2. Кроме того, терапевтический эффект на злокачественные клетки, как описано выше, был ясно подтвержден в модели на животном, которому были имплантированы злокачественные клетки.

[90] 3. Терапевтическое применение для лечения злокачественной опухоли иммуноцитов по настоящему изобретению

[91] В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения злокачественной опухоли, содержащей иммуноциты.

[92] Описание, применительно к иммуноциту, экспрессированному на нем химерному рецептору антигена и т.п., является идентичным описанию для них в «1. Новые антитела против EphA2, их антигенсвязывающие фрагменты и содержащие их химерные рецепторы антигенов (CAR), и полинуклеотиды и экспрессирующие векторы для экспрессии CAR» и «2. Иммуноциты, экспрессирующие химерные рецепторы антигенов для EphA2 на их поверхности», и, таким образом, опущено во избежание повторения.

[93] В рамках изобретения термин «злокачественная опухоль» использован взаимозаменяемо с «опухоль» и обозначает или означает физиологическое состояние млекопитающего, как правило, характеризующееся неконтролируемым ростом/пролиферацией клеток.

[94] Злокачественная опухоль или опухоль, которые можно лечить с использованием композиций по настоящему изобретению, включают как солидные, так и гематологические злокачественные опухоли, но без конкретного ограничения этим. Например, злокачественная опухоль может представлять собой по меньшей мере одну, выбранную из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака яичника, рака шейки матки, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака ободочной кишки, рака пищевода, рака кожи, рака щитовидной железы, рака почки, рака печени, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, злокачественной опухоли клеток крови, множественной миеломы, острого миелоидного лейкоза, злокачественной лимфомы, злокачественной опухоли тимуса, остеосаркомы, фиброзной опухоли и злокачественной опухоли мозга, но без ограничения этим, и любую

злокачественную клетку, содержащую антиген, узнаваемый химерным рецептором антигена, можно использовать по настоящему изобретению, без ограничения.

[95] В рамках изобретения, термин «лечение» означает ингибирование развития злокачественной опухоли, уменьшение или прекращение ее симптомов.

[96] Фармацевтическая композиция может содержать иммунциты в количестве, в от 1 до 10, 2-10 или 5-10 раз большем, чем количество клеток опухоли у субъекта, подлежащего лечению, но без ограничения этим.

[97] Композиция может находиться в форме фармацевтической композиции, композиции пролекарства, нутрицевтической композиции или т.п.

[98] Композиции для лечения злокачественной опухоли по настоящему изобретению могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Значением «фармацевтически приемлемого» является то, что он не ингибирует активность активного ингредиента и не имеет более, чем приемлемой токсичности для субъекта, которому его вводят (назначают), и «носитель» определяют как соединение, способствующее введению соединения в клетку или ткань.

[99] Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с любым удобным носителем, и такие лекарственные формы могут представлять собой составы однократной дозы или повторяющихся доз. Фармацевтическая композиция по изобретению может представлять собой твердый дозированный состав или жидкий дозированный состав. Твердый дозированный состав включает, но без ограничения, порошки, гранулы, таблетки, капсулы, суппозитории и т.п. Твердый дозированный состав может включать, но без ограничения, носители, вкусоароматические средства, связующие вещества, консерванты, дезинтегрирующие средства, придающие блеск средства и наполнители. Жидкий дозированный состав включает, но без ограничения, воду, растворитель, такой как раствор пропиленгликоля, суспензию, эмульсию, и т.п., и может быть получен посредством добавления подходящих окрашивающих средств, ароматизаторов, стабилизаторов, средств для увеличения вязкости, и т.п. Например, порошки можно получать посредством простого смешивания активного ингредиента по настоящему изобретению, с подходящим фармацевтически приемлемым носителем, таким как лактоза, крахмал, микрокристаллическая целлюлоза и т.д. Гранулы можно получать посредством смешивания активного ингредиента по настоящему изобретению с фармацевтически приемлемым подходящим носителем, и фармацевтически приемлемым подходящим связующим, таким как поливинилпирролидон, гидроксипропилцеллюлоза, и затем использованием способа влажной грануляции с использованием растворителя, такого как вода, этанол, изопропанол или т.п., или способа сухой грануляции с использованием усилия прессования. Таблетки можно также получать посредством смешивания гранул с соответствующим фармацевтически приемлемым способствующим скольжению средством, таким как стеарат магния, и таблетирования с использованием таблетировочного устройства.

[100] Фармацевтические композиции можно вводить в форме пероральной лекарственной формы, инъекционной лекарственной формы (например, внутримышечной, внутривенной, инфузионной, подкожной, имплантируемой), ингаляционной лекарственной формы, назальной лекарственной формы, вагинальной лекарственной формы, ректальной лекарственной формы, подъязычной лекарственной формы, чрескожной лекарственной формы, местной лекарственной формы, или иным образом, в зависимости от состояния, подлежащего лечению, и состояния субъекта, подлежащего лечению, но без ограничения этим. В зависимости от способа введения, фармацевтическую композицию можно составлять в любом подходящем составе единичной дозы, содержащем общеупотребительные, нетоксичные, фармацевтически приемлемые носители, наполнители и переносчики.

[101] Фармацевтическую композицию можно вводить в ежесуточной дозе от приблизительно 0,0001 мг/кг до приблизительно 10 г/кг, и можно вводить в ежесуточной дозе от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 1 г/кг. Однако, дозу можно менять, в зависимости от степени очистки смеси, состояния пациента (возраста, пола, массы и т.д.), тяжести состояния, подвергаемого лечению, и т.п. При необходимости, общую ежесуточную дозу можно разделять на несколько доз на протяжении суток для удобства.

[102] Далее в настоящем описании, настоящее изобретение подробно описано посредством следующих примеров.

[103] Однако следующие примеры являются исключительно иллюстрирующими настоящее изобретение, и настоящее изобретение не ограничено следующими примерами.

[104] Пример 1

[105] 1-1: Получение одноцепочечных переменных фрагментов антител, которые специфически связывают EphA2

[106] Из числа последовательностей антител против EphA2, которые могут специфически связывать белок рецептор 2 эфрина типа-A (EphA2), экспрессируемый в злокачественных клетках, два одноцепочечных переменных фрагмента (scFv) (#79, #85) были получены с использованием последовательностей, играющих важную роль в специфическом связывании.

[107] Для scFv #79, переменная область тяжелой цепи, содержащая CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 и CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, переменная область легкой цепи, содержащая CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. И для scFv #85, переменная область тяжелой цепи, содержащая CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, переменная область

легкой цепи, содержащая CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

[108] 1-2: Дизайн химерных рецепторов антигенов для введения в естественные клетки-киллеры

[109] Авторы настоящего изобретения сконструировали химерный рецептор антигена (CAR) для введения в естественные клетки-киллеры с использованием двух scFv, сконструированных, как выше, в качестве внеклеточных доменов, содержащих антигенсвязывающие участки. Конкретно, авторы настоящего изобретения сконструировали химерные рецепторы антигенов (EphA2#79-CAR1 и EphA2#85-CAR1, соответственно, и в совокупности обозначенные как «EphA2-CAR1») с наличием внутриклеточных передающих сигналы доменов химерного рецептора антигена, классифицированного как так называемый CAR третьего поколения, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, посредством использования внеклеточных доменов, включающих два scFv, в качестве антигенсвязывающих участков, CD28 в качестве трансмембранного домена, связанного с Мус и шарнирным доменом, и CD3-дзета в качестве внутриклеточного передающего сигналы домена, и CD28, DAP10, в качестве костимулирующих молекул, были дополнительно соединены с трансмембранным доменом. И затем, полинуклеотиды, имеющие нуклеотидные последовательности кодирующих их генных конструкций, были затем вставлены в лентивирусные векторы (ФИГ. 1).

[110] 1-3: Дизайн химерных рецепторов антигенов для введения в Т-клетки

[111] Кроме того, авторы настоящего изобретения сконструировали химерные рецепторы антигенов для введения в Т-клетки с использованием двух scFv, сконструированных, как описано выше, в качестве внеклеточных доменов, содержащих антигенсвязывающие участки. Конкретно, авторы настоящего изобретения сконструировали химерные рецепторы антигенов (EphA2#79-CAR2 и EphA2#85-CAR2, соответственно, и в совокупности обозначенные как «EphA2-CAR2») с наличием внутриклеточных передающих сигналы доменов химерного рецептора антигена, классифицированного как так называемый CAR второго поколения, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, посредством использования внеклеточных доменов, включающих два scFv, в качестве антигенсвязывающих участков, CD8 в качестве трансмембранного домена и шарнирного домена, и CD3-дзета в качестве внутриклеточного передающего сигналы домена, и 4-1BB в качестве костимулирующей молекулы, были дополнительно соединены с трансмембранным доменом. И затем, полинуклеотиды, имеющие нуклеотидные последовательности кодирующих их генных конструкций, были затем вставлены в лентивирусные векторы (ФИГ. 2).

