

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202190411 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.07.22

(22) Дата подачи заявки
2019.08.30

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(54) ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ К НЕСКОЛЬКИМ ИЗОФОРМАМ HLA-G

(31) 18306153.0; 19305809.6

(32) 2018.08.31; 2019.06.21

(33) EP

(86) PCT/EP2019/073257

(87) WO 2020/043899 2020.03.05

(71) Заявитель:
ИНВЕКТИС (FR)

(72) Изобретатель:

Лустау Мария, Анна Франсуа,
Ланглад Демойен Пьер, Комартен
Жюльен (FR)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к химерным антигенным рецепторам (CAR) против большого числа, но не всех изоформ человеческого лейкоцитарного антигена (HLA-G). Более конкретно, данное изобретение относится к CAR, которые являются специфичными для иммуносупрессивных изоформ HLA-G, не содержащих $\beta 2M$, или ассоциированных с $\beta 2M$ соответственно.

A1

202190411

202190411

A1

ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ К НЕСКОЛЬКИМ ИЗОФОРМАМ HLA-G

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области иммунологии, клеточной биологии и молекулярной биологии. В некоторых аспектах область изобретения касается иммунотерапии. Более конкретно, изобретение относится к химерным антигенным рецепторам (CAR) к нескольким изоформам человеческого лейкоцитарного антигена (HLA-G).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Годами основными методами лечения рака были хирургия, химиотерапия и лучевая терапия. Однако в последние несколько лет иммунотерапия заявила о себе в качестве эффективного инструмента лечения рака. Достижения в области генной инженерии привели к созданию нацеленных на опухоль синтетических рецепторов, названных химерными антигенными рецепторами (ХАР, CAR), которые могут быть введены в иммунные клетки человека, такие как Т-клетки, для переориентирования специфичности антигена и усиления функций эффекторных иммунных клеток. CAR были впервые синтезированы в середине 1980-х годов, и с тех пор интерес к этим рецепторам растет. Впервые они были созданы с целью обойти имманентную специфичность Т-клеточных рецепторов (ТКР, TCR) экспрессирующих Т-клеток путем обеспечения особого распознавания антигенов независимо от HLA-пептидных комплексов. Прототипические одноцепочечные CAR были впервые описаны в исследовании Eshhar и его коллег в 1993 г., в котором специфическая активация и нацеливание Т-клеток были опосредованы молекулами, состоящими из домена антитела специфического к антигену клетки-мишени, и сигнальных γ - или ζ -субъединиц комплекса рецепторов Fc-эпсилон или комплекса Т-клеточных рецепторов CD3 соответственно (Eshhar et al., 1993, Proc Natl Acad Sci US A., 90, 720-4). С тех пор многие группы создали молекулы CAR со специфичностью, направленной на одну опухоль, и усиленными сигнальными эндодоменами. В настоящее время связывающий домен CAR, как правило, состоит из антигенсвязывающего домена одноцепочечного антитела (scFv) или антителосвязывающего фрагмента (Fab), выбранного из библиотеки, и содержащего переменные фрагменты легкой и тяжелой цепей моноклонального антитела (Mab, MAT), соединенные гибким связывающим агентом. scFv сохраняет ту же специфичность и схожую аффинность, что и полноразмерное антитело, из которого оно было получено, и способно специфически связываться с представляющей интерес мишенью. Таким образом, CAR сочетают антиген-специфичность и способность активировать Т-клетки в единой объединенной молекуле. Действительно, scFv связан с

внутриклеточным сигнальным модулем, который включает CD3ζ для индуцирования активации Т-клеток при связывании антигена. Модульная структура была расширена, начиная с CAR первого поколения, имеющих только сигнальный домен CD3ζ, и кончая CAR второго и третьего поколения, которые связывают сигнальные эндодомены, такие как CD28, 4-1BB или OX40, с CD3ζ в попытке имитировать костимуляцию. Как правило, спейсерный или шарнирный домен служит связующим звеном между эндодоменами и scFV. Включение такого шарнирного домена улучшает гибкость, пространственную организацию и/или близость, а также экспансию клеток с CAR (CAR-клеток) (Qin et al, Journal of Hematology & Oncology. 2017; 10:68) или локализацию опухоли (Watanabe et al, Oncoimmunology. 2016; 5(12): e1253656). Таким образом, критически важно создать CAR, содержащие оптимизированный шарнирный домен.

CAR позволяют Т-клеткам нацеливаться на раковые образования с помощью механизма? независимого от ГКГС (главного комплекса гистосовместимости). Связывание лиганда у CAR отличается от связывания у ТКР (Т-клеточных рецепторов) с пептидом/ГКГС (пГКГС) по аффинности рецептора, плотности антигена и пространственным характеристикам; и экспериментальные подходы к конструированию оптимального CAR для конкретной молекулы-мишени основывались на функциональных анализах трансдуцированных Т-клеток *in vitro* или на моделях ксенотрансплантата опухоли человека. Поскольку маловероятно, что CAR будут последовательно взаимодействовать с молекулами-мишенями и кластерами в организованных синапсах, как это наблюдается при распознавании ТКР/пГКГС рМНС, предполагается, что для распознавания CAR требуется более высокая плотность лиганда, чем для ТКР. Оптимальная конфигурация и применение этих рецепторов, помимо аффинности и специфичности, зависят от дизайна конструкции, сигнальных доменов, систем доставки векторов, популяций иммунных клеток реципиента и технологии производства.

Хотя предпринимались многочисленные попытки добиться успеха в лечении солидных опухолей при помощи CAR-Т-клеток, результаты иногда не соответствовали ожиданиям. Три основных препятствия, с которыми сталкивались при применении терапии (терапевтического средства) на основе CAR-Т-клеток для лечения солидных опухолей: выявление подходящих опухолеассоциированных антигенов (ОАА), (2) ограниченный перенос адоптивно переносимых клеток на участки опухоли (3) иммунодепрессивный эффект микросреды опухоли и (4) потенциальная проблема безопасности, касающаяся нежелательных или нетрансформированных клеток.

Что касается выбора мишени, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G) проявляет себя как молекула, способная обеспечить защиту плода от распознавания и разрушения иммунной системой его матери, обеспечивая толерантность плода и матери. Помимо своих физиологических функций, HLA-G недавно был определен как молекула иммунной контрольной точки (ИКТ), которая подавляет эффекторные функции инфильтрации субпопуляций иммунных клеток посредством взаимодействия со своими специфическими рецепторами. HLA-G экспрессируется в многочисленных опухолевых выпотах различного происхождения с очень ограниченной тканевой экспрессией. При ряде злокачественных трансформаций экспрессия HLA-G опухолевых клеток резко возрастает, что делает их в

5

10

высокой степени иммунодепрессивными. Доклинические модели продемонстрировали, что экспрессия HLA-G в раковых клетках повышает их метастазирование и значительно снижает выживаемость пациентов (Lin A et al. Int J Cancer. 2012 Jul 1;131(1):150-7. doi: 10.1002/ijc.26375 ; Lin A et al. Hum Immunol. 2013 Apr; 74(4):439-46. doi: 10.1016/j.humimm.2012.11.021).

HLA-G представляет собой неклассическую молекулу HLA I класса, которая впервые была выявлена в клетках хориокарциномы. В отличие от классических молекул HLA I класса, HLA-G характеризуется ограниченным полиморфизмом и отличается также своей экспрессией, структурой и функциями. Первичный транскрипт *HLA-G* альтернативно сплайсирован, что вызывает экспрессию семи изоформ, четыре из которых связаны с

15

20

мембраной (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 и HLA-G4), а остальные три являются растворимыми (HLA-G5, HLA-G6 и HLA-G7). HLA-G1 и HLA-G5 являются наиболее изученными изоформами и представляют собой типичную структуру классической молекулы HLA I класса: тяжелая цепь, состоящая из трех глобулярных доменов, нековалентно связанных с β 2-микроглобулином (β 2M) и пептидом, тогда как другие изоформы короче, лишены одного или

25

двух доменов тяжелой цепи и возможности связывать β 2M.

Принимая во внимание то, что основными критериями для разработки средств иммунотерапии рецепторами CAR являются: выявление подходящих ОАА (опухолеассоциированных антигенов), доступность трансгенных эффекторных клеток и обратимость иммуносупрессивной микросреды опухоли, а также учитывая неоэкспрессию

30

HLA-G опухолевыми клетками и его вклад в иммуносупрессорный эффект микросреды опухоли, а также его роль в качестве ИКТ (иммунной контрольной точки) и в механизмах ускользания от иммунологического надзора, HLA-G является превосходным кандидатом для разработки новых иммунотерапевтических средств, способных блокировать эту молекулу.

Более того, учитывая то, что отсутствуют сведения о стимулирующих функциях или клеточных реакциях, направленных против аллогенного HLA-G, и что экспрессия HLA-G ограничена тканью, создание цитолитических CAR-клеток, направленных против HLA-G, откроет новые возможности в этой области иммунотерапии рака.

5 В WO2016/160622 изложены сведения об антителах, направленных против HLA-G, и их применении в CAR-клетках. Однако, поскольку мРНК HLA-G сплайсирована в разные изоформы белка, существует потребность в разработке CAR, способных специфически распознавать различные изоформы HLA-G (изоформы $\beta 2M$ -связанного HLA и изоформы меньшего размера, не содержащие $\beta 2M$) и/или наиболее распространенные изоформы HLA-G
10 для уничтожения большинства клеток, экспрессирующих иммуносупрессивные изоформы, а также конструкции CAR, содержащие оптимизированный спейсерный домен и селективируемый маркер для улучшения размножения и отбора CAR-клеток.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Имея целью получить наибольшее количество изоформ HLA-G, авторы изобретения
15 разработали несколько рецепторов химерного антигена, направленных против HLA-G, используя scFv-производные новых моноклональных антител, специфичных к HLA-G (Mab). Эти Mab обладают высокой аффинностью к HLA-G и направлены на разные эпитопы молекулы, учитывая гетерогенность экспрессии данной молекулы [Alegre et al, Eur. J. Immunol. 2013. 43: 1933–1939; Alegre E et al, 2014, Journal of Immunology Research, 2014: 657625]. Авторы
20 изобретения также оптимизировали спейсерный домен между антигенсвязывающим доменом и эндодоменом для повышения эффективности CAR-клеток против HLA-G. В конечном итоге авторы изобретения создали конструкцию CAR, содержащую расщепляемый линкер и репортер, что позволяет произвести отбор трансдуцированных CAR-клеток.

Согласно настоящему изобретению предложен химерный антигенный рецептор (CAR),
25 содержащий антигенсвязывающий домен антитела к HLA-G, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, причем указанный CAR специфически связывает от одной до шести изоформ HLA-G, предпочтительно от двух до пяти изоформ HLA-G, в предпочтительном варианте реализации такой CAR позволяет дискриминировать изоформы HLA-G, т.е. CAR не распознает и не связывает все семь изоформ HLA-G.

30 В одном из аспектов настоящего изобретения CAR специфически связывает HLA-G, не содержащий $\beta 2M$, или HLA-G, связанный с $\beta 2M$. В альтернативном варианте CAR специфически связывает изоформу HLA-G, выбранную из группы, состоящей из HLA-G1, HLA-G2, HLA-G5 и HLA-G6. В другом аспекте CAR специфически связывает две изоформы:

HLA-G1 и HLA-G5, или HLA-G2 и HLA-G6, или изоформу HLA-G1, не содержащую β 2M, и изоформу HLA-G5, не содержащую β 2M.

В частности, Согласно настоящему изобретению предложен химерный антигенный рецептор (CAR) к HLA-G, последовательно содержащий от N- до С-конца: (а) пептидную
5 сигнальную последовательность, b) антитело к HLA-G или его антигенсвязывающий фрагмент, с) спейсерный домен – опционально, d) трансмембранный домен, e) внутриклеточный домен, а также опционально – f) расщепляемый линкер и опционально – g) усеченный домен CD19 человека.

В одном из аспектов спейсерный домен содержит или включает в себя: (i) шарнирный
10 домен IgG4 человека, (ii) шарнирный домен IgG4 человека и домен CH3 IgG4 человека или (iii) мутированный домен CH2 IgG4 человека, шарнирный домен IgG4 человека и шарнирный домен CH3 IgG4 человека. Предпочтительно спейсерный домен содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 25, (ii) SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 27, или (iii) SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27, или гомологичную последовательность,
15 демонстрирующую идентичность с ним более чем на 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95%.

В другом аспекте сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из сигнального пептида CD8a, сигнального пептида каппа-цепи Ig мыши, сигнального пептида IgG4 человека, сигнального пептида IL2, сигнального пептида IgG2 человека и сигнального пептида
20 люциферазы Gaussia.

В конкретном аспекте настоящего изобретения трансмембранный домен выбран из трансмембранных доменов CD28, CD3 и CD8. Предпочтительно трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28.

Предпочтительно, CAR к HLA-G по изобретению содержит внутриклеточный домен,
25 который, в свою очередь, содержит сигнальный домен CD3-дзета и по меньшей мере один костимулирующий домен(ы), выбранный из костимулирующих доменов CD28, 41BB, CD28, CD134, ICOS, OX40, CD149, DAP10, CD30, IL2-R, IL7 α 6, IL21-R, NKp30, NKp44, CD27, CD137 и DNAM-1, предпочтительно два костимулирующих домена, представляющие собой костимулирующие домены 41BB и CD28.

30 В одном из аспектов расщепляемый линкер выбран из группы, состоящей из P2A, T2A, E2A, B2A и F2A.

В другом аспекте усеченный домен CD19 человека состоит из последовательности с SEQ ID NO: 29.

В частности, CAR, антитело к HLA-G или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно scFv, избирательно связывает не содержащий $\beta 2M$ HLA-G или изоформы HLA-G, связанные с $\beta 2M$, однако не связывает все изоформы HLA-G.

В еще одном аспекте CAR, антитело к HLA-G или его антигенсвязывающий фрагмент, предпочтительно scFv, или клетка, экспрессирующая CAR, не связывает домен альфа1 HLA-G.

Предпочтительно, антитело к HLA-G или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv против HLA-G, который содержит: (a) (i) переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 1 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 1; и (ii) переменную область легкой цепи, содержащую последовательность с SEQ ID NO: 2 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 2; или (b) (i) переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 3 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 3; и (ii) переменную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 4 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 4.

Предпочтительно, антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, который специфически связывает $\beta 2M$ -ассоциированный HLA-G, предпочтительно как HLA-G1, так и HLA-G5, причем scFv содержит: (a) (i) переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 1 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 1; и (ii) переменную область легкой цепи, содержащую последовательность с SEQ ID NO: 2 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 2; или (b) (i) CDR (определяющую комплементарность область) 1, CDR2 и CDR3 переменной области тяжелой цепи, содержащей последовательность с SEQ ID NO: 1; и CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области легкой цепи, содержащей последовательность с SEQ ID NO: 2.

В альтернативном варианте антигенсвязывающий домен CAR представляет собой scFv, который специфически связывает HLA-G, не содержащий $\beta 2M$, предпочтительно изоформы HLA-G2 и HLA-G6 и/или HLA-G1 без $\beta 2M$ и HLA-G5 без $\beta 2M$, причем данный scFv содержит:

- (а) (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 3 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 3; и (ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность с SEQ ID NO: 4 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 4; или (b) (i) CDR (определяющую комплементарность область (участок)) 1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательность с SEQ ID NO: 3; и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательность с SEQ ID NO: 4.

Предпочтительно внутриклеточный домен CAR содержит сигнальный домен CD3-дзетта и опционально по меньшей мере один костимулирующий домен(ы), выбранный из костимулирующих доменов CD28, 41BB, CD28, CD134, ICOS, OX40, CD149, DAP10, CD30, IL2-R, IL7r6, IL21-R, NKp30, NKp44, CD27, CD137 и DNAM-1, предпочтительно два костимулирующих домена: 41BB и CD28. .

Предпочтительно трансмембранный домен CAR выбран из трансмембранных доменов CD28, CD3 и CD8, предпочтительно трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28.

В предпочтительном варианте реализации CAR дополнительно содержит шарнирную область, соединяющую антигенсвязывающий домен с трансмембранным доменом, предпочтительно выбранную из группы, включающей: (i) шарнир CD28, (ii) альфа-шарнир CD8, (iii) шарнирный домен IgG4 человека, (iv) шарнирный домен IgG4 человека и домен CH3 IgG4 человека, а также (v) мутированный домен CH2 IgG4 человека, шарнирный домен IgG4 человека и шарнирный домен CH3 IgG4 человека.

Данное изобретение также относится к мультиспецифической конструкции CAR, которая содержит по меньшей мере два разных антигенсвязывающих домена, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, причем по меньшей мере один из антигенсвязывающих доменов специфически связывает изоформы HLA-G, ассоциированные с доменом $\beta 2M$ HLA-G; и по меньшей мере один из остальных антигенсвязывающих доменов специфически связывает изоформы HLA-G, не ассоциированные с доменом $\beta 2M$ HLA-G.

В предпочтительном варианте реализации мультиспецифическая конструкция CAR представляет собой биспецифическую конструкцию CAR, которая содержит (i) домен, содержащий CDR 1, 2 и 3 (HCDR1 (определяющая комплементарность область тяжелой цепи), HCDR2, HCDR3), содержащий последовательности с SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно, (ii) домен, содержащий CDR 1, 2 и 3 (LCDR1 (определяющая комплементарность область легкой цепи), LCDR2, LCDR3), содержащий последовательности с SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно, (iii) домен, содержащий CDR 1, 2 и 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащий последовательности с SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно, а также (iv) домен, содержащий CDR 1, 2 и 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащий последовательности с SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно, причем каждая CDR опционально может содержать 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены, делеции или вставки.

Изобретение также относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, являющийся объектом изобретения, к вектору экспрессии, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, и к клетке, содержащей CAR по изобретению, или молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению, или вектор экспрессии по изобретению, причем в предпочтительном варианте реализации данная клетка выбрана из группы, включающей: Т-клетку, Т-клетку CD4⁺, Т-клетку CD8⁺, В-клетку, NK-клетку, NKT-клетку, моноцит и дендритную клетку, предпочтительно данная клетка представляет собой Т-клетку, В-клетку или NK-клетку.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, вектор экспрессии или клетку по изобретению и, опционально, фармацевтически приемлемый носитель. В предпочтительном варианте реализации клетка по изобретению или фармацевтическая композиция по изобретению предназначена для применения в лечении рака или для применения в лечении вирусной инфекции. Клеточную или фармацевтическую композицию для такого применения можно вводить в комбинации с терапией рецепторами CAR, не нацеленной на HLA-G.

В одном из аспектов настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит (i) клетку, содержащую CAR, специфически связывающий HLA-G, ассоциированный с β 2M, предпочтительно HLA-G1 и HLA-G5, и клетку, содержащую CAR, специфически связывающий HLA-G, не содержащим β 2M, предпочтительно HLA-G2 и HLA-G6, и/или изоформы HLA-G1 без β 2M и HLA-G5 без β 2M; или (ii) клетку, содержащую CAR, специфически связывающий HLA-G1 и HLA-G5, или изоформы HLA-G, не содержащие β 2M,

и CAR, специфически связывающая HLA-G2 и HLA-G6, или изоформы HLA-G, ассоциированные с $\beta 2M$.

В конечном счете, настоящее изобретение относится к антителу к HLA-G, которое специфически связывает изоформы HLA-G, ассоциированные с $\beta 2M$, в предпочтительном варианте реализации – HLA-G1 и HLA-G5. Такое антитело содержит: .

(a) (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 1 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 1; и (ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность с SEQ ID NO: 2 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 2; или .

(b) (i) CDR (определяющую комплементарность область) 1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательность с SEQ ID NO: 1; и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательность с SEQ ID NO: 2.

15 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАЦИЙ

Фиг. 1: (A) рецепторы HLA-G (B) Альтернативный сплайсинг первичного транскрипта HLA-G генерирует семь изоформ HLA-G, 4 мембранных связки и 3 растворимых изоформы (C) Иммуносупрессивные функции HLA-G.

Фиг. 2: Специфичность моноклональных антител по результатам анализа методом проточной цитометрии. (A) Моноклональное антитело 15E7 является специфичным для изоформ HLA-G, не содержащих $\beta 2M$. (B) Поверхность клеток клеточных линий, экспрессирующих HLA-G1, меченных антителом 15E7. (C) Поверхность клеток клеточных линий, экспрессирующих HLA-G1, меченных антителом LFTT-1.

Фиг. 3: (A) Структура 3-го поколения CAR 15E7. (B) Структура 3-го поколения CAR LFTT-1.

Фиг. 4: Схематическое изображение (A) 3 цепей CAR HLA-G в зависимости от строения их шарнирной области и (B) полученных белков CAR HLA-G.

Фиг. 5: (A) Экспрессия направленных против HLA-G CAR 15E7 и LFTT-1 на клеточных линиях Jurkat и мышинных NKT 1.2 по результатам анализа методом проточной цитометрии. (B) Экспрессия направленных против HLA-G CAR 15E7 и LFTT-1 на клеточной поверхности, определенная методом иммунофлуоресценции.

Фиг. 6: (A) Принцип анализа активации. (B) Связывание HLA-G1 антителами 15E7 (левая панель) и LFTT-1 (правая панель). (C) Наглядное изображение активации эффекторных

клеток CAR HLA-G. (D) Эффекторные клетки CAR HLA-G были сильно активированы в присутствии клеток-мишеней, экспрессирующих HLA-G.

Фиг. 7: Специфичность CAR по результатам анализа методом проточной цитометрии. (A) CAR HLA-G 15E7 и LFTT-1 на клеточных линиях Jurkat были сильно активированы в присутствии клеток, экспрессирующих HLA-G, содержащий/не содержащий $\beta 2M$. (B) CAR HLA-G 15E7 и LFTT-1 на NKT 1.2 были сильно активированы в присутствии линии клеток JEG-3.

Фиг. 8: Цитолитическая функция Т-клеток CAR HLA-G была изучена на опухолевых клетках K562, K562-HLA-G1 и JEG-3 путем (A) исследования лизиса опухолевых клеток и (B) экспрессии CD107a на эффекторных клетках CAR.

Фиг. 9: Секреция IFN- γ клетками CAR HLA-G была изучена после совместной инкубации с опухолевыми клетками K562, K562-HLA-G1 и JEG-3.

Фиг. 10: Противоопухолевые функции Т-клеток CAR HLA-G *in vivo* (A) Схема эксперимента *in vivo* на мышах с Т-клетками CAR HLA-G (B) Цитотоксичность Т-клеток CAR против опухолевых клеток HLA-G в NGS (секвенирование следующего поколения) мышей *in vivo*.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Введение

Настоящее изобретение относится к химерному антигенному рецептору (CAR), содержащему внеклеточный домен, состоящий большей частью из антигенсвязывающего домена антитела специфичного к HLA-G, шарнирного домена (опционально), содержащего или состоящего из: (i) шарнирный домен IgG4 человека, (ii) шарнирный домен IgG4 человека и домен CH3 IgG4 человека или (iii) мутированный домен CH2 IgG4 человека, шарнирный домен IgG4 человека и шарнирный домен CH3 IgG4 человека, трансмембранный домен, внутриклеточный домен, который содержит одну, две или три костимулирующих структуры в зависимости от формирования конструкции CAR, опционально – расщепляемый линкер и репортер.

В частности, CAR по изобретению специфически связывается с изоформами HLA-G в количестве от одной до шести, предпочтительно – с двумя-пятью изоформами HLA-G, более предпочтительно – с изоформами, выбранными из HLA-G1, HLA-G2, HLA-G5 и HLA-G6.

Изобретение также относится к CAR, который специфически связывается с изоформами HLA-G1 и HLA-G5, или HLA-G2 и HLA-G6.

Кроме того, предлагается мультиспецифическая конструкция CAR, предпочтительно биспецифическая конструкция CAR, содержащая один домен, который распознает изоформы HLA-G, не содержащие $\beta 2M$, предпочтительно HLA-G2 и HLA-G6 и/или две изоформы HLA-G1 – содержащую и не содержащую $\beta 2M$, а также изоформы HLA-G5 содержащие/не содержащие $\beta 2M$; и один домен, который распознает изоформы HLA-G, ассоциированные с $\beta 2M$, предпочтительно изоформы HLA-G1 и HLA-G5.

В одном из аспектов настоящее изобретение также относится к CAR, который специфически связывается с изоформами HLA-G, не содержащими $\beta 2M$ (бета-2-микроглобулин). В другом аспекте данное изобретение также относится к CAR, который специфически связывается с изоформами HLA-G, ассоциированными с $\beta 2M$.

В частности, оно относится к моноклональному антителу или молекуле одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), которое(ая) специфически связывается с изоформами HLA-G1 и HLA-G5 или HLA-G2 и HLA-G6. Оно также относится к молекуле моноклонального антитела или одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), которая специфически связывается с изоформами HLA-G, не содержащими $\beta 2M$, предпочтительно с изоформами HLA-G2 и HLA-G6 и/или с HLA-G1 и HLA-G5 содержащими/не содержащими $\beta 2M$.