[112] Пример 2

[113] Получение иммуноцитов, экспрессирующих химерные рецепторы антигенов для EphA2 на их поверхности

[114] Были получены иммуноциты, способные экспрессировать химерные рецепторы антигенов по настоящему изобретению, сконструированные в примере 1.

[115] 2-1: Получение естественных клеток-киллеров, экспрессирующих EphA2-CAR1

[116] Lentiviral векторы, полученные в примерах 1-2 выше, и векторы для упаковки вирусов (pMDLg/RRE, pRSV/REV, VSVG) трансфицировали в клетки HEK293T, и получали из них лентивирусы, экспрессирующие EphA2-CAR1, которые концентрировали с использованием ультрацентрифуги, и затем инфицировали естественные клетки-киллеры с множественностью инфекции (MOI) 30 посредством способа спинокуляции (360g, 90 мин, RT). Инфицированные естественные клетки-киллеры инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 5 часов, и затем среду заменяли на свежую, и культивирование продолжали посредством их обработки пуромицином при концентрации 3 мкг/мл для отбора надлежащим образом инфицированных естественных клеток-киллеров через 3 суток. В качестве контроля, неинфицированные естественные клетки-киллеры также обрабатывали пуромицином, и культивирование продолжали с использованием обработанной пуромицином среды, пока все естественные клетки-киллеры для контроля не были уничтожены посредством пуромицина. В точке, когда все естественные клетки-киллеры в контрольной группе были уничтожены, инфицированные естественные клетки-киллеры отбирали, и проводили эксперименты.

[117] Естественные клетки-киллеры, экспрессирующие EphA2#79-CAR1 и EphA2#85-CAR1 (обозначенные как «EphA2#79-CAR1-NK-клетки» и «EphA2#85-CAR1-NK-клетки», соответственно, и в совокупности обозначенные как «EphA2-CAR1-NK-клетки»), полученные и подвергнутые скринингу, как описано выше, обрабатывали с использованием антитела против мус, специфически связывающего мус из EphA2-CAR1 (CST; 9B11), которое специфически связывается с мус на EphA2-CAR1, обрабатывали (30 мин при 4°C *in vivo*), и экспрессию Мус подтверждали посредством проточной цитометрии. В качестве контроля, использовали интактные естественные клетки-киллеры, которые не экспрессируют EphA2-CAR1.

[118] В результате, обнаружено, что EphA2-CAR1 надлежащим образом экспрессировался в обеих EphA2-CAR1-NK-клетках, по сравнению с контролем, как показано на ФИГ. 3а.

[119] 2-2: Получение Т-клеток, экспрессирующих EphA2-CAR2

[120] Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) подвергали дифференцировке в Т-клетки, и затем лентивирусный вектор, полученный в примерах 1-3 выше, трансфицировали в дифференцированные Т-клетки с использованием такого же способа сбора вируса и спинокуляции, как в примерах 2-1 выше (5 MOI, 300g, 32°C, 90 мин), для инфекции дифференцированных Т-клеток для получения Т-клеток, экспрессирующих EphA2#79-CAR2 и EphA2#85-CAR2 (обозначенных как «EphA2#79-

CAR2-T-клетки» и «EphA2#85-CAR2-T-клетки», соответственно, и в совокупности обозначенных как «EphA2-CAR2-T-клетки»). Экспрессию EphA2-CAR2 затем подтверждали посредством проточной цитометрии с использованием антител против EphA2 (рекомбинантного белка EphA2 с His-меткой (NKMAX) и конъюгированного с FITC антитела против 6X His-метки[®] - (abcam)), с нативными T-клетками, не экспрессирующими EphA2-CAR2, используемыми в качестве контроля.

[121] В результате, обнаружено, что EphA2-CAR2 надлежащим образом экспрессировался в обеих EphA2-CAR2-T-клетках, по сравнению с контролем, как показано на ФИГ. 3b.

[122] Пример 3

[123] Определение цитотоксичности (или цитолитической активности) EphA2-CAR1-NK-клеток и EphA2-CAR2-T-клеток против злокачественных клеток, экспрессирующих EphA2.

[124] Поскольку естественные клетки-киллеры и T-клетки, экспрессирующие химерные рецепторы антигенов по настоящему изобретению на их поверхности, такие как клетки, полученные в примере 2, включают scFv, специфические для EphA2, в качестве антигенсвязывающих участков, авторы настоящего изобретения исследовали их цитотоксичность против злокачественных клеток, экспрессирующих EphA2.

[125] 3-1 Отбор злокачественных клеток, экспрессирующих EphA2

[126] Сначала, авторы настоящего изобретения выбрали клетки MDA-MB-231 линии клеток рака молочной железы (Корейский банк клеточных линий (Korea Cell Line Bank)) и клетки A549 линии клеток рака легкого (Korea Cell Line Bank) в качестве злокачественных клеток, экспрессирующих EphA2, и клетки K562 линии клеток хронического миелоидного лейкоза (Korea Cell Line Bank), в качестве злокачественных клеток, не экспрессирующих EphA2, после обработки антителом против EphA2 (человеческого EphA2/мышьего IgG2A конъюгированного с Alexa Fluor[®] 488 антитела (R&D systems)) в количестве 1 мкл/100 мкл, клетки инкубировали (4°C, 30 минут в темноте), и уровень экспрессии EphA2 в трех линиях клеток определяли посредством проточной цитометрии.

[127] В результате, обнаружено, что клетки MDA-MB-231 и клетки A549 экспрессировали EphA2, и обнаружено, что клетки K562 не экспрессировали EphA2, как показано на ФИГ. 4.

[128] 3-2: Подтверждение активности EphA2-CAR1-NK-клеток против экспрессирующих EphA2 злокачественных клеток

[129] Цитотоксичность двух типов EphA2-CAR1-NK-клеток, полученных в примере 2-1, подтверждали с использованием анализа с кальцеином-AM, против клеток MDA-MB-231 и клеток K562, экспрессия EphA2 в которых была подтверждена, как описано выше. Конкретно, клетки MDA-MB-231 и клетки K562 обрабатывали кальцеином в концентрации 5 мкг/мл и инкубировали (37°C, 5% CO₂, 1 час в темноте), и затем каждую злокачественную клетку, окрашенную кальцеином, рассеивали с исходными

естественными клетками-киллерами и с каждой из вышеуказанных двух EphA2-CAR1-NK-клеток в соотношении 5:1, 1:1, 0,5:1 (естественные клетки-киллеры: злокачественные клетки), и инкубировали (4 часа при 37°C, 5% CO₂), и затем 100 мкл супернатанта отбирали для определения количества кальцеина, присутствующего в супернатанте.

[130] В результате, обнаружено, что как для EphA2#79-CAR1-NK-клеток, так и для EphA2#85-CAR1-NK-клеток показана значимо более высокая цитотоксичность против экспрессирующих EphA2 клеток MDA-MB-231, по сравнению с контрольными естественными клетками-киллерами, как показано на ФИГ. 5, и что эта цитотоксичность являлась зависимой от концентрации EphA2-CAR1-NK-клеток при обработке. В отличие от этого, как для контрольных NK-клеток, так и для двух EphA2-CAR1-NK-клеток показана небольшая цитотоксичность против клеток K562, не экспрессирующих EphA2.

[131] Кроме того, секрецию цитокинов и гранулы подтверждали для двух типов EphA2-CAR1-NK-клеток. Конкретно, клетки MDA-MB-231 и клетки K562 обрабатывали и инкубировали 1:1 либо с исходными естественными клетками-киллерами, либо с каждым из двух типов EphA2-CAR1-NK-клеток, полученных в примере 2-1 выше (16 часов при 37°C, 5%CO₂), и затем супернатант собирали, и INF-γ (интерферон-γ), присутствующий в супернатанте, подтверждали посредством ELISA. Количество цитокина, секретированное контрольными естественными клетками-киллерами и EphA2-CAR1-NK-клетками отдельно, использовали в качестве контроля.

[132] В результате, как показано на ФИГ. 6, обнаружено, что секреция INF-γ являлась значимо усиленной только в EphA2-CAR1-NK-клетках, обработанных с использованием клеток MDA-MB-231, экспрессирующих EphA2.

[133] Кроме того, клетки MDA-MB-231 и клетки K562, так же как контрольные естественные клетки-киллеры или каждый из двух типов EphA2-CAR1-NK-клеток, полученных в примере 2-1, смешивали в RPMI (10% FBS) при 1:1, и затем инкубировали (4 часа при 37°C, 5% CO₂), обрабатывали и окрашивали с использованием антитела против CD56 для отбора естественных клеток-киллеров, и анализировали уровень экспрессии CD107a в контрольных естественных клетках-киллерах и двух типах EphA2-CAR1-NK-клеток посредством проточной цитометрии.