Кроме того, оно относится к моноклональному антителу или молекуле одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), которая специфически связывается с изоформами HLA-G, ассоциированными с $\beta 2M$, предпочтительно с изоформами HLA-G1 и HLA-G5.

Изобретение также относится к конструкциям или векторам нуклеиновой кислоты, содержащим конструкцию нуклеиновой кислоты, которая может быть трансдуцирована в клетку, предпочтительно иммунную клетку, такую как Т-клетка, тем самым создавая рекомбинантную иммунную клетку, сконструированную для экспрессии кодируемого CAR. Также предлагаются клетки, которые трансдуцируются для экспрессии CAR по настоящему изобретению, популяции клеток и фармацевтические композиции, содержащие клетки, экспрессирующие CAR.

Изобретение, может относиться, в частности, к иммунной клетке, которая экспрессирует два разных CAR, в частности CAR, который специфически связывается с изоформами HLA-G, не содержащими $\beta 2M$, предпочтительно с изоформами HLA-G2 и HLA-G6 и/или HLA-G1 и HLA-G5 содержащими/не содержащими $\beta 2M$; а также CAR, который специфически связывается с изоформами HLA-G, ассоциированными с $\beta 2M$, предпочтительно с изоформами HLA-G1 и HLA-G5.

Среди композиций существуют фармацевтические композиции и составы для применения такого, как адоптивная клеточная терапия. Также предложены способы получения экспрессирующих CAR клеток, и введения клеток и композиций субъектам, например пациентам.

5

Сокращения

АПК (APC): антигенпредставляющая клетка	СИФ (MFI): средняя интенсивность флуоресценции
β 2M: β -2-микроглобулин	MOI: множественность заражения
CAR (CAR): химерный антигенный рецептор	NK: естественный киллер
ЦТЛ (CTL): цитотоксический Т-лимфоцит	ГКГС (MHC): главный комплекс гистосовместимости
ДК (DC): дендритная клетка	ФСБ: физиологический раствор с фосфатным буфером
HLA-G: человеческий лейкоцитарный антиген G	МКПК (PBMCs): моноклеарные клетки периферической крови
ИКТ (ICP): иммунная контрольная точка	scFv: одноцепочечный вариабельный фрагмент
ITAM: иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив	СО (SD): стандартное отклонение
Mab(s): моноклональное антитело(a)	ОАА (ТАА): опухолеассоциированный антиген
	ДТ (WT): дикого типа

Определения

Чтобы облегчить понимание изобретения ниже даны определения ряда терминов.

10 Термины «химерный антигенный рецептор» (CAR), «сконструированный клеточный рецептор», «химерный клеточный рецептор» и «химерный иммунный рецептор» (ХИР) в контексте настоящего документа относятся к сконструированным рецепторам, которые передают иммунным клеткам (к примеру, Т-клеткам или NK-клеткам) способность специфически связывать антиген, таким образом объединяя антигенсвязывающие свойства антигенсвязывающего домена с иммуногенной активностью иммунной клетки такой, как

15 литическая способность и самообновление Т-клеток. В частности, термин «CAR» относится к слитому белку, содержащему внеклеточный домен, способный связывать антиген, трансмембранный домен, опционально – шарнирный домен и по меньшей мере один внутриклеточный домен. Термины «внеклеточный домен, способный связывать антиген», «внешний домен», «эктодомен» и «антигенсвязывающий домен» используются здесь

взаимозаменяемо и подразумевают какой-или олигопептид или полипептид, который может связываться с целевым антигеном (например, с изоформой(ами) HLA-G). В частности, термин «антигенсвязывающий домен» или «антиген-специфический нацеливающийся домен» в контексте настоящего документа относится к области CAR, которая нацеливается на конкретные антигены и связывает их, например, антиген HLA-G. При экспрессии CAR в клетке-хозяине этот домен образует внеклеточный домен (эктодомен) рецептора. Антигенсвязывающий домен CAR обычно происходит от антитела и может содержать антигенсвязывающий домен одноцепочечного антитела (scFv) или антигенсвязывающих фрагментов (Fab). Термины «внутриклеточный домен», «внутренний домен», «цитоплазматический домен» и «внутриклеточный сигнальный домен» используются здесь взаимозаменяемо и означают какой-или олигопептид или полипептид, о котором известно, что он функционирует в качестве домена, передающего сигнал, вызывающий активацию или ингибирование биологического процесса в клетке. Внутриклеточный сигнальный домен может генерировать сигнал, который стимулирует функцию иммунного эффектора клетки, трансдуцированной последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей CAR, к примеру, цитолитическую активность и хелперную активность, включая секрецию цитокинов. Термин «трансмембранный домен» означает какой-либо олигопептид или полипептид, охватывающий клеточную мембрану и способный соединять внеклеточные и сигнальные домены. Это может быть одиночная альфа-спираль, трансмембранный бета-ствол, бета-спираль грамицидина А или какая-либо иная структура. Обычно под трансмембранным доменом подразумевается одиночная трансмембранная альфа-спираль трансмембранного белка, также известного как интегральный белок.

Химерный антигенный рецептор может опционально содержать «шарнирный домен», который служит линкером между внеклеточным и трансмембранным доменами. В контексте настоящего документа термины «шарнир», «спейсер» или «линкер» относятся к аминокислотной последовательности переменной длины, обычно кодируемой между двумя или более доменами полипептидной конструкции для придания, к примеру, гибкости, улучшенной пространственной организации и/или близости. В контексте настоящего документа термин «расщепляемый линкер» относится к пептидной цепи переменной длины, которая может протеолитически расщепляться или перевариваться при помощи протеаз или ферментов, или которая саморасщепляется. После расщепления пептидного линкера его целостность обычно нарушается и приводит к разделению доменов, расположенных по обе стороны от расщепляемого линкера (С-конец и N-конец). «Расщепляемый линкер» как правило

содержит сайт расщепления. В контексте настоящего документа термин «сайт расщепления» относится к конкретной последовательности аминокислот, которая может специфически расщепляться расщепляющим агентом, таким как протеаза, или которая саморасщепляется. Термин «линкер», используемый применительно к scFv, относится к пептидному линкеру, состоящему из аминокислот, таких как остатки глицина и/или серина, используемому в отдельности или в комбинации для связывания вместе областей вариабельной тяжелой и вариабельной легкой цепи.

Химерный антигенный рецептор может опционально содержать сигнальный пептид. Термины «сигнальный пептид», «сигнал нацеливания», «сигнал локализации», «транзитный пептид» или «лидерная последовательность» относятся к короткому пептиду, присутствующему на N-конце большинства новосинтезированных белков, предназначенных для транспортировки по секреторному пути. Ядро сигнального пептида может содержать длинный участок гидрофобных аминокислот. Сигнальный пептид может или не может быть отщеплен от зрелого полипептида.

В контексте настоящего документа термины «антитело» и «антитела» относятся к моноклональным антителам, поликлональным антителам, мультиспецифическим антителам, человеческим антителам, гуманизированным антителам, верблюжьим антителам, химерным антителам, антигенсвязывающим фрагментам, таким как одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), одноцепочечные антитела, однодоменные антитела, антигенсвязывающие фрагменты (Fab), фрагменты F(ab'), дисульфидно-связанный вариабельный фрагмент (sdFv), интратела, нанотела и эпитопсвязывающие фрагменты какого-либо из вышеперечисленного. В частности, антитела включают молекулы иммуноглобулинов и иммунологически активные фрагменты молекул иммуноглобулинов, то есть молекулы, которые содержат участок связывания антигена. Молекулы иммуноглобулина могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса. Если специально не указано иное, термин «антитело» включает в себя интактные иммуноглобулины и «фрагменты антител» или «антигенсвязывающие фрагменты», которые специфически связываются с представляющей интерес молекулой (или группой похожих представляющих интерес молекул, таких как изоформы HLA-G), практически исключая связывание с другими молекулами. Термин «антитело» также включает генно-инженерные формы, такие как химерные антитела (например, гуманизированные мышьи антитела), гетероконъюгированные антитела (такие как биспецифические антитела). В предпочтительном

варианте реализации термин антитело относится к моноклональному антителу, более предпочтительно – к scFv, полученному из моноклонального антитела.

С точки зрения структуры, антитело может иметь тяжелые (H) цепи и легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями. Есть два типа легкой цепи: лямбда (λ) и каппа (κ).

5 Каждая тяжелая и легкая цепь содержит константную область и переменную область (или «домен»). Переменные области легкой и тяжелой цепей содержат «каркасную» область, прерванную тремя гиперпеременными областями, также называемыми «определяющими комплементарность областями» или «CDR». Степень каркасной области и CDR была определена (см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991, которая включена сюда в качестве ссылки). Каркасные области действуют, образуя каркас, который обеспечивает правильную ориентацию CDR за счет межцепочечных нековалентных взаимодействий. CDR в первую очередь ответственны за связывание с эпитопом антигена. CDR каждой цепи обычно называют CDR1, CDR2 и CDR3, пронумерованные последовательно, начиная с N-конца. Домены VL и VH антитела согласно изобретению могут включать четыре каркасных области или «FR», которые в данной области техники и здесь называются «каркасной областью 1» или «FR1»; как «Каркасная область 2» или «FR2»; как «Каркасная область 3» или «FR3»; и как «Каркасная область 4» или «FR4» соответственно. Эти каркасные области прерываются тремя определяющими комплементарность областями или «CDR», которые в данной области называются «определяющей комплементарность областью 1» или «CDR1»; как «определяющая комплементарность область 2» или «CDR2»; и как «определяющая комплементарность область 3» или «CDR3» соответственно. Эти каркасные области и области, определяющие комплементарность, предпочтительно функционально связаны в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (от аминоконца до карбокси-конца).

25 Используемый здесь термин «тяжелая цепь антитела» относится к большему из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в конформациях антитела.

Используемый здесь термин «легкая цепь антитела» относится к меньшему из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в конформациях антитела, легкие цепи κ и λ относятся к двум основным изотипам легкой цепи антитела.

30 Термин «scFv» относится к белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область легкой цепи, и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, где переменные области легкой и тяжелой цепей связаны непрерывно, например, через синтетический линкер, например

короткий гибкий полипептидный линкер, способный экспрессироваться как одноцепочечный полипептид, и где scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он получен. Если не указано иное, в контексте настоящего описания scFv может иметь переменные области VL и VH в любом порядке, например, относительно N-концевого и C-концевого концов полипептида, scFv может содержать VL-линкер-VH или может содержать VH-линкер-VL. Линкер может включать части каркасных последовательностей.

Термины «происходить из» и «происходить из», используемые в данном документе, относятся к соединению, имеющему структуру, полученную из структуры исходного соединения или белка, и чья структура достаточно похожа на те, что раскрыты в данном документе, и, исходя из этого сходства, можно было бы ожидать, специалистом в данной области для демонстрации тех же или подобных свойств, активности и полезности, что и заявленные соединения. Например, scFv, полученный из моноклонального антитела, относится к фрагменту антитела, который обладает теми же свойствами, что и моноклональное антитело, например имеет идентичные или похожие VH и VL и / или распознает один и тот же эпитоп.

Используемый здесь термин «антиген» относится к соединению, композиции или веществу, которые могут быть специфически связаны продуктами специфического гуморального или клеточного иммунитета, такими как молекула антитела, Т-клеточный рецептор или CAR. Совершенно очевидно, что настоящее изобретение включает интактный антиген и его антигенный фрагмент. Совершенно очевидно, что антиген может быть получен синтезированным или может быть получен из биологического образца. Такой биологический образец может включать, но не ограничивается этим, образец ткани, образец опухоли, клетку или биологическую жидкость. Предпочтительно термин «антиген» относится в данном документе к HLA-G, особенно к изоформам HLA-G.

В контексте настоящего описания термин «HLA-G» и «человеческий лейкоцитарный антиген G» относится к конкретной молекуле, связанной с этим названием, и к любым другим молекулам, имеющим аналогичную биологическую функцию, которые имеют по меньшей мере 80% идентичности аминокислотной последовательности, предпочтительно 90%. Идентичность последовательностей, более предпочтительно, по крайней мере, 95% идентичность последовательности с HLA-G, включая, но не ограничиваясь, любую из его нескольких изоформ, включая, помимо прочего, мембраносвязанные изоформы (например, HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3, HLA-G4), растворимые изоформы (например, HLA-G5, HLA-G6, HLA-G7) и растворимые формы, образованные протеолитическим расщеплением

мембраносвязанных изоформ (например, sHLA-G1). Примеры последовательностей HLA-G представлены ниже.