[134] В результате, как показано на ФИГ. 7, обнаружено, что экспрессия CD107a являлась значимо усиленной только в EphA2-CAR1-NK-клетках, обработанных с использованием экспрессирующих EphA2 клеток MDA-MB-231, как и в случае с INF-γ.

[135] 3-3: Подтверждение активности EphA2-CAR2-T-клеток против экспрессирующих EphA2 злокачественных клеток

[136] GFP экспрессировали в клетках A549, экспрессия EphA2 в которых была подтверждена, как описано выше, и EphA2-CAR2-T-клетки, полученные в примерах 2-2, обрабатывали с использованием соотношения (T-клетки: злокачественные клетки) 2:1, 1:1, 0,5:1 и 0,25:1, соответственно, и инкубировали в течение 48 часов на оборудовании IncuCyte, и данные собирали каждые 4 часа, и цитотоксичность EphA2-CAR2-T-клеток анализировали с использованием программы IncuCyte ZOOM.

[137] В результате, было подтверждено, что два типа EphA2-CAR2-T-клеток проявляли цитотоксичность против клеток A549, экспрессирующих EphA2, как показано на ФИГ. 8.

[138] Пример 4

[139] Подтверждение цитотоксичности (или цитолитической активности) EphA2-CAR1-NK-клеток и EphA2-CAR2-T-клеток *in vivo*

[140] Цитотоксичность естественных клеток-киллеров и T-клеток, экспрессирующих химерные рецепторы антигенов по настоящему изобретению на их поверхности, идентифицированных в примере 3, против злокачественных клеток, экспрессирующих EphA2, снова подтверждали в модели на животном.

[141] 4-1: Подтверждение активности EphA2-CAR1-NK-клеток против злокачественных клеток, экспрессирующих EphA2

[142] Сначала, авторы настоящего изобретения подтвердили, что EphA2 экспрессируется в клетках H460 (Korea Cell Line Bank), линии клеток рака легкого, с использованием такого же способа, как в примере 3-1 (ФИГ. 9a), и подтвердили, что EphA2#79-CAR1-NK-клетки проявляли намного более высокую цитотоксичность против клеток H460, по сравнению с контрольными естественными клетками-киллерами (dECTO), экспрессирующими CAR с удаленным внеклеточным доменом (ФИГ. 9b), с использованием такого же способа, как в примере 3-2.

[143] Затем, как показано на ФИГ. 9c, 3×10^6 вышеуказанных клеток H460 инъецировали подкожно в область бока самки мыши Balb/c nude в возрасте приблизительно 6 недель (SaronBio), и когда размер опухоли составлял приблизительно 50 мм^3 через 10 суток, 2×10^6 вышеуказанных EphA2-CAR1-NK-клеток или контрольных естественных клеток-киллеров инъецировали внутривенно пять раз с интервалами 3 или 4 суток. Размер и массу опухоли затем измеряли на протяжении 24 суток.

[144] В результате, как показано на ФИГ. 9D и ФИГ. 9E, размер и масса опухоли являлись значимо уменьшенными у мышей, подвергнутых обработке с использованием EphA2-CAR1-NK-клеток по настоящему изобретению, по сравнению с мышами, подвергнутыми обработке с использованием контрольных естественных клеток-киллеров.

[145] 4-2: Подтверждение активности EphA2-CAR2-T-клеток против злокачественных клеток, экспрессирующих EphA2

[146] Затем, 1×10^6 клеток A549-Luciferase (PerkinElmer), трансфицированных с использованием люциферазы, линии клеток рака легкого, экспрессирующей EphA2, инъецировали подкожно в правый бок самца мыши NOG в возрасте 6 недель (Coatech), и когда размер опухоли составлял приблизительно 200 мм^3 , 5×10^6 вышеуказанных EphA2-CAR2-T-клеток или контрольных T-клеток, экспрессирующих CAR с удаленным внеклеточным доменом (dECTO), инъецировали внутривенно.

[147] Размер опухоли, массу мыши и IVIS затем измеряли два раза в неделю на протяжении 45 суток.

[148] В результате, подтверждено, что EphA2-CAR2-T-клетки эффективно ингибировали опухоли, как показано на ФИГ. 10a и ФИГ. 10b, и присутствие EphA2-CAR2-T-клеток и контрольных Т-клеток в крови мышей после внутривенной инъекции было также подтверждено, как показано на ФИГ. 10c. Кроме того, как показано на ФИГ. 10d, подтверждено, что EphA2-CAR2-T-клетки присутствовали в более высоких количествах в опухоли, по сравнению с контрольными Т-клетками.

[149] Обобщение

[150] В совокупности, вышеуказанные экспериментальные результаты показывают, что два антитела против EphA2 (#79, #85) по настоящему изобретению не только проявляют специфическое связывание с EphA2, но также узнают и связывают EphA2 на злокачественных клетках, экспрессирующих EphA2, и после связывания, химерные рецепторы антигенов, содержащие антигенсвязывающий участок антител, запускают передачу сигнала в иммуноцитах (естественных клетках-киллерах или Т-клетках) экспрессирующих их на поверхности, и соответственно, было ясно показано *in vitro*, так же как *in vivo*, что химерные рецепторы антигенов, содержащие антигенсвязывающие участки антител, запускают различные иммунные ответы в иммуноцитах, способных атаковать злокачественные клетки.

[151] Несмотря на то, что настоящее изобретение подробно описано только применительно к вариантам осуществления, описанным выше, специалисту в данной области очевидно, что различные модификации и изменения возможны в объеме настоящего изобретения, и очевидно, что такие модификации и изменения включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающие рецептор 2 эфрина типа-A (EphA2), содержащие:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 10, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 11; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 12, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 13, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 14,

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 15.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 16.

4. Химерный рецептор антигена, содержащий:

внеклеточный связывающий домен, содержащий антигенсвязывающий участок, специфически связывающий рецептор 2 эфрина типа-A (EphA2);

трансмембранный домен; и

внутриклеточный передающий сигналы домен;

где антигенсвязывающий участок, специфически связывающий EphA2, представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 9, CDR2 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 10, и CDR3 тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 11; и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 12, CDR2 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 13, и CDR3 легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 14.

5. Химерный рецептор антигена по п.4, где антигенсвязывающий участок, специфически связывающий EphA2, представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела против EphA2, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 15.

6. Химерный рецептор антигена по п.4, где антигенсвязывающий участок, специфически связывающий EphA2, представляет собой одноцепочечный варибельный фрагмент антитела против EphA2, содержащий варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 16.

7. Химерный рецептор антигена по п.1, где внеклеточный домен дополнительно содержит по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из шарнирного домена и спейсерного домена.

8. Химерный рецептор антигена по п.1, где шарнирный домен или спейсерный домен представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из эпитопа Мус, шарнирного домена CD8 и Fc.

9. Химерный рецептор антигена по п.4, где трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен, происходящий из по меньшей мере одного, выбранного из группы, состоящей из цепи альфа (α), бета (β) или дзэта (ζ) Т-клеточного рецептора (TCR), CD28, CD3 эпсилон (ϵ), CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 и CD154.

10. Химерный рецептор антигена по п.4, где внутриклеточный передающий сигналы домен происходит из по меньшей мере одного, выбранного из группы, состоящей из Т-клеточного рецептора (TCR) дзэта (ζ), FcR гамма (γ), FcR бета (β), CD3 гамма (γ), CD3 дельта (δ), CD3 эпсилон (ϵ), CD3 дзэта (ζ), CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d.

11. Химерный рецептор антигена по п.4, где внутриклеточный передающий сигналы домен содержит по меньшей мере один передающий первичные сигналы домен, происходящий из одного, выбранного из группы, состоящей из Т-клеточного рецептора (TCR) дзэта (ζ), FcR гамма (γ), FcR бета (β), CD3 гамма (γ), CD3 дельта (δ), CD3 эпсилон (ϵ), CD3 дзэта (ζ), CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d; и

по меньшей мере один передающий костимулирующие сигналы домен, происходящий из одного, выбранного из группы, состоящей из CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), LFA-1 (CD11a/CD18), GITR, MyD88, DAP10, DAP12, PD-1, LIGHT, NKG2C, EphA2 и CD83.

12. Полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный рецептор антигена по любому из пп. 4-11.

13. Экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид по п.12.

14. Иммуноцит, экспрессирующий химерный рецептор антигена по любому из пп. 4-11 на его поверхности.

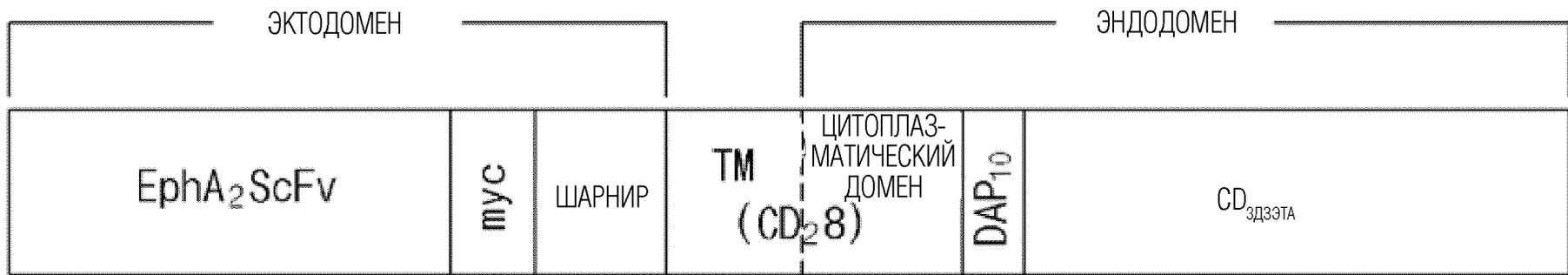
15. Иммуноцит по п.14, выбранный из группы, состоящей из естественной клетки-киллера (NK-клетки), Т-клетки, естественной Т-клетки-киллера (NKT-клетки), индуцированной цитокином клетки-киллера (CIK), макрофага и дендритной клетки.

16. Фармацевтическая композиция для лечения злокачественной опухоли, содержащая иммуноцит по п.14.

17. Фармацевтическая композиция по п.16, где злокачественная опухоль представляет собой по меньшей мере одну, выбранную из группы, состоящей из рака

легкого, рака желудка, рака яичника, рака шейки матки, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака ободочной кишки, рака пищевода, рака кожи, рака щитовидной железы, рака почки, рака печени, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, гематологической злокачественной опухоли, множественной миеломы, острого миелоидного лейкоза, злокачественной лимфомы, злокачественной опухоли тимуса, остеосаркомы, фиброзной опухоли и злокачественной опухоли мозга.