Используемые здесь термины «связывание» или «связывание» относятся к пептидам, полипептидам, белкам, гибридным белкам и антителам (включая фрагменты антител), которые
5 распознают антиген и связываются с ним. Предпочтительно, это относится к типу взаимодействия антиген-антитело. Под «специфическим связыванием» или «иммуноспецифическим связыванием» подразумевается, что антитело распознает конкретный антиген, но по существу не распознает или не связывает другие молекулы в образце. В некоторых случаях термины «специфическое связывание» или «специфическое связывание»
10 могут использоваться в отношении взаимодействия антитела, белка или пептида со вторым химическим веществом, что означает, что взаимодействие зависит от присутствия конкретной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа). Используемый здесь термин «специфическое связывание» означает контакт между антителом и антигеном со аффинностью связывания по меньшей мере 10^{-6} М. В некоторых аспектах антитела связываются с
15 аффинностью по меньшей мере примерно 10^{-7} М. 10^{-8} м, 10^{-9} м, 10^{-10} м.

С точки зрения структуры, антитело может иметь тяжелые (H) цепи и легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями. Существует два типа легкой цепи: лямбда (λ) и каппа (κ). Каждая тяжелая и легкая цепь содержит константную область и переменную область (или «домен»). Переменные области легкой и тяжелой цепей содержат «каркасную» область,
20 прерываемую тремя гиперпеременными областями, также называемыми «определяющими комплементарность областями» или «CDR». Размеры каркасной области и CDR были определены (см. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991, которая включена здесь в качестве ссылки). Каркасные области служат для формирования каркаса, который обеспечивает правильную ориентацию
25 CDR за счет межцепочечных нековалентных взаимодействий. CDR в первую очередь ответственны за связывание с эпитопом антигена. CDR каждой цепи обычно называют CDR1, CDR2 и CDR3 с последовательной нумерацией, начиная с N-конца. Домены VL и VH антитела по изобретению могут содержать четыре каркасных области или «FR», которые в данной области техники и в настоящем документе именуется: «Каркасная область 1» или «FR1»,
30 аналогично: «Каркасная область 2» или «FR2», «Каркасная область 3» или «FR3» и «Каркасная область 4» или «FR4» соответственно. Такие каркасные области прерываются тремя определяющими комплементарность областями или «CDR», которые в данной области техники именуется: «Определяющая комплементарность область 1» или «CDR1», аналогично:

«Определяющая комплементарность область 2» или «CDR2» и «Определяющая комплементарность область 3» или «CDR3» соответственно. Эти каркасные области и определяющие комплементарность области, в предпочтительном варианте осуществления функционально связаны в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (от 5 аминоконца до карбокси-конца).

В контексте настоящего документа термин «тяжелая цепь антитела» относится к большему из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в конформациях антитела.

В контексте настоящего документа термин «легкая цепь антитела» относится к меньшему из двух типов полипептидных цепей, присутствующих в конформациях антитела. Легкие цепи 10 к и λ относятся к двум основным изотипам легкой цепи антитела.

Термин «scFv» относится к белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариабельную область легкой цепи, и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, причем вариабельные области легкой и тяжелой цепей связаны постоянной связью, к примеру, через синтетический линкер, 15 например короткий гибкий полипептидный линкер, способный экспрессироваться как одноцепочечный полипептид, и где scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого он происходит. Если не указано иное, в контексте настоящего документа scFv может иметь вариабельные области VL и VH, располагающиеся в любом порядке, например, относительно N-конца и C-конца полипептида. scFv может содержать фрагмент VL-линкер- 20 VH или VH-линкер-VL. Линкер может включать в себя фрагменты каркасных последовательностей.

Термины «происходит из» и «полученный из» в контексте настоящего документа относятся к соединению, имеющему структуру, полученную из структуры «родительского» соединения или белка, и чья структура достаточно похожа на соединения, описанные в 25 настоящем документе, и, исходя из этого сходства, специалист в данной области мог бы предположить о наличии тех же или подобных свойств, активности и применимости, что и у заявленных соединений. К примеру, «scFv, полученный из моноклонального антитела», относится к фрагменту антитела, который обладает теми же свойствами, что и данное моноклональное антитело – к примеру, имеет идентичные или схожие VH и VL и/или 30 распознает один и тот же эпитоп.

В контексте настоящего документа термин «антиген» относится к соединению, композиции или веществу, которые могут быть специфически связаны продуктами специфического гуморального или клеточного иммунитета, такими как молекула антитела, T-

клеточный рецептор или CAR. Совершенно очевидно, что настоящее изобретение включает в себя интактный антиген и его антигенный фрагмент. Совершенно очевидно, что антиген может быть создан искусственно или получен из биологического образца. Такой биологический образец может включать в себя, не ограничиваясь этим, образец ткани, образец опухоли, клетку или биологическую жидкость. В предпочтительном варианте осуществления термин «антиген» в настоящем документе относится к HLA-G, в частности к изоформам HLA-G.

В контексте настоящего документа термин «HLA-G» и «человеческий лейкоцитарный антиген G» относится к конкретной молекуле, связанной с этим названием, и к каким-либо другим молекулам, имеющим аналогичную биологическую функцию, чья аминокислотная последовательность по меньшей мере на 80%, предпочтительно – на 90%, более предпочтительно – по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности HLA-G, включая, но не ограничиваясь, любую из нескольких его изоформ, включая, помимо прочих, мембраносвязанные изоформы (например, HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3, HLA-G4), растворимые изоформы (например, HLA-G5, HLA-G6, HLA-G7), а также растворимые формы, образованные в результате протеолитического расщепления мембраносвязанных изоформ (например, sHLA-G1). Примеры последовательностей HLA-G приводятся ниже.

В контексте настоящего документа термины «связывать» или «связывание» относятся к пептидам, полипептидам, белкам, слитым белкам и антителам (включая фрагменты антител), которые распознают антиген и связываются с ним. В предпочтительном варианте осуществления, это относится к виду взаимодействия «антиген-антитело». Под «специфическим связыванием» или «иммуноспецифическим связыванием» подразумевается, что антитело распознает конкретный антиген, но по сути не распознает или не связывает другие молекулы в образце. В некоторых случаях термины «специфическое связывание» или «специфически связывать» могут использоваться применительно к взаимодействию антитела, белка или пептида со вторым химическим веществом, что означает зависимость подобного взаимодействия от присутствия определенной структуры (например, антигенной детерминанты или эпитопа). В контексте настоящего документа термин «специфическое связывание» означает взаимодействие между антителом и антигеном с аффинностью связывания по меньшей мере 10^{-6} М. В некоторых аспектах настоящего изобретения антитела связываются с аффинностью по меньшей мере около 10^{-7} М, предпочтительно – 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М.

Термин «антитело, которое специфически связывается с изоформой HLA-G» или «CAR, который специфически связывается с изоформой HLA-G» и аналогичные термины в контексте

настоящего документа относятся к антителам или фрагментам антител, которые специфически распознают одну или несколько изоформ HLA-G и не распознают или плохо распознают другие антигены (включая другие изоформы HLA-G). В предпочтительном варианте осуществления антитела или фрагменты антител, которые специфически связываются с одной или несколькими изоформами HLA-G, имеют более высокую аффинность к данным изоформам HLA-G или к их фрагменту по сравнению с аффинностью к другим антигенам или их фрагментам, включая другие изоформы HLA-G.

Аффинность антитела может быть мерой его связывания со специфическим антигеном на единичном участке «антиген-антитело» и, по сути, является суммой всех сил притяжения и отталкивания, действующих при взаимодействии между антигенсвязывающим участком антитела и конкретным эпитопом. Аффинность антитела к определенному антигену (например, к изоформе(ам) HLA-G) может быть выражена константой равновесия диссоциации K_d , которая определяется по формуле аффинности участка связывания антител $K_d = [Ag][Ab]/[Ag Ab]$, где $[Ag]$ – концентрация свободного антигена (М), $[Ab]$ – концентрация свободного антитела (М) и $[Ag Ab]$ – концентрация (М) комплекса «антиген-антитело». В случае если антиген и антитело взаимодействуют между собой интенсивно, будет оставаться очень мало свободного антигена или свободного антитела, и, следовательно, константа равновесия или аффинность антитела будет низкой. Средняя аффинность к антителам составляет не менее 10^{-6} М. В некоторых аспектах настоящего изобретения антигенсвязывающий домен CAR связывает от одной до шести, предпочтительно – от двух до пяти изоформ HLA-G с аффинностью не менее 10^{-6} М, предпочтительно – по меньшей мере 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М. Аффинность связывания можно измерить любым методом, доступным специалисту в данной области, в частности, методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

«Стимулирующий лиганд» в контексте настоящего документа означает лиганд, который в случае его присутствия на антигенпрезентирующей клетке (к примеру, на АПК, дендритной клетке, В-клетке и т.п.), способен специфически связываться с родственным связывающим партнером (в настоящем документе упоминается как «стимулирующая молекула») на Т-клетке, тем самым опосредуя первичный ответ Т-клетки, включая, но не ограничиваясь, активацию, инициирование иммунного ответа, пролиферацию и т. п.

Термин «костимулирующий лиганд» в контексте настоящего документа означает молекулу на антигенпрезентирующей клетке (к примеру, на АПК, дендритной клетке, В-клетке и т.п.), которая специфически связывается с родственным связывающим партнером (в

настоящем документе упоминается как «стимулирующая молекула») на Т-клетке, тем самым обеспечивая отправку сигнала, который в дополнение к первичному сигналу, отправку которого обеспечивается, к примеру, связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой ГКС (главного комплекса гистосовместимости), несущей пептид, опосредует ответ Т-клетки, включая, но не ограничиваясь, пролиферацию, активацию, дифференциацию и т.п.

В контексте настоящего документа термин «костимулирующая молекула» относится к молекуле, экспрессируемой иммунной клеткой (например, Т-клеткой, НК-клеткой, В-клеткой), которая обеспечивает цитоплазматическую сигнальную последовательность(и), регулирующую активацию иммунной клетки по стимулированию по меньшей мере для некоторых аспектов сигнального пути иммунных клеток. В одном из аспектов сигнал представляет собой первичный сигнал, который инициируется, к примеру, связыванием комплекса TCR/CD3 с молекулой ГКС, несущей пептид, и который вызывает опосредование ответа Т-клеток, включая, но не ограничиваясь, пролиферацию, активацию, дифференциацию и т.п. Первичная цитоплазматическая сигнальная последовательность (также называемая «первичным сигнальным доменом»), которая оказывает стимулирующее действие, может содержать сигнальный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. В частности, данный термин относится к родственному партнеру связывания на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, присутствующим на антигенпрезентирующей клетке, тем самым опосредуя костимулирующий ответ Т-клетки, такой как, помимо прочего, пролиферация активация, дифференциация и т. п.

«Стимулирующая молекула» в контексте настоящего документа означает молекулу, присутствующую на Т-клетке, которая специфически связывается с родственным стимулирующим лигандом, присутствующим на антигенпрезентирующей клетке.

Термин «костимулирующий сигнал» в контексте настоящего документа относится к сигналу, который в комбинации с первичным сигналом, таким как лигирование TCR/CD3, вызывает активацию, пролиферацию, дифференциацию и т.п. Т-клеток и/или повышающую или понижающую регуляцию ключевых молекул.

Под термином «стимуляция» или «стимулирующий» подразумевается первичный ответ, вызываемый связыванием стимулирующей молекулы (например, комплекса TCR/CD3) с родственным ей лигандом, тем самым опосредуя событие передачи сигнала, такое как, помимо прочего, передача сигнала через комплекс TCR/CD3. Стимуляция может опосредовать

видоизмененную экспрессию определенных молекул, такую как понижающая регуляция TGF- β и/или реорганизация структур цитоскелета и т.п.

«Репортер» или «селектируемый маркер» в контексте настоящего документа относится к полинуклеотиду или полипептиду, который позволяет обнаруживать и/или выбирать экспрессирующие клетки из популяции клеток, подлежащих трансфекции, в частности клетки, трансфицированной конструкцией CAR. При связывании с какой-либо отдельной конструкцией, он позволяет установить присутствие и/или количественную оценку такой конструкции в клетке.

«Иммунные клетки» в контексте настоящего документа означают клетки, участвующие во врожденном и адаптивном иммунитете, например, такие, как белые кровяные тельца (лейкоциты), которые происходят из гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), продуцируемых в костном мозге, лимфоциты (Т-клетки, В-клетки, естественные киллерные клетки (NK) и естественные киллерные Т-клетки (NKT)), а также клетки миелоидного происхождения (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки). В частности, иммунная клетка может быть выбрана из неполного списка, включающего В-клетки, Т-клетки, в частности, Т-клетки CD4⁺ и Т-клетки CD8⁺, NK-клетки, NKT-клетки, АПК-клетки, дендритные клетки и моноциты.