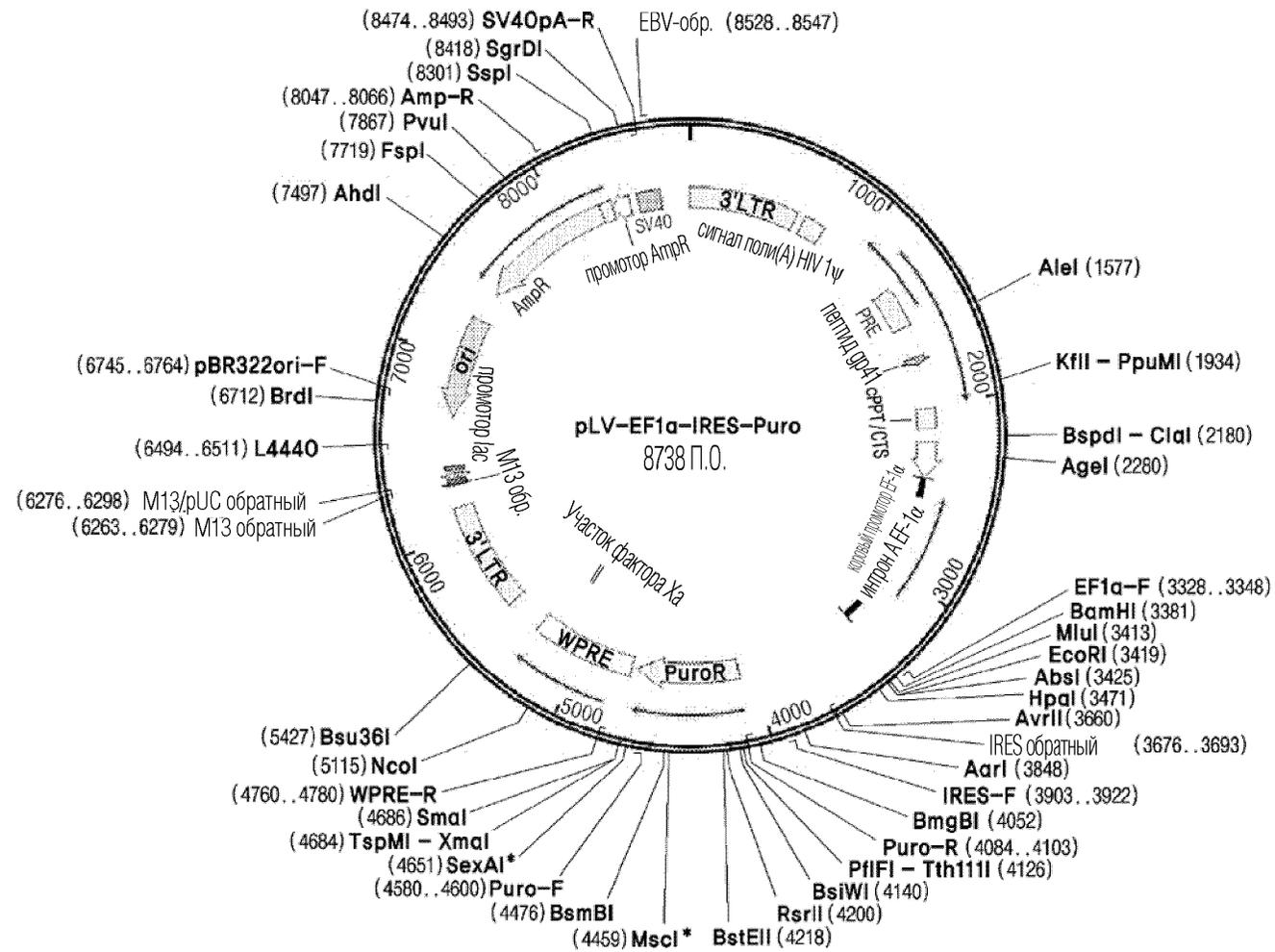
ФИГ. 1а



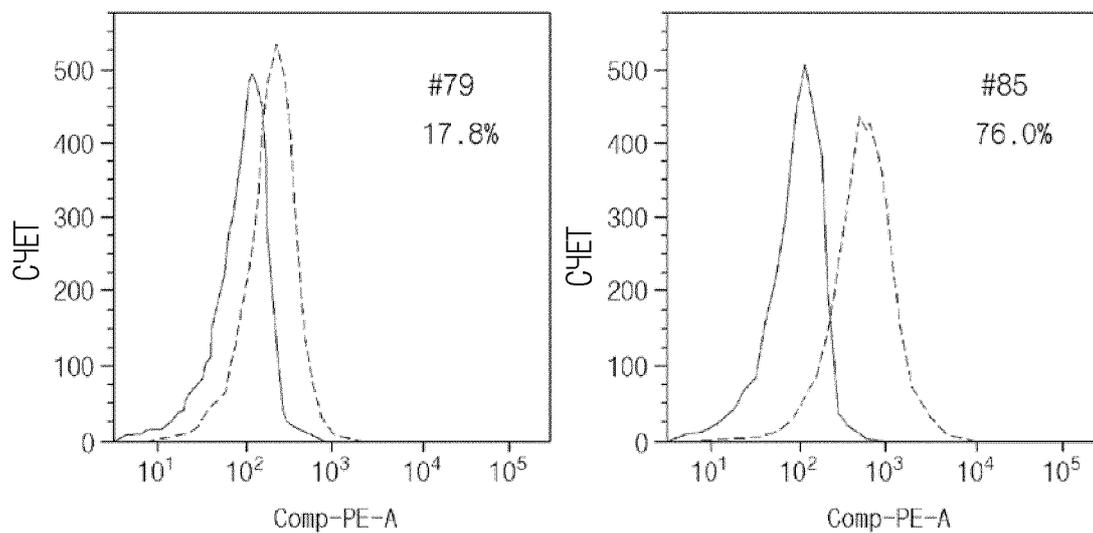
ФИГ. 2а



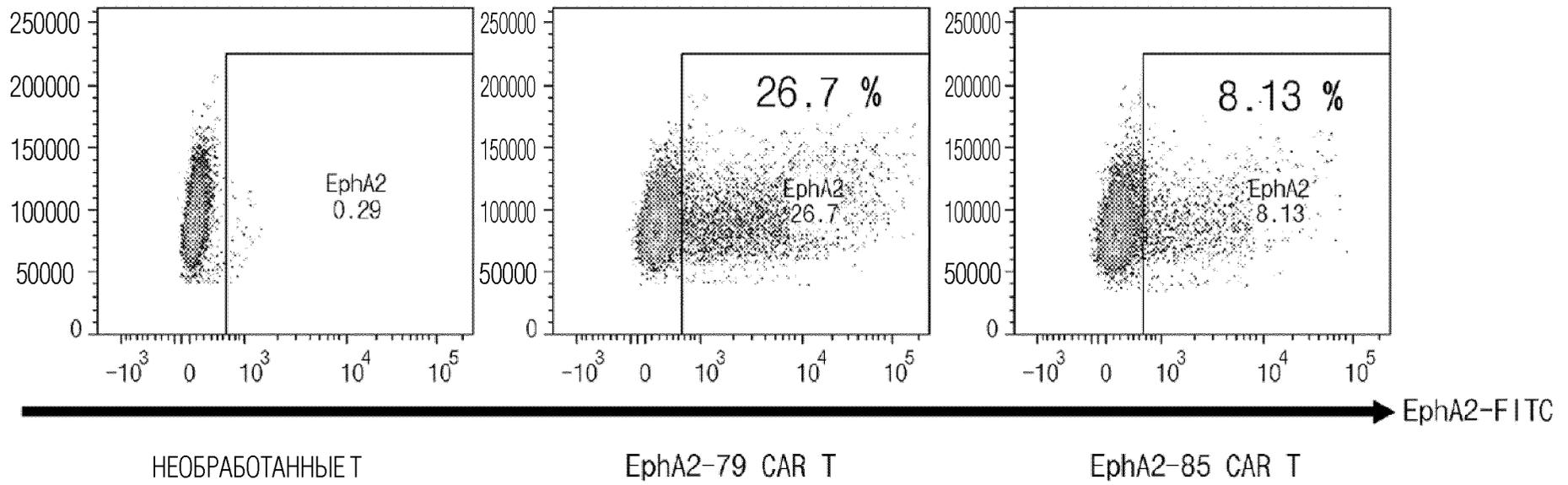
ФИГ. 2b



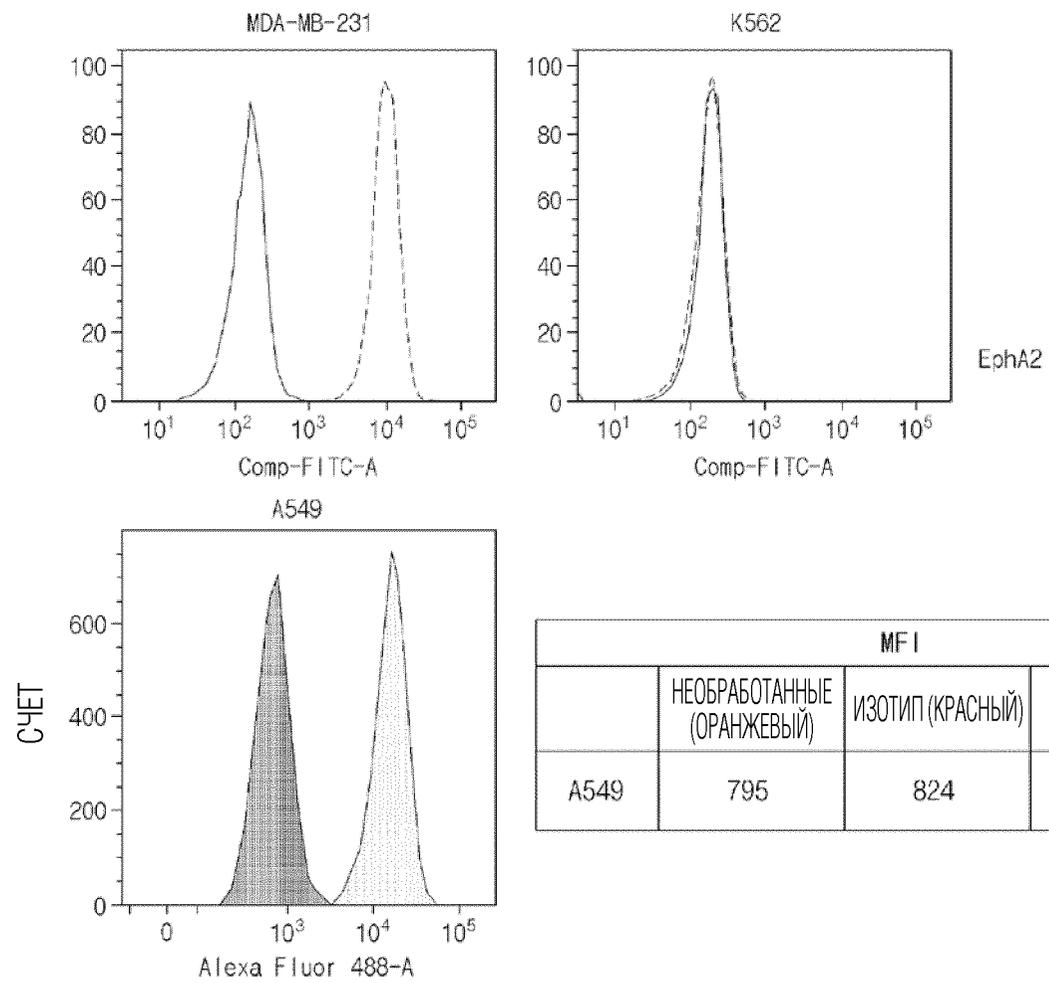
ФИГ. 3а