Согласно настоящему изобретению, донор и реципиент иммунных клеток, в предпочтительном варианте осуществления – Т-клеток, могут быть одним и тем же индивидуумом или разными индивидуумами, например аутологичными, аллогенными или ксеногенными индивидуумами. В контексте настоящего документа термин «аутологичные» относится к клеткам или тканям, полученным от одного индивидуума и позднее пересаженным обратно этому же индивидууму. В контексте настоящего документа термин «аллогенный» относится к клеткам или тканям, полученным от разных особей одного и того же вида, где донор и реципиент генетически не идентичны. Применительно к настоящему изобретению, трансплантация аллогенных клеток или тканевого лоскута включает трансплантацию клеток или тканей, при которой донор и реципиент являются разными особями одного вида. Термин «ксеногенный» означает имеющий происхождение или полученный из организма другого вида. Применительно к настоящему изобретению, трансплантация ксеногенных клеток или тканевого лоскута включает трансплантацию клеток или тканей, где донор и реципиент являются разными особями разных видов.

Термин «лечение» относится к какому-либо действию, направленному на улучшение состояния здоровья пациентов, такому как терапия, предотвращение, профилактика и

замедление заболевания или симптомов заболевания. Он подразумевает как радикальное, так и/или профилактическое лечение заболевания. Радикальное лечение означает лечение, направленное на излечение, или лечение, облегчающее, улучшающее и/или устраняющее, ослабляющее и/или стабилизирующее заболевание или симптомы заболевания или страдания, которые оно вызывает прямо или косвенно. Профилактическое лечение включает в себя как лечение, направленное на предотвращение заболевания, так и лечение, снижающее и/или замедляющее прогрессирование и/или частоту заболевания или риск его возникновения. В некоторых вариантах осуществления данный термин относится к ослаблению или полному устранению заболевания, расстройства, инфекции или связанных с ними симптомов. В других вариантах осуществления данный термин относится к минимизации распространения или обострения рака. Лечение по настоящему изобретению не обязательно подразумевает 100%-ное или полное лечение. Точнее, существуют различные уровни лечения, которые рядовой специалист в данной области признает имеющими потенциальную пользу или терапевтический эффект.

В контексте настоящего документа термины «расстройство» или «заболевание» относятся к неправильно функционирующему органу, части тела, структуре или системе организма в результате воздействия генетических отклонений или отклонений в развитии, или в результате инфекции, отравления, недостаточного или несбалансированного питания, токсичности или неблагоприятных факторов окружающей среды. В предпочтительном варианте осуществления данные термины относятся к расстройству здоровья или заболеванию, к примеру, болезни, нарушающей нормальные физические или умственные функции. Более предпочтительно, термин «расстройство» относится к иммунным и/или воспалительным заболеваниям, поражающим животных и/или людей, таким как рак.

Термин «иммунное заболевание» в контексте настоящего документа относится к состоянию субъекта, которое характеризуется повреждением клеток, тканей и/или органов, вызванным иммунной реакцией субъекта на его собственные клетки, ткани и/или органы. Термин «воспалительное заболевание» относится к состоянию субъекта, которое характеризуется воспалением, к примеру, хроническому воспалению. Аутоиммунные расстройства могут быть связаны или не связаны с воспалением. Кроме того, воспаление может или не может быть вызвано аутоиммунным заболеванием.

Термин «рак» в контексте настоящего документа означает заболевание, характеризующееся быстрым и неконтролируемым ростом аномальных клеток. Раковые

клетки могут распространяться локально или в другие части тела через кровоток и лимфатическую систему.

Термин «адоптивная клеточная терапия» или «адоптивная Т-клеточная терапия» или «АКТ» в контексте настоящего документа означает перенос пациенту клеток, которые были сконструированы или иным образом модифицированы до переноса в организм субъекта. Примером АКТ является забор иммунных клеток, таких как Т-клетки, из крови или опухоли субъекта. Затем эти иммунные клетки стимулируются *ex vivo* в культуре и размножаются. Далее данные клетки трансдуцируются одной или несколькими конструкциями нуклеиновых кислот, что позволяет клетке экспрессировать новые молекулы, такие как CAR, обеспечивая сконструированные иммунные клетки новым механизмом для борьбы с заболеванием, например раком. В некоторых случаях CAR содержат антигенсвязывающий домен, который специфически распознает антиген, экспрессируемый опухолью или раком, такой как HLA-G. Типичные иммунные клетки, используемые в процедурах АКТ, включают инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL) или Т-клетки. Иммунные клетки, используемые в АКТ, могут быть получены от самого пациента/субъекта или от универсального донора. АКТ может также сопровождаться факультативным этапом лимфодеплеции собственных лимфоцитов субъекта, которые могут конкурировать с рекомбинантными клетками, введенными обратно субъекту.

Термины «CAR-терапия» или «терапия CAR-клетками» используются здесь взаимозаменяемо и относятся к виду или средству лечения, при котором иммунные клетки модифицируют для того, чтобы экспрессировать CAR для предотвращения или лечения заболевания, например, такого как вирусная инфекция или рак. Такая иммунная клетка может быть аутологичной или аллогенной. Иммунные клетки могут, к примеру, представлять собой В-лимфоциты, Т-лимфоциты, естественные киллерные клетки или естественные киллерные Т-клетки и т.п. К примеру, терапия CAR-клетками включает в себя: получение иммунных клеток от пациента, трансфекцию иммунных клеток генами CAR, которые обеспечивают экспрессию CAR, причем данные CAR направлены против антигена, участвующего в заболевании пациента, расширение популяции модифицированных иммунных клеток и повторное вливание клеток обратно в организм пациента. Термин «противоопухолевый эффект» в контексте настоящего документа относится к биологическому эффекту, который может проявляться в виде уменьшения объема опухоли, сокращения количества опухолевых клеток, сокращения количества метастазов, увеличения продолжительности жизни или улучшения различных физиологических симптомов, связанных с раком. «Противоопухолевый эффект» также может

проявляться в виде способности клеток и CAR по изобретению в первую очередь предотвращать возникновение опухоли или ограничивать образование метастазов.

Термины «цитолитический» или «цитотоксический» в контексте настоящего документа относятся к результату иммунного ответа, опосредованного цитотоксическими клетками, такими как Т-клетки или NK-клетки и NKT-клетки, которые приводят к гибели (например, в результате апоптоза) целевых клеток.

В контексте настоящего документа термин «субъект», «хозяин», «индивидуум» или «пациент» относится к людям и ветеринарным субъектам, в частности к животным, предпочтительно к млекопитающим, еще более предпочтительно к человеку, включая взрослого и ребенка. Однако термин «субъект» также включает животных, отличных от человека, в частности млекопитающих, таких, помимо прочих, как собаки, кошки, лошади, коровы, свиньи, овцы и нечеловекообразные приматы.

В контексте настоящего документа словосочетание «побочные эффекты» охватывает нежелательные и неблагоприятные эффекты профилактического или терапевтического средства. Побочные эффекты всегда нежелательны, но нежелательные эффекты не обязательно являются неблагоприятными. Побочный эффект от терапии (например, профилактического или терапевтического средства) может быть вредным, причиняющим неудобства или опасным. Нежелательные эффекты, которые обычно проявляются на пациентах, многочисленны и известны в данной области.

Термин «в комбинации» в контексте настоящего документа относится к применению более чем одной терапии (например, профилактических и/или терапевтических препаратов). Использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок, в котором терапии (например, профилактические и/или терапевтические препараты) вводятся субъекту с заболеванием или расстройством.

Под термином «модуляция» в контексте настоящего документа подразумевается опосредование обнаруживаемого увеличения или уменьшения уровня ответа у субъекта по сравнению с уровнем ответа у данного субъекта при отсутствии лечения или препарата и/или по сравнению с субъектом, идентичным во всем остальном, но не получавшим лечение. Значение данного термина включает в себя возмущение и/или влияние на нативный сигнал или ответ, опосредующее полезный терапевтический ответ у субъекта, предпочтительно человека.

В контексте настоящего документа «фармацевтическая или ветеринарная композиция» относится к препарату, содержащему один или более активных агентов, к примеру, препарат, содержащий антигенсвязывающий домен антитела к HLA-G по изобретению, и опционально

другие химические компоненты, такие как физиологически подходящие носители и вспомогательные вещества. Цель фармацевтической или ветеринарной композиции – облегчить введение активного агента в организм. Композиции по настоящему изобретению могут иметь форму, подходящую для какого-либо обычного пути введения или применения. В

5 одном из вариантов осуществления «композиция» обычно подразумевает сочетание активного агента, например соединения или композиции, и носителя естественного или искусственного происхождения, инертного (например, детектируемая добавка или метка) или активного, такого как адъювант, разбавитель, связующее вещество, стабилизатор, буферы, соли, липофильные растворители, консервант, адъювант и т. п., а также включает в себя
10 фармацевтически приемлемые носители.

«Приемлемая основа» или «приемлемый носитель» в контексте настоящего документа означает какое-либо известное соединение или сочетание веществ, которые известны специалистам в данной области как полезные при составлении фармацевтических или ветеринарных композиций.

15 «Терапевтически эффективное количество» – это количество препарата, которое при введении субъекту содержит количество активного агента, необходимое для лечения целевого заболевания или расстройства, или для получения желаемого эффекта. «Эффективное количество» варьирует в зависимости от агента (агентов), заболевания и его серьезности, а также от возраста, веса и характеристик субъекта, подлежащего лечению.

20 В контексте настоящего документа термин «лекарственное средство» относится к какому-либо веществу или композиции, обладающему лечебными или профилактическими свойствами против расстройств или заболеваний.

Термины «трансфицированный» или «трансформированный» или «трансдуцированный» используются здесь взаимозаменяемо и применяются к выработке клеток химерных
25 антигенных рецепторов и, в частности, относятся к процессу, посредством которого чужеродная или экзогенная нуклеотидная последовательность вводится в клетку. Экзогенная нуклеиновая кислота может быть введена в клетку-хозяина временно или на постоянное время. «Трансфицированная» или «трансформированная» или «трансдуцированная» клетка – это клетка, которая была трансфицирована, трансформирована или трансдуцирована экзогенной
30 нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления такая трансдукция производится с помощью вектора, предпочтительно лентивирусного вектора.

В контексте настоящего документа термины «конструкция нуклеиновой кислоты» и «вектор» эквивалентны и относятся к молекуле нуклеиновой кислоты, которая служит для

переноса последовательности нуклеиновой кислоты, являющейся «пассажи́ром», такой как ДНК или РНК, в клетку-хозяина. Вектор может содержать точку начала репликации, селективный маркер и, опционально, подходящий участок для вставки последовательности или гена. Вектор может представлять собой самореплицирующийся внехромосомный вектор, или вектор, который интегрируется в геном хозяина. Он также может содержать элементы экспрессии, включая, например, промотор, правильную последовательность инициации трансляции, такую как участок связывания рибосомы и стартовый кодон, кодон терминации и последовательность терминации транскрипции. Конструкция нуклеиновой кислоты может также содержать другие регуляторные области, такие как энхансеры, сайленсеры и граничные элементы/инсуляторы для управления уровнем транскрипции данного гена.

Векторы, способные управлять экспрессией генов и/или последовательностей нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны, также могут именоваться здесь «векторы экспрессии». Существует более распространенных типов векторов, включая конструкции нуклеиновых кислот, фагмиды, вирусные геномы, космиды и искусственные хромосомы. Конструкция нуклеиновой кислоты может представлять собой вектор для устойчивой или транзientной экспрессии гена или последовательности. Конструкция нуклеиновой кислоты может содержать точку начала репликации конструкции нуклеиновой кислоты (*ori*). В частности, конструкция нуклеиновой кислоты может быть сконструирована для генетического переноса между разными хозяевами, включая, но не ограничиваясь: плазмиду, вирус, космиду, фаг, ВАС и YAC (искусственные хромосомы бактерий и дрожжей). Такие векторы могут быть созданы из коммерчески доступных векторов или продуцированы, к примеру, из бакуловирусов, ретровирусов, аденовирусов или AAV (аденоассоциированный вирус) в соответствии с методами, известными в данной области. В предпочтительном варианте осуществления данные термины относятся к лентивирусному вектору.

В контексте настоящего документа термин «экспрессия» относится к процессу, посредством которого полинуклеотиды транскрибируются в мРНК, и/или к процессу, посредством которого транскрибируемая мРНК впоследствии транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Уровень экспрессии гена может быть определен путем измерения количества мРНК или белка в образце клетки или ткани. В одном из аспектов настоящего изобретения уровень экспрессии гена из какого-либо образца можно напрямую сравнивать с уровнем экспрессии этого гена из контрольного или эталонного образца. В другом аспекте уровень экспрессии гена из какого-либо образца можно напрямую сравнивать с уровнем экспрессии этого гена из того же образца после введения препарата.

Термин «функциональный вариант» или «биологический эквивалент» в контексте настоящего документа используются взаимозаменяемо и относятся к полипептиду (CAR или белку), имеющему существенную или значительную идентичность последовательности или сходство с «родительским» полипептидом, функциональный вариант которого сохраняет биологическую активность полипептида, вариантом которого он является. Если здесь не указано иное, следует понимать, что упоминание какого-либо полинуклеотида, полипептида или белка в настоящем документе также включает их эквиваленты. Например, эквивалент подразумевает по меньшей мере около 70% гомологии или идентичности или по меньшей мере 80% гомологии или идентичности, и в другом варианте по меньшей мере около 85%, или же по меньшей мере около 90%, или в другом варианте по меньшей мере около 95%, или же 98%-ную гомологию или идентичность, и проявляет, по существу, биологическую активность, равнозначную эталонному белку, полипептиду или нуклеиновой кислоте. В альтернативном варианте, при упоминании о полинуклеотидах, их эквивалентом является полинуклеотид, который в жестких условиях гибридизуется с эталонным полинуклеотидом или его комплементом. Применительно к антителам термин «эквивалент» или «биологический эквивалент» означает, что способность антитела специфически связывать свой эпитопный белок или его фрагмент, измеренная методом иммуноферментного анализа (ELISA) или иными подходящими методами, является аналогичной или консервативной. Биологически эквивалентные антитела включают, но не ограничиваются, те антитела, пептиды, фрагменты антител, варианты антитела, производные антитела и миметики антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и эталонное антитело. Применительно к CAR, функциональные варианты включают, к примеру, те варианты CAR, описанные в настоящем документе (родительские CAR), которые сохраняют способность распознавать клетки-мишени в сходной степени, в той же степени или в большей степени, что и родительские CAR. Что касается родительского CAR, функциональный вариант может, к примеру, быть по меньшей мере примерно на 50%, 75%, 80%, 90%, 98% или в большей степени идентичным по аминокислотной последовательности родительскому CAR.

Под «вариантом» или «эквивалентом» также подразумевается полипептидная последовательность, которая отличается от «родительской» полипептидной последовательности по меньшей мере одной модификацией аминокислоты. К примеру, в контексте настоящего изобретения вариант может представлять собой вариант моноклонального антитела или его фрагмента, или вариант CAR. Обычно вариант содержит от 1 до 50 модификаций аминокислоты, предпочтительно от 1 до 40 модификаций аминокислоты.

В частности, вариант может иметь от 1 до 30 модификаций аминокислоты, к примеру, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 модификаций аминокислоты по сравнению с его родительской молекулой. Варианты могут содержать одну или более аминокислотных замен, и/или одну или более аминокислотных вставок, и/или одну или более аминокислотных делеций. В некоторых вариантах осуществления вариант может содержать одну или более консервативных замен, например как показано выше. В некоторых дополнительных вариантах осуществления вариант антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в частности scFv, может содержать одну или более аминокислотных модификаций в доменах CAR родительского Mab (моноклонального антитела). В некоторых других вариантах осуществления вариант родительского Mab может содержать одну или более аминокислотных модификаций по меньшей мере в одном каркасном домене.

Под «исходным полипептидом» или «исходным полипептидом» в контексте настоящего документа подразумевается немодифицированный полипептид, который впоследствии модифицируется для создания варианта. В контексте настоящего изобретения родительский полипептид может представлять собой антитело, предпочтительно моноклональное антитело, еще более предпочтительно – scFv.

В контексте настоящего документа «гомология», «идентичность» или «сходство» при использовании применительно к двум или более нуклеиновым кислотам или полипептидным последовательностям относятся к двум или более последовательностям или субпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент одинаковых нуклеотидов или аминокислотных остатков, например, идентичность не менее 60%, предпочтительно – не менее 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или более высокую степень идентичности на протяжении определенной области (к примеру, нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело, описанное в настоящем документе или аминокислотная последовательность антитела, описанного в данном документе). Гомология может быть определена путем сравнения позиций в каждой последовательности, которые могут быть пространственно совмещены для целей сравнения. Если позиции в сравниваемых последовательностях заняты одним и тем же основанием или аминокислотой, молекулы являются гомологичными по данной позиции. Степень гомологии между последовательностями является показателем количества совпадающих или гомологичных позиций, которые являются общими для данных последовательностей. Термин «процент идентичности» применительно к последовательностям означает уровень

идентичности или гомологии между указанными последовательностями и может быть определен методами, общеизвестными в данной области техники. Обычно процент идентичности между двумя последовательностями нуклеиновых кислот определяется с помощью компьютерных программ, таких как GAP, предоставляемая в пакете программ GCG (Руководство по программе для пакета Wisconsin, версия 8, август 1996 г., Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, Висконсин, США 53711) (Needleman, SB and Wunsch, CD, (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453). С настройками, адаптированными, к примеру, к последовательности ДНК (в частности: штраф GAP за создание 5,0 и штраф GAP за удлинение 0,3), молекулы нуклеиновых кислот могут быть совмещены друг с другом с помощью программного обеспечения для выравнивания Pileup, доступного как часть программного пакета GCG. Определение процента идентичности между двумя последовательностями также может быть выполнено при помощи математического алгоритма. Одним из неограничивающих примеров математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, являются алгоритмы, описанные в Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1987) Supplement 30, section 7.7.18, Table 7.7.1. или алгоритм Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268, modified as in Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST Altschul et al, 1990, J. Mol. Biol. 215:403. Поиск нуклеотидов при помощи ПО BLAST (средство поиска основного локального выравнивания) может быть выполнен с набором параметров нуклеотидной программы NBLAST, к примеру, для показателя=100, длины слова=12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекуле нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Поиск белков при помощи BLAST может быть выполнен с набором параметров программы XBLAST, к примеру, для показателя=50, длины слова=3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекуле белка по настоящему изобретению. Для получения выравнивания с пробелами в целях сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. В качестве альтернативы, можно использовать PSI-BLAST для выполнения повторяющегося поиска, который обнаруживает отдаленные родственные связи между молекулами (Id). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см., к примеру, сайт NCBI). Другим предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers and Miller, 1988, CABIOS 4: 11-17. Такой

алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью пакета программного обеспечения для выравнивания последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу весовых остатков PAM 120, штраф за удлинение гэпа 12, и штраф за гэп 4.

- 5 Выравнивание и процент гомологии или идентичности последовательностей можно определить, например, с использованием программ, известных в данной области. Предпочтительно для выравнивания используются параметры по умолчанию. Предпочтительной программой выравнивания является BLAST с параметрами по умолчанию. В частности, предпочтительными программами являются BLASTN и BLASTP со следующими
- 10 параметрами по умолчанию: Genetic code = standard; filter = none; strand = both; cutoff = 60; expect = 10; Matrix = BLOSUM62; Descriptions = 50 sequences; sort by = HIGH SCORE; Databases = non-redundant, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SPupdate + PIR. Подробную информацию об этих программах можно найти по следующему адресу в Интернете: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST. Для сравнения двух аминокислотных
- 15 последовательностей можно использовать, например, инструмент “Emboss needle” для попарного выравнивания последовательностей белков, предоставляемый EMBL-EBI и доступный по адресу: www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=emboss_needle&context=protein, используя
- настройки по умолчанию: (i) Matrix: BLOSUM62, (ii) Gap open: 10, (iii) gap extend: 0.5, (iv) output format: pair, (v) end gap penalty: false, (vi) end gap open: 10, (vii) end gap extend: 0.5.
- 20

- Идентичность нуклеотидных или аминокислотных последовательностей может быть определена путем сравнения выровненных последовательностей. Если равнозначные позиции в сравниваемых последовательностях заняты одним и тем же основанием или аминокислотой, молекулы являются идентичными по данной позиции. Оценка выравнивания в виде процента
- 25 идентичности является показателем количества идентичных аминокислот или оснований на позициях, общих для сравниваемых последовательностей. При сравнении последовательностей для оптимального выравнивания может потребоваться введение гэпов в одну или более последовательностей для того, чтобы учесть возможные вставки и делеции в данных последовательностях. В методах сравнения последовательностей могут применяться
- 30 штрафы за гэпы, таким образом, для одинакового количества идентичных молекул в сравниваемых последовательностях выравнивание последовательностей с минимально возможным количеством гэпов, отражающее более высокую степень родства между двумя сравниваемыми последовательностями, получит более высокий балл, чем одна, имеющая

много гэпов. Расчет максимального процента идентичности включает в себя получение оптимального выравнивания с учетом штрафов за гэпы.

Данные термины также включают последовательности с делециями и/или добавлениями, а также последовательности с заменами, особенно консервативными заменами.

- 5 Предпочтительно идентичность имеет место на протяжении области, длина которой составляет по меньшей мере около 25 аминокислот или нуклеотидов, или, более предпочтительно – области длиной по меньшей мере 50-100 аминокислот или нуклеотидов. «Неродственная» или «негомологичная» последовательность имеет менее 50% идентичности или, в альтернативном варианте – менее 40% идентичности, предпочтительно – менее 30% с
- 10 одной из последовательностей, описанных в настоящем документе.

Антиген HLA-G

- «HLA-G» означает человеческий лейкоцитарный антиген G, который имеет по меньшей мере семь изоформ. Его экспрессия в основном ограничивается фето-материнским пространством на вневорсинчатом цитотрофобласте, плацентой, амнионом; некоторыми
- 15 тканями здорового взрослого индивидуума, такими как вилочковая железа, роговица, эпителиальные клетки бронхов и поджелудочная железа; и различными типами клеток, такими как мезенхимальные стволовые клетки, некоторые активированные моноциты и предшественники эритроидов и эндотелия. Растворимый HLA-G также содержится в жидкостях организма, таких как плазма, спинномозговая жидкость, злокачественный асцит,
- 20 плевральные выпоты и сперма. Несмотря на то, что ген HLA-G не активен в некоторых тканях, его экспрессия может быть индуцирована определенными молекулами, такими как прогестерон или противораковые препараты. Кроме того, эта молекула также может быть неоэкспрессирована при патологических состояниях, таких как рак, рассеянный склероз, воспалительные заболевания и вирусные инфекции, или после пересадки аллотрансплантата.
- 25 Растворимый HLA-G (sHLA-G) может быть обнаружен в сыворотке/плазме индивидуумов.

- HLA-G отличается от классических молекул HLA класса I своим малым генетическим разнообразием, тканевой экспрессией, наличием семи изоформ и иммуно-ингибирующими функциями. Эта молекула выполняет иммуно-ингибирующую функцию посредством прямого связывания с тремя ингибирующими рецепторами: лейкоцитарным
- 30 иммуноглобулиноподобным рецептором B1 (LILRB1/ILT2/CD85j), LILRB2 (ILT4/CD85d) and KIR2DL4 (or CD158d), как это схематично показано на Фиг. 1А. У рецепторов LILRB сайт распознавания функционирует через домен $\alpha 3$ HLA-G, и влияние на него пептида маловероятно. LILRB1 экспрессируется В-клетками, некоторыми Т-клетками, некоторыми

НК-клетками и всеми моноцитами/дендритными клетками, тогда как LILRB2 является миелоид-специфичным, и его экспрессия ограничена моноцитами/дендритными клетками. KIR2DL4 представляет собой специфический рецептор для HLA-G, экспрессируемый только субпопуляцией CD56bright НК-клеток. Было продемонстрировано, что LILRB1 и LILRB2 связывают широкий спектр классических молекул HLA с помощью домена $\alpha 3$ и $\beta 2M$, для которых HLA-G является лигандом с наивысшей аффинностью, тогда как для KIR2DL4 HLA-G является единственным известным лигандом. Кроме того, было продемонстрировано, что LILRB1 и LILRB2 обладают более высокой аффинностью к мультимерам HLA-G, чем мономерные структуры. Важно подчеркнуть разницу между тем, как LILRB1 и LILRB2 связываются со своими лигандами: LILRB1 демонстрирует более высокую аффинность к тяжелой цепи HLA-G, ассоциированной с $\beta 2M$, тогда как LILRB2 демонстрирует значительно отличающееся распознавание связывания MHC I за счет связывания в большей степени доменом $\alpha 3$, чем $\beta 2M$, с участием ароматических аминокислот Phe-195 и Tyr-197. Это объясняет связывание последнего рецептора с HLA-G, не зависящее от $\beta 2M$, и его более высокую аффинность к изоформам, не содержащим $\beta 2M$.