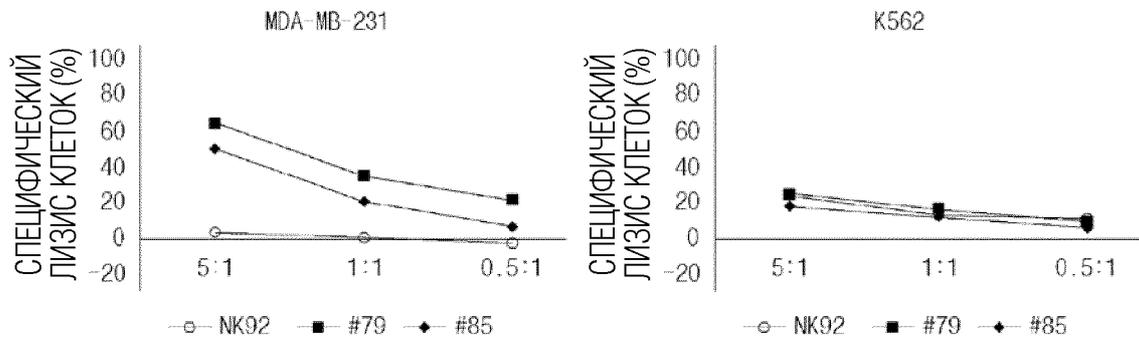
ФИГ. 3б



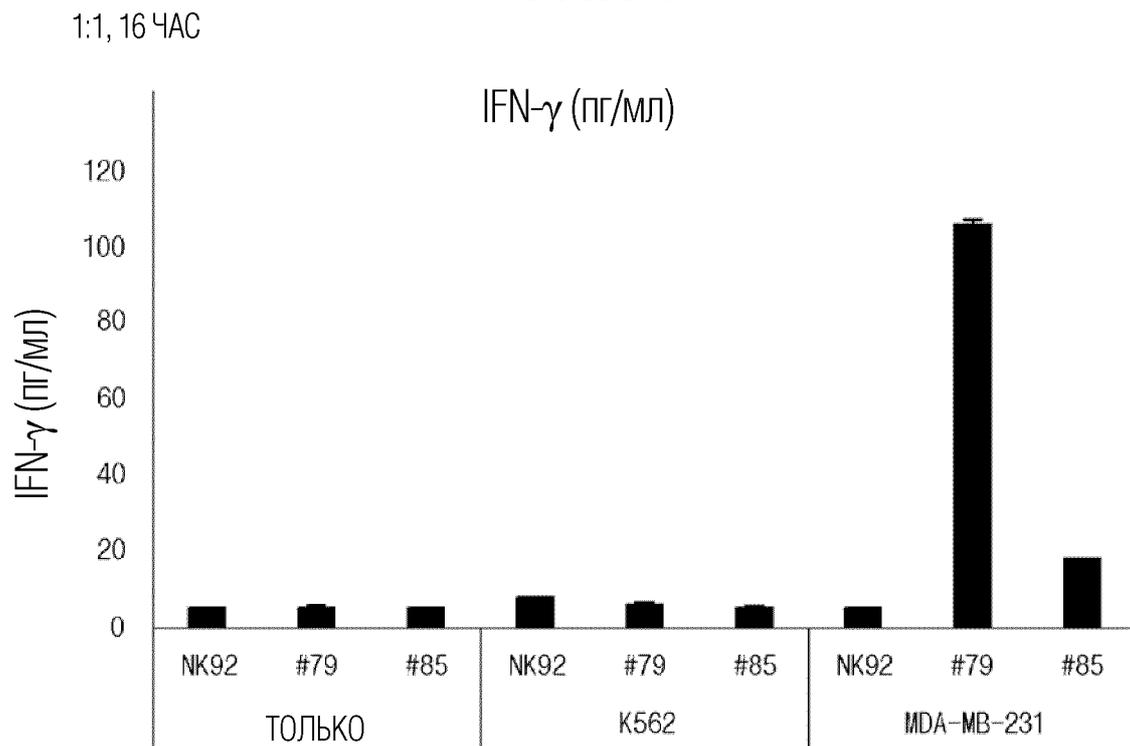
ФИГ. 4



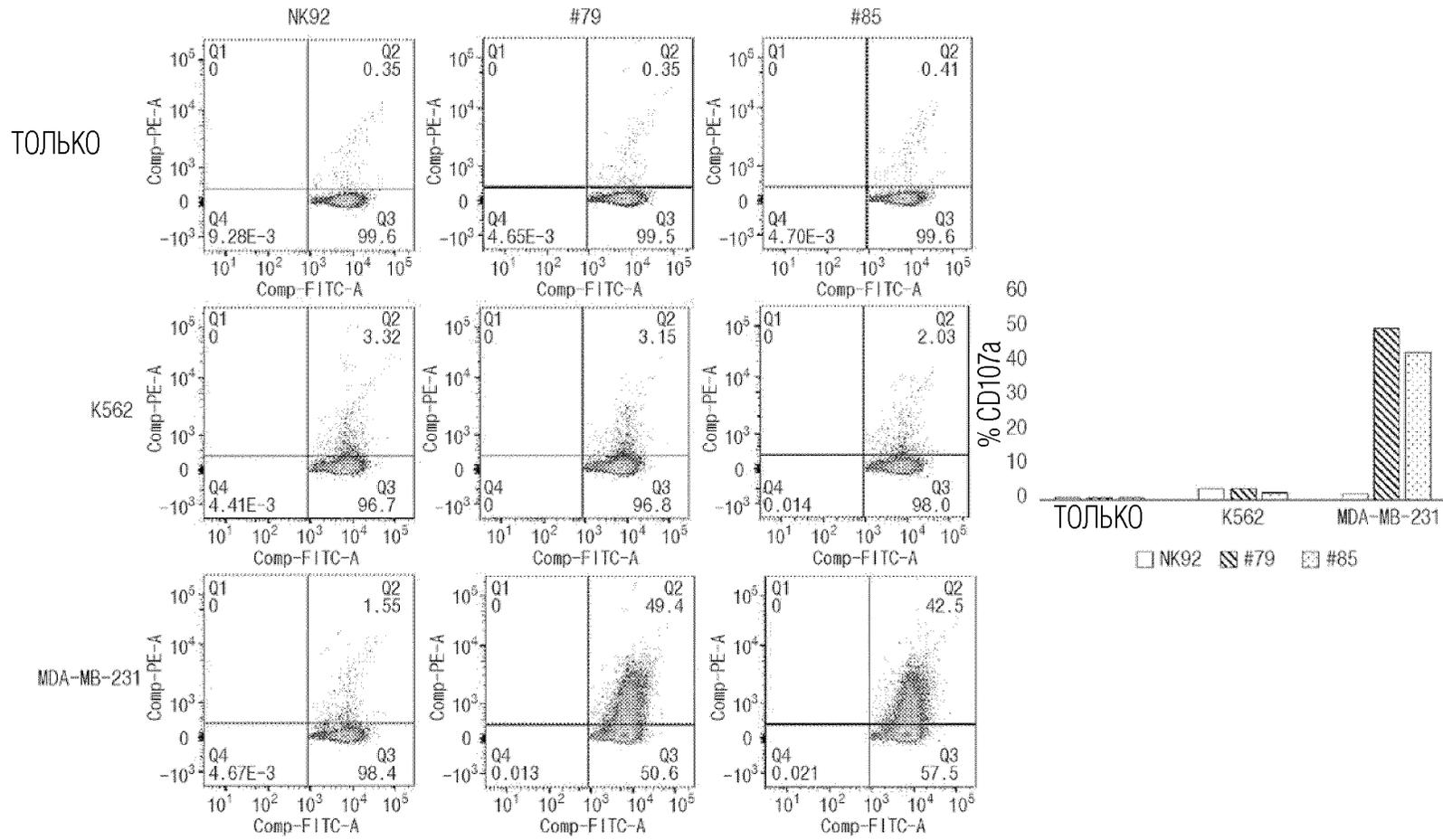
ФИГ. 5



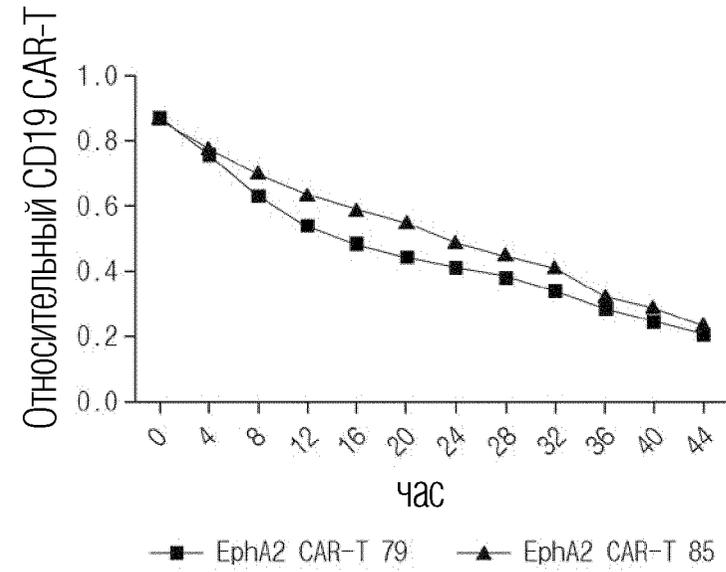
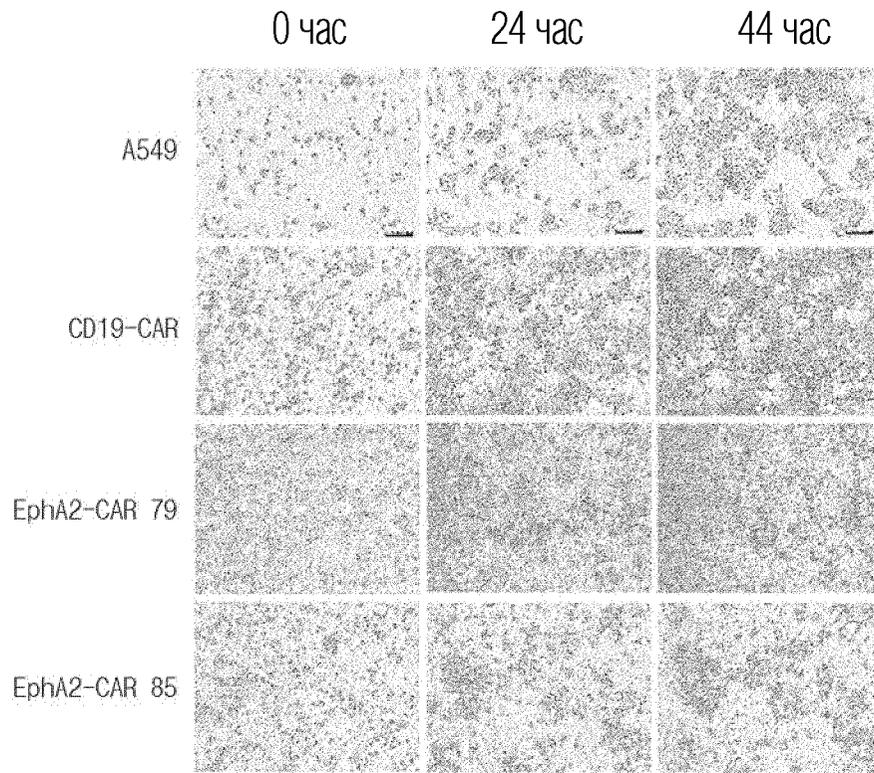
ФИГ. 6



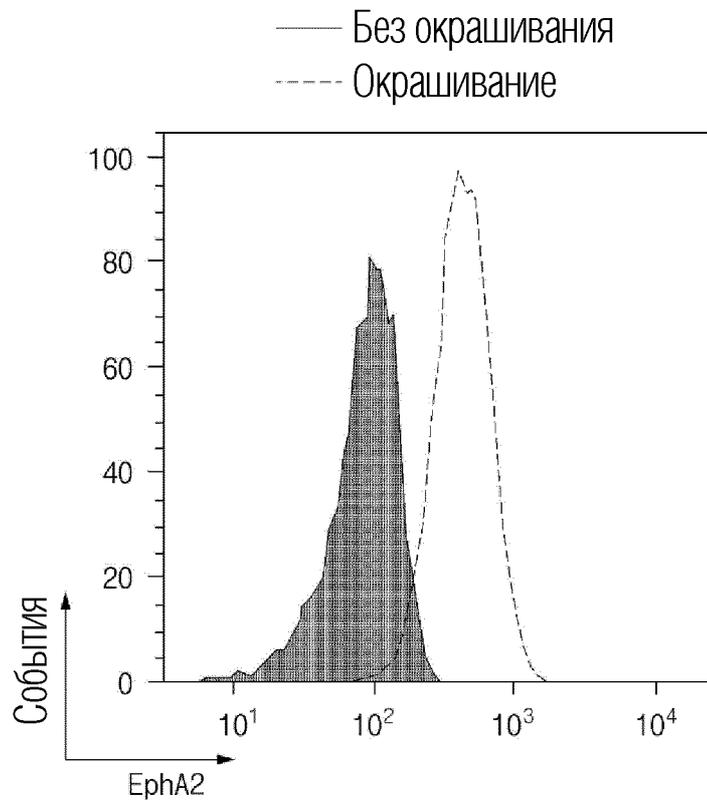
ФИГ. 7



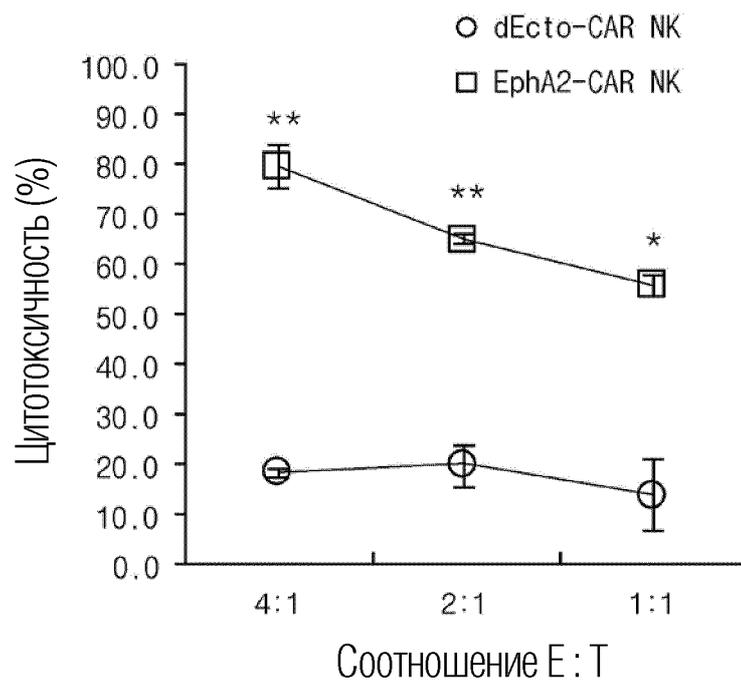
ФИГ. 8



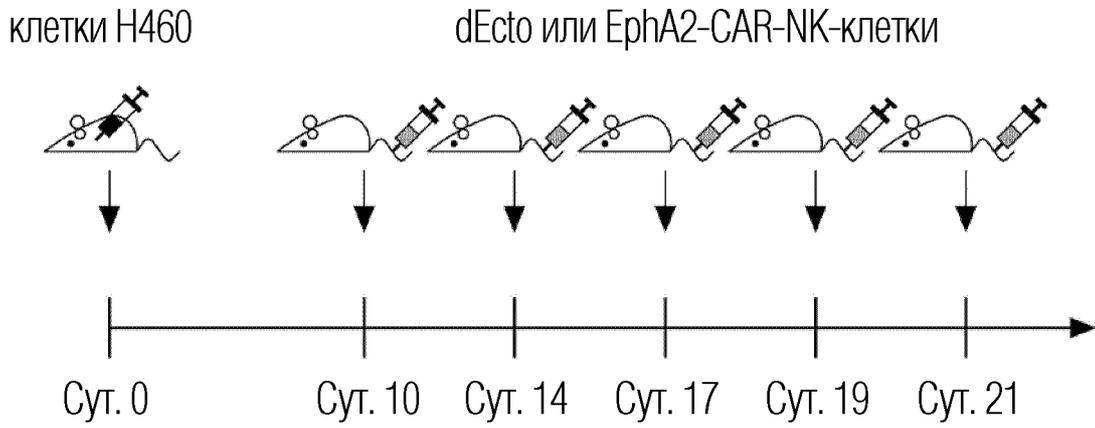
ФИГ. 9а



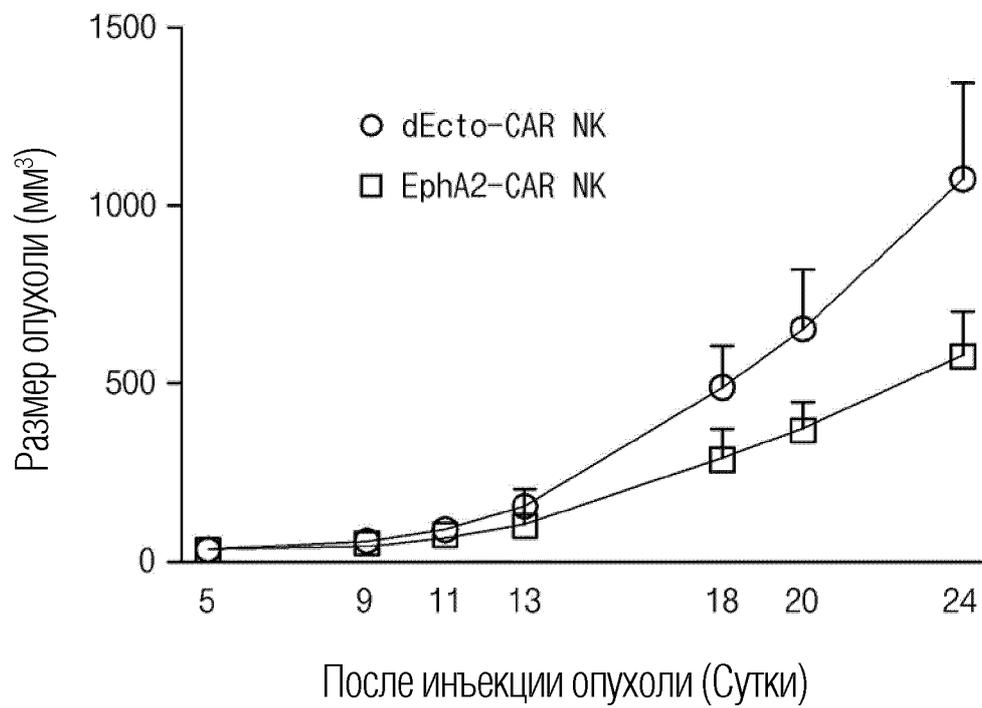
ФИГ. 9б



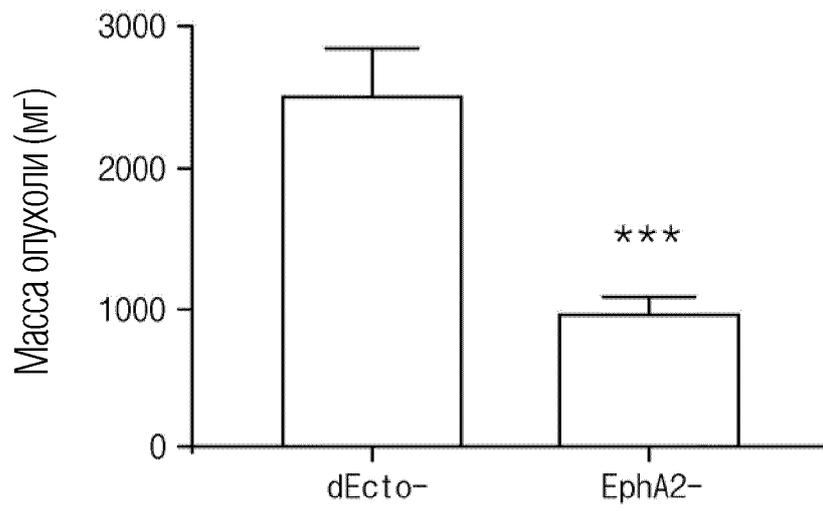
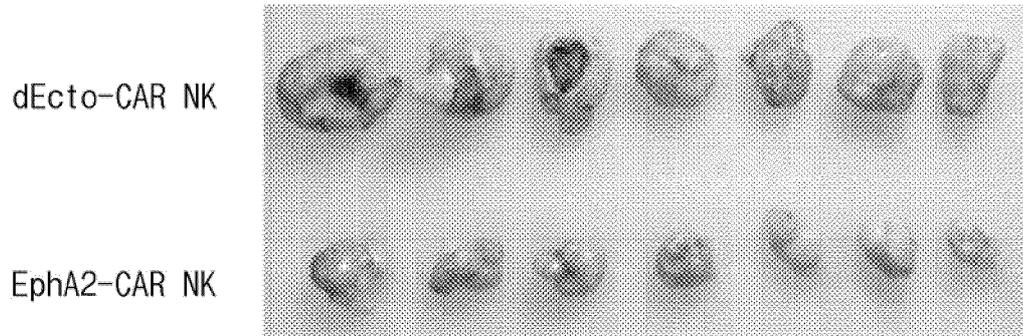
ФИГ. 9с