Связывая эти рецепторы, HLA-G действует как понижающий регулятор иммунной системы, некоторые функции которого были описаны: ингибирование цитолитической функции НК-клеток маточной и периферической крови, антиген-специфическая цитолитическая функция цитотоксических Т-лимфоцитов, аллопролиферативный ответ Т-клеток CD4⁺, пролиферация Т-клеток и НК-клеток периферической крови, а также созревание и функционирование дендритных клеток, показанные на Фиг. 1С. Кроме того, HLA-G может индуцировать образование супрессорных клеток. Но, в отличие от классических молекул HLA класса I, до сих пор нет сведений ни о каких-либо стимулирующих функциях HLA-G, ни об ответах, направленных против аллогенного HLA-G.

HLA-G способен ингибировать все субпопуляции иммунных клеток; таким образом, он может блокировать все стадии противоопухолевого ответа. Эта молекула экспрессируется во многих типах первичных опухолей, метастазов и злокачественных выпотов, а также может быть обнаружена на клетках опухоли и инфильтрирующих опухоль клетках. Было продемонстрировано, что экспрессия HLA-G линиями опухолевых клеток защищает их от разрушения цитотоксическими Т-лимфоцитами и НК-клетками. Таким образом, экспрессия HLA-G злокачественными клетками способна препятствовать иммунной элиминации опухоли посредством ингибирования активности инфильтрирующих опухоль НК, цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) и антигенпрезентирующих клеток (АПК).

Экспрессия HLA-G контролируется в основном на уровне транскрипции промотором уникального гена, а на посттранскрипционном уровне – альтернативным сплайсингом, стабильностью мРНК, трансляцией и транспортировкой белка на поверхность клетки.

Первичный транскрипт HLA-G альтернативно сплайсирован, что приводит к экспрессии
5 семи изоформ, четыре из которых связаны с мембраной (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3 и HLA-G4), а три являются растворимыми (HLA-G5, HLA-G6 и HLA-G7). HLA-G1 и HLA-G5 представляют собой типичную структуру классической молекулы HLA I класса: тяжелая цепь, состоящая из трех глобулярных доменов, нековалентно связанных с β 2-микроглобулином (β 2M) и пептидом, в то время как другие изоформы короче, не содержат один или два домена
10 тяжелой цепи и не способны связывать β 2M (Фиг. 1А).

HLA-G1 и HLA-G5 считаются наиболее распространенными изоформами, вероятно, из-за недостаточного разнообразия антител против других изоформ, в частности, из-за недостатка антител против изоформ, не содержащих β 2M.

Изоформа HLA-G1 представляет собой полную изоформу с доменами α 1, α 2 и α 3, ассоциированными с β 2-микроглобулином. Изоформа HLA-G2 не имеет домена α 2, тогда как
15 HLA-G3 не имеет доменов α 2 и α 3, а HLA-G4 не имеет домена α 3. Ни одна из изоформ HLA-G2, HLA-G3 и HLA-G4 не связывает β 2M. Растворимые изоформы HLA-G5 и HLA-G6 содержат те же внеглобулярные домены, что и HLA-G1 и HLA-G2 соответственно. Изоформа HLA-G7 имеет только домен α 1, связанный с двумя аминокислотами, кодируемыми интроном
20 2. Изоформа HLA-G5 связывает β 2M, тогда как изоформы HLA-G6 и HLA-G7 не связывают β 2M.

Кроме того, молекулы HLA-G способны образовывать димеры за счет создания дисульфидных связей между двумя уникальными остатками цистеина на позициях 42 (связи Cys42-Cys42) и 147 (связи Cys42-Cys147) тяжелой цепи HLA-G. Димеризация имеет
25 наклонную ориентацию, которая открывает участки связывания рецепторов HLA-G домена α 3 сверху, делая их более доступными для рецепторов. Следовательно, димеры HLA-G связывают рецепторы с более высокой аффинностью и более медленными скоростями диссоциации по сравнению с мономерами, а также отправляют сигналы более эффективно, чем мономеры.

Альтернативные названия: антиген гистосовместимости I класса HLA-G или G, или
30 МНС-G. Сведения о HLA-G имеются в базах данных под следующими номерами доступа: Идентификатор гена: 3135, UniGene Hs.512152. Сведения о данном белке имеются в UniProt под номером доступа: P17693. Запись в GenBank о последовательности белка и мРНК соответственно NP_002118.1. и NM_002127.5.

При сравнении последовательностей изоформ HLA-G HLA-G1 обычно выбирают в качестве канонической последовательности, то есть такой последовательности ДНК, РНК или аминокислот, которая отражает наиболее часто встречающуюся нуклеиновую кислоту, основание или аминокислоту на каждой позиции, поэтому в базе данных последовательность этой изоформы обычно фигурирует под наименованием «HLA-G». HLA-G2-G7 отличаются от HLA-G1 аминокислотными делециями и/или заменами. Сведения о человеческих изоформах HLA-G в Uniprot содержатся под следующими номерами доступа: P17693-1 для HLA-G1, P17693-2 для HLA-G2, P17693-3 для HLA-G3, P17693-4 для HLA-G4, P17693-5 для HLA-G5, P17693-6 для HLA-G6, P17693-7 для HLA-G7.

Антитела к изоформам HLA-G

Согласно настоящему изобретению предложен антитело, которое специфически связывает от одной до шести, предпочтительно от двух до пяти изоформ HLA-G из семи изоформ HLA-G, но не связывает и не распознает все изоформы HLA-G. Например, данное антитело может специфически связывать одну, две, три, четыре, пять или шесть изоформ HLA-G. Изоформы HLA-G могут быть выбраны из группы, состоящей из HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3, HLA-G4, HLA-G5, HLA-G6 и HLA-G7, предпочтительно из HLA-G1, HLA-G2, HLA-G5 и HLA-G6.

Например, антитело или антигенсвязывающий домен CAR по изобретению может распознавать:

- HLA-G1, HLA-G4 и HLA-G5, если эпитоп, распознаваемый антителом или антигенсвязывающим доменом, расположен на домене $\alpha 2$ HLA-G,
- HLA-G1, HLA-G2, HLA-G5 и HLA-G6, если эпитоп, распознаваемый антителом или антигенсвязывающим доменом, расположен на домене $\alpha 3$ HLA-G,
- HLA-G1 и HLA-G5, если эпитоп, распознаваемый антителом или антигенсвязывающим доменом, расположен на домене $\beta 2M$ HLA-G или на домене, который является специфичным для HLA-G, ассоциированным с доменом $\beta 2M$.

В отдельном варианте осуществления антитело или его фрагмент не распознает все изоформы HLA-G, т.е. антитело или антигенсвязывающий домен CAR по изобретению не распознает эпитоп домена $\alpha 1$ HLA-G.

В одном из аспектов настоящего изобретения данное антитело способно специфически связывать изоформы HLA-G1 и HLA-G5. При этом антитело практически не связывает другие изоформы HLA-G, особенно HLA-G2, HLA-G3, HLA-G4, HLA-G6 и HLA-G7. Более конкретно, данное антитело является специфичным для изоформ HLA-G, ассоциированных с $\beta 2M$. В

данном контексте антитело практически не связывает изоформы HLA-G1 и HLA-G5, не содержащие $\beta 2M$.

В настоящем документе предлагается антитело 15E7. В частности, 15E7 представляет собой scFv-антитело, имеющее последовательность тяжелой цепи в соответствии с ИД. № ПОСЛЕД. (ИДЕНТИФИКАЦИОННЫМ НОМЕРОМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ): 3, и последовательность легкой цепи в соответствии с ИД. № ПОСЛЕД. 4. CAR антитела 15E7 имеют следующие последовательности по номенклатуре Kabat:

- CDR1 тяжелой цепи последовательности с SEQ ID NO: 11;
- CDR2 тяжелой цепи последовательности с SEQ ID NO: 12,
- CDR3 тяжелой цепи последовательности с SEQ ID NO: 13,
- CDR1 легкой цепи последовательности с SEQ ID NO: 14,
- CDR2 легкой цепи последовательности с SEQ ID NO: 15, и
- CDR3 легкой цепи последовательности с SEQ ID NO: 16.

Соответственно, настоящее изобретение относится к антителу, имеющему:

• тяжелую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 варибельной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 3, и (ii) легкую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 варибельной области легкой цепи с SEQ ID NO: 4;

• тяжелую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащие последовательности с SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно, и (ii) легкую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащие последовательности с ИД. № ПОСЛЕД. 14, 15 и 16 соответственно, причем опционально каждая CDR может содержать 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены, делеции или вставки; или

• варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи последовательности с SEQ ID NO: 3 и 4 или варибельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с SEQ ID NO: 3, и варибельную область легкой цепи область, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с SEQ ID NO: 4.

Данное антитело может быть химерным, человеческим или гуманизированным. Данное антитело может представлять собой фрагмент антитела, выбранного из Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, диатела, фрагмента одноцепочечного антитела или мультиспецифического антитела, содержащего несколько различных фрагментов антитела. Данное антитело может быть конъюгировано или ковалентно связано с токсическим агентом или с детектируемой меткой.

В другом аспекте данное антитело способно специфически связывать изоформы HLA-G2 и HLA-G6. Причем оно практически не связывает другие изоформы HLA-G, особенно изоформы, ассоциированные с субъединицей $\beta 2M$, такие как HLA-G1, HLA-G3, HLA-G4, HLA-G5 и HLA-G7. Более конкретно, данное антитело является специфичным к изоформам HLA-G, не содержащим $\beta 2M$, и специфически связывает HLA-G2 и HLA-G6 и/или изоформы HLA-G1 и HLA-G5, не содержащие $\beta 2M$.

В настоящем документе предлагается антитело LFTT-1. В частности, LFTT-1 представляет собой scFv-антитело, имеющее последовательность тяжелой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 1 и последовательность легкой цепи в соответствии с SEQ ID NO: 2. CDR антитела LFTT-1 имеют следующие последовательности по номенклатуре Kabat:

- CDR1 тяжелой цепи последовательности с SEQ ID NO: 5;
- CDR2 тяжелой цепи последовательности с SEQ ID NO: 6,
- CDR3 тяжелой цепи последовательности с SEQ ID NO: 7,
- CDR1 легкой цепи последовательности с SEQ ID NO: 8,
- CDR2 легкой цепи последовательности с SEQ ID NO: 9, и
- CDR3 легкой цепи последовательности с ИД. № ПОСЛЕД. 10.

Соответственно, настоящее изобретение относится к антителу, имеющему:

- тяжелую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 вариабельной области тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1, и (ii) легкую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 вариабельной области легкой цепи с SEQ ID NO: 2;

- тяжелую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащие последовательности с SEQ ID NO: 5, 6, и 7 соответственно, и (ii) легкую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащие последовательности с SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно, причем опционально каждая CDR может содержать 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены, делеции или вставки; или

- вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи последовательности с SEQ ID NO: 1 и 2 или вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи область, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с SEQ ID NO: 2.

Указанное антитело может быть химерным, человеческим или гуманизированным. Данное антитело может представлять собой фрагмент антитела, выбранного из Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, диатела, фрагмента одноцепочечного антитела или мультиспецифического

антитела, содержащего несколько различных фрагментов антитела. Данное антитело может быть конъюгировано или ковалентно связано с токсическим агентом или с детектируемой меткой.

В отдельном варианте осуществления антитело представляет собой мультиспецифическое антитело, предпочтительно биспецифическое антитело. Биспецифические антитела содержат два разных фрагмента F(ab), которые распознают два разных эпитопа на одном и том же или на разных антигенах. В частности, биспецифическое антитело по изобретению связывает разные эпитопы на одной и той же изоформе(ах) HLA-G или на разных изоформах HLA-G. В предпочтительном варианте осуществления биспецифическое антитело специфически связывает различные изоформы HLA-G и содержит F(ab), который распознает изоформы HLA-G, не содержащие $\beta 2M$, и второй F(ab), который распознает изоформы HLA-G, ассоциированные с доменом $\beta 2M$.

В одном из вариантов осуществления биспецифическое антитело содержит один F(ab), который специфически связывается с изоформами HLA-G, не содержащими $\beta 2M$, в предпочтительном варианте – с HLA-G2 и HLA-G6 и/или с изоформами HLA-G1 и HLA-G5, не содержащими $\beta 2M$, и еще один F(ab), который специфически связывается с изоформами HLA-G, ассоциированными с $\beta 2M$, предпочтительно с изоформами HLA-G1 и HLA-G5. В данном конкретном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит один F(ab) из антитела LFTT-1 с CDR, описанными выше (SEQ ID NO: 5-10), и один F(ab) антитела 15E7 с CDR, описанными выше (SEQ ID NO: 11-16).