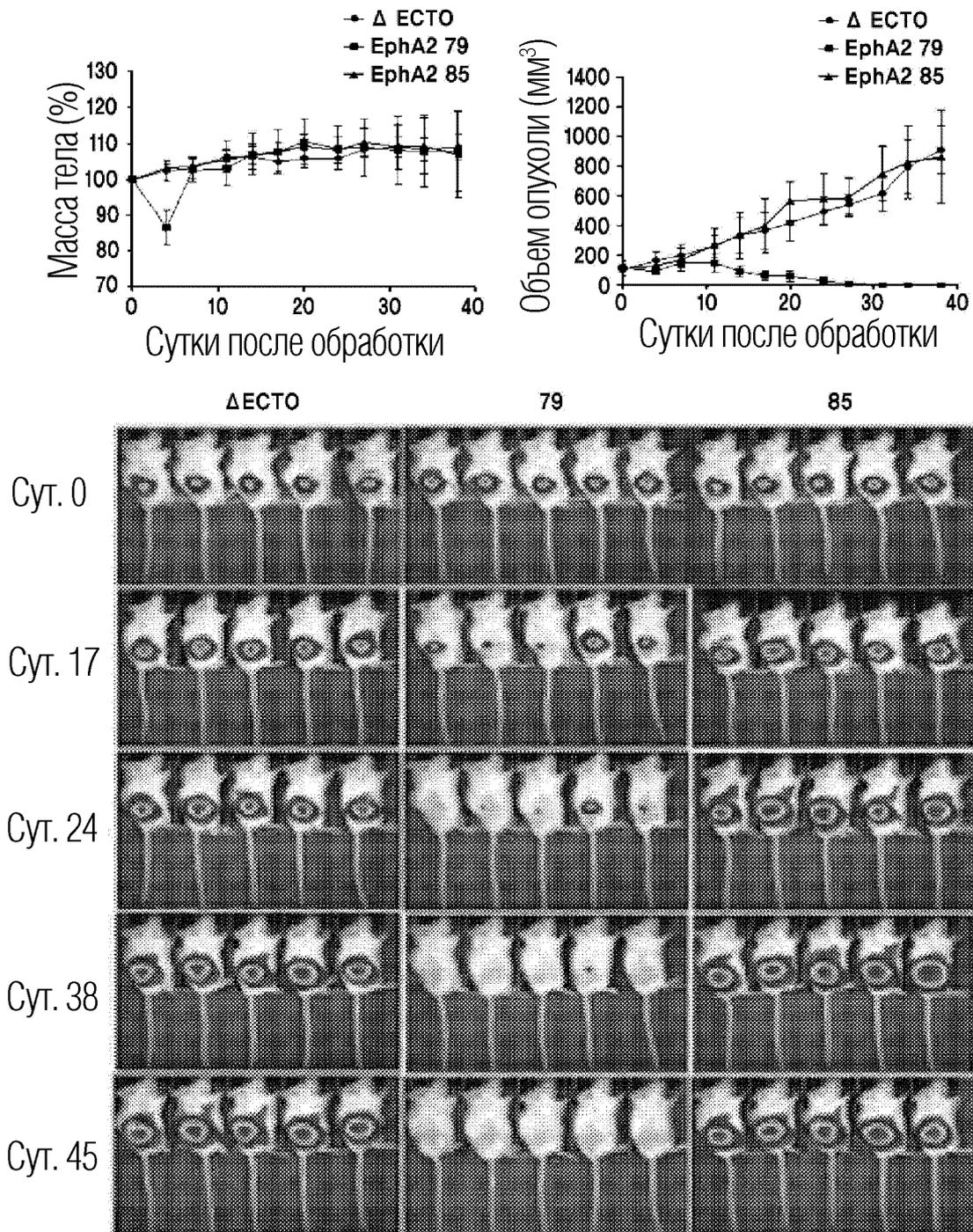
ФИГ. 9d



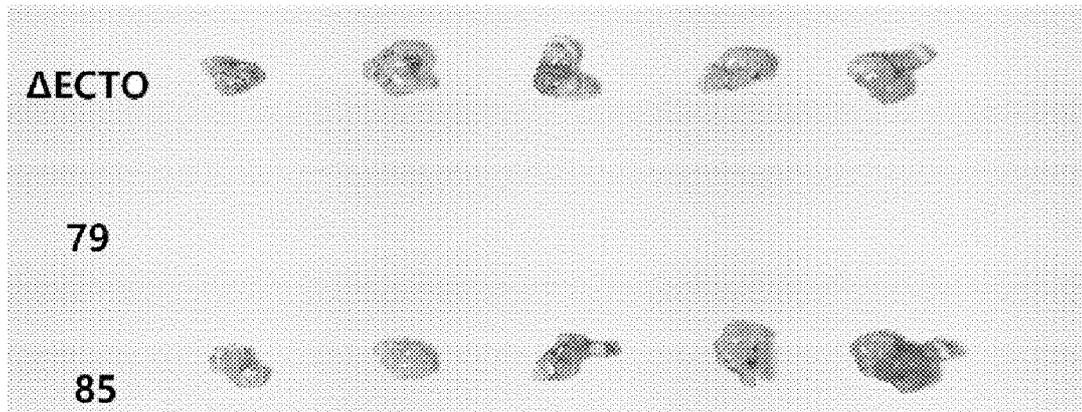
ФИГ. 9е



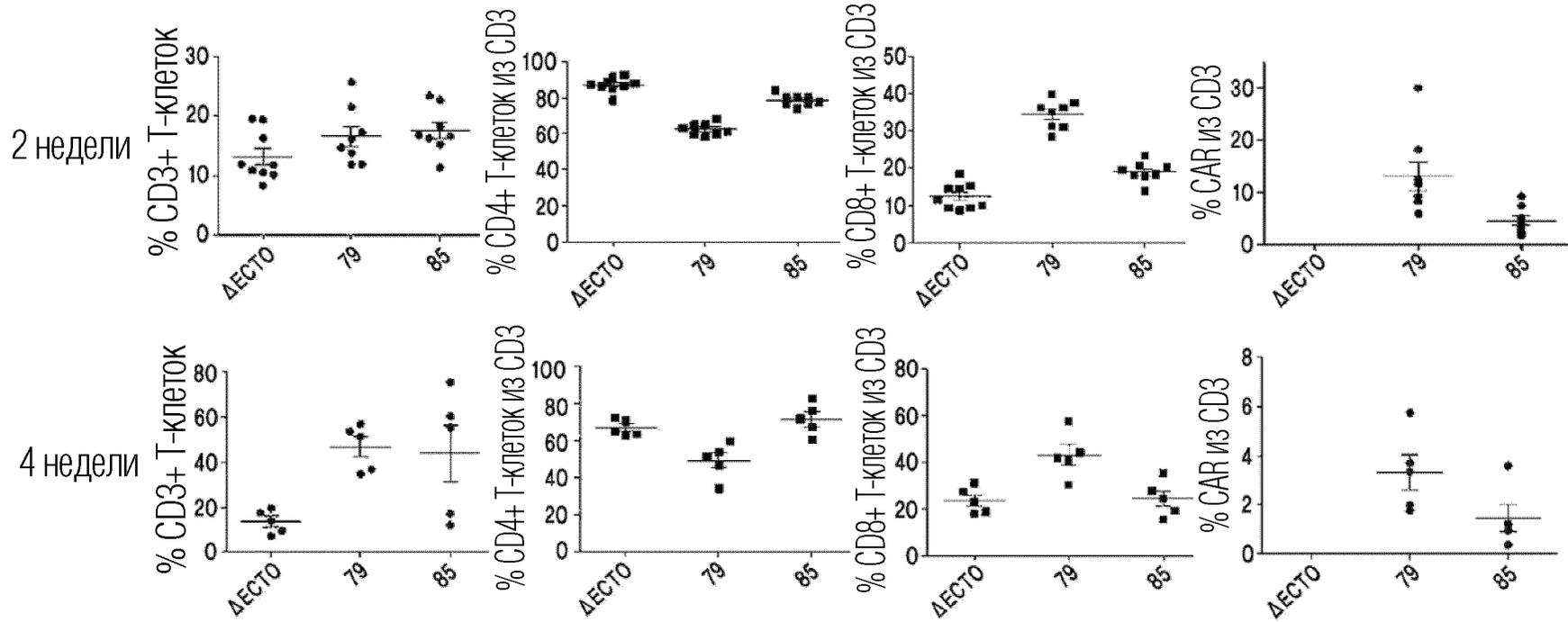
ФИГ. 10а



ΦΙΓ. 10b



ФИГ. 10с



ФИГ. 10d

Инфильтрирующие опухоль лимфоциты