В еще одном варианте осуществления биспецифическое антитело к HLA-G содержит непрерывную тяжелую цепь, сконструированную из Fc (Шарнир-CH2-CH3), за которой расположена тяжелая цепь Fab (CH1-VH) первого антитела (антитела 1) и последующая тяжелая цепь Fab (CH1-VH) второго антитела (антитела 2), к последнему присоединена полипептидная линкерная последовательность. Во время экспрессии белка образующаяся тяжелая цепь собирается в димеры, в то время как коэкспрессируемые легкие цепи (VL-CL) антитела 1 и антитела 2 связываются со своими родственными тяжелыми цепями с образованием конечной tandemной молекулы F(ab)'2-Fc. В предпочтительном варианте осуществления антитело 1 и антитело 2 отличаются, предпочтительно представляя собой антитела LFTT-1 и 15E7 соответственно.

В одном из вариантов осуществления антитело или его фрагмент не связывается или не распознает все изоформы HLA-G. В частности, антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с одной или несколькими, но не со всеми изоформами HLA-G,

имеет константу аффинности K_d , равную по меньшей мере 10^{-6} М. В отдельных аспектах настоящего изобретения антитело или его фрагмент связывает одну или более изоформ, но не все изоформы HLA-G с высокой аффинностью, равной по меньшей мере около 10^{-7} М, предпочтительно – по меньшей мере около 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М.

5 В отдельном варианте осуществления антитело или его фрагмент не связывает или не распознает домен альфа1 изоформ HLA-G. Это означает, что такое антитело или его фрагмент может связывать или распознавать изоформы HLA-G, не имеющие домена альфа-1, например такие изоформы HLA-G, как описанные в Tronik-Le Roux et al., Molecular Oncology 11 (2017) 1561-1578, которые содержат домены alpha2 и alpha3 или только домен alpha3. К примеру, 10 такое антитело или его фрагмент может связываться с доменом альфа2, альфа3 или $\beta 2M$.

Последовательность антитела или фрагмента антитела по изобретению может применяться в способе получения CAR или для приготовления фармацевтической композиции. В альтернативном варианте, антитело или фрагмент антитела по изобретению может применяться для обнаружения изоформ HLA-G в диагностических тестах, таких как 15 иммунохимические анализы.

Антитела или фрагменты антител могут быть идентифицированы, например, методами иммунохимического анализа, такими как радиоиммунный анализ (RIA), твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), а также анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR), или иными методами, известными специалистам в данной области.

20 В предпочтительном варианте осуществления антитела (включая их фрагменты), которые специфически связываются с одной или несколькими изоформами HLA-G, практически не вступают в перекрестную реакцию с другими антигенами (т.е. не обнаруживаются в стандартных иммунологических анализах). Антитело специфически связывается с антигеном, если связывание происходит с антигеном, обладающим более 25 высокой аффинностью по сравнению с каким-либо перекрестнореагирующим антигеном, как это было определено экспериментальными методами, такими как вестерн-блоттинг (WB), радиоиммуноанализы (RIA) и иммуноферментные анализы (ELISA), в особенности конкурентный ELISA.

Химерные антигенные рецепторы (CAR) к изоформам HLA-G

30 CAR обычно содержит эктодомен (внеклеточный домен) и эндодомен (цитоплазматический домен), в предпочтительном варианте осуществления присоединенный шарнирным доменом и трансмембранным доменом. В частности, CAR согласно изобретению опционально содержит расщепляемый линкер и репортер. Эктодомен, экспрессируемый на

поверхности клетки, содержит антигенсвязывающий домен или рецепторный домен, опционально – сигнальный пептид, который направляет антигенсвязывающий домен в эндоплазматический ретикулум для обработки. Внеклеточный домен содержит антигенсвязывающий домен, который специфически распознает целевой антиген. В качестве

5 неограничивающего примера антигенсвязывающий домен может представлять собой антитело, предпочтительно одноцепочечное антитело, такое как scFv. Спейсерная область связывает антигенсвязывающий домен с трансмембранным доменом и имеет строение, обеспечивающее достаточную гибкость, что позволяет антигенсвязывающему домену ориентироваться таким образом, чтобы он был способен распознавать антиген.

10 Трансмембранный домен обычно представляет собой гидрофобную альфа-спираль, которая обычно проходит через липидный бислой клеточной мембраны. Эндодомен CAR состоит из передающего сигнал пептида, который распространяет сигнал активации внутриклеточно в цитоплазму клетки, тем самым стимулируя клетку, экспрессирующую CAR. Эндодомен может содержать несколько сигнальных доменов, как поясняется ниже.

15 В некоторых вариантах осуществления CAR содержит по меньшей мере один внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и цитоплазматический сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы и/или костимулирующей молекулы, как определено ниже. В некоторых вариантах осуществления комплект полипептидов включает в себя переключатель

20 димеризации, который в присутствии молекулы димеризации способен связывать полипептиды друг с другом, к примеру, может связывать антигенсвязывающий домен с внутриклеточным сигнальным доменом. В одном из аспектов цитоплазматический сигнальный домен дополнительно содержит один или более функциональных сигнальных доменов, полученных от по меньшей мере одной костимулирующей молекулы, как определено ниже.

25 В одном из аспектов CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы. В одном из аспектов CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен,

30 содержащий функциональный сигнальный домен, полученный из костимулирующей молекулы, а также функциональный сигнальный домен, полученный из стимулирующей молекулы.

В предпочтительном варианте осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, опционально – шарнирный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, содержащий два функциональных сигнальных домена, происходящих от одной или нескольких костимулирующих молекул, а также функциональный сигнальный домен, производный от стимулирующей молекулы. В одном из аспектов CAR опционально содержит лидерную последовательность или пептидную сигнальную последовательность на amino-конце (N-ter) слитого белка CAR.

В отдельном варианте осуществления CAR дополнительно содержит расщепляемый линкер и репортер для облегчения идентификации и отбора экспрессирующих клеток из популяции клеток, подлежащих трансфицированию рецепторами CAR по изобретению, в предпочтительном варианте осуществления – последовательно на карбокси-конце (C-ter) слитого белка CAR. Согласно изобретению, сконструированный CAR имеет один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или более компонентов, и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из компонентов облегчает нацеливание или связывание иммунной клетки со специфической изоформой(ами) HLA-G. В предпочтительном варианте осуществления данный по меньшей мере один компонент является производным моноклонального антитела, как определено в предыдущем разделе. В предпочтительном варианте осуществления данный компонент представляет собой scFv.

В предпочтительном варианте осуществления CAR к HLA-G последовательно содержит или включает в себя от N-конца до C-конца: опционально – пептидную сигнальную последовательность, антитело к HLA-G или его фрагмент, в предпочтительном варианте – scFv к HLA-G, спейсерный домен, трансмембранный домен, по меньшей мере один внутриклеточный домен, расщепляемый линкер и усеченный репортер CD19 человека. Все эти компоненты будут более подробно описаны ниже.

В частности, CAR по изобретению, более конкретно – антигенсвязывающий домен, антитело или scFv по изобретению, может специфически связывать от одной до шести, предпочтительно от двух до пяти изоформ HLA-G, более предпочтительно – одну или две изоформы HLA-G, или две или три изоформы HLA-G, однако не связывает все изоформы HLA-G. К примеру, CAR может специфически связывать одну, две, три, четыре, пять или шесть изоформ HLA-G. Изоформы HLA-G могут быть выбраны из группы, состоящей из HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3, HLA-G4, HLA-G5, HLA-G6 и HLA-G7, предпочтительно из HLA-G1, HLA-G2, HLA-G5 и HLA-G6.

В одном из аспектов настоящего изобретения CAR способен специфически связывать изоформы HLA-G, ассоциированные с $\beta 2M$, такие как изоформы HLA-G1 и HLA-G5. При этом CAR практически не связывает другие изоформы HLA-G, в особенности HLA-G2, HLA-G3, HLA-G4, HLA-G6 и HLA-G7. Более конкретно, CAR является специфичным для изоформ HLA-G, ассоциированных с $\beta 2M$. В данном контексте CAR практически не связывает изоформы HLA-G1 и HLA-G5, не содержащие $\beta 2M$.

В еще одном аспекте CAR может специфически связывать изоформы HLA-G2 и HLA-G6. При этом CAR практически не связывает другие изоформы HLA-G, в особенности HLA-G1, HLA-G3, HLA-G4, HLA-G5 и HLA-G7. Более конкретно, CAR является специфичным для изоформ HLA-G, не содержащих $\beta 2M$, и может специфически связывать HLA-G2 HLA-G6 и/или изоформы HLA-G1 и HLA-G5, не содержащие $\beta 2M$.

Антигенсвязывающий домен

Внешний домен CAR по изобретению представляет собой антигенсвязывающий домен. В частности, данный антигенсвязывающий домен является производным антитела согласно изложенному в предыдущем разделе.

В нацеливании на антиген или распознавании антигена молекулами CAR чаще всего задействуется одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который был собран из моноклонального антитела. Однако альтернативные нацеливающие фрагменты включают лиганды (Altenschmidt et al. (1996) Clin. Cancer Res. 2: 1001-8; Muniappan et al. (2000) Cancer Gene Ther. 7: 128-134), пептиды (Pameijer et al. (2007) Cancer Gene Ther. 14: 91-97), химерные лиганды (Davies et al. (2012) Mol. Med. 18: 565-576), производные рецепторов (Zhang et al. (2012) J Immunol. 189 : 2290-9) и однодоменные антитела (Sharifzadeh et al. (2012) Cancer Res. 72: 1844-52). Любое необходимое антитело или его фрагмент, которое специфически распознает и связывает целевой антиген, в частности изоформы HLA-G, как определено выше, может быть включено в CAR согласно изобретению.

В одном из вариантов осуществления такой антигенсвязывающий домен представляет собой антитело, предпочтительно одноцепочечное антитело. В предпочтительном варианте осуществления данное антитело представляет собой гуманизированное антитело или негуманизированное мышиное антитело. В частности, такой антигенсвязывающий домен представляет собой фрагмент антитела, выбранный из антигенсвязывающих фрагментов (Fab), фрагментов F(ab')₂, фрагментов Fab', фрагментов Fv, фрагментов рекомбинантного IgG (rlgG), фрагментов одноцепочечных антител, одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv), фрагментов однодоменных антител (например, sdAb, sdFv, нанотело), диатела и

мультиспецифических антител, образованных из фрагментов антител. В отдельных вариантах осуществления антитела представляют собой одноцепочечные фрагменты антител, содержащие вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи, такую как scFv. В частности, такой антигенсвязывающий домен выбран из Fab и scFv.

5 Фрагменты антител могут быть получены различными способами, включая, но не ограничиваясь, протеолитическое расщепление интактного антитела, а также продуцирование рекомбинантными клетками-хозяевами. В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой полученные рекомбинантным путем фрагменты, такие как фрагменты, содержащие структуры, которые не встречаются в естественном виде, например, структуры с
10 двумя или более областями или цепями антитела, соединенными синтетическими линкерами, например пептидными линкерами, и/или которые не могут быть получены в результате расщепления энзимами интактных антител естественного происхождения. В некоторых аспектах настоящего изобретения фрагменты антител представляют собой scFv.

В вариантах осуществления, в которых домен, нацеленный на антиген, представляет
15 собой scFv, данный scFv может быть получен из областей вариабельной тяжелой цепи (VH) и вариабельной легкой цепи (VL) антиген-специфического mAb присоединенного гибким линкером. ScFv сохраняет ту же специфичность и сходную аффинность, что и полноразмерное антитело, из которого он был получен (Muniappan et al. (2000) Cancer Gene Ther. 7: 128-134). Можно использовать различные методы получения scFv, включая способы, описанные в
20 патентах США 4694778; Bird et al. (1988) Science 242: 423-442; Ward et al. (1989) Nature 334: 54454; и Skerra et al. (1988) Science 242: 1038-1041. В некоторых вариантах осуществления scFv может быть гуманизированным или полностью человеческим scFv.

Антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с определенной
изоформой HLA-G, может перекрестно реагировать с родственными антигенами, например, с
25 от одной до пяти, предпочтительно от двух до четырех других изоформ HLA-G.

В некоторых аспектах настоящего изобретения антигенсвязывающий домен может быть
получен из антитела или его фрагмента, которое имеет одну или более определенных
функциональных характеристик, таких как способности к связыванию, включая связывание с
определенными эпитопами, такими как эпитопы, сходные или идентичные эпитопам других
30 антител, способность конкурировать за связывание с другими антителами и/или определенную
аффинность связывания. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен,
содержащие его CAR, и клетки, содержащие такие CAR, проявляют предпочтение к
связыванию целевых клеток, экспрессирующих антигены, по сравнению с целевыми клетками,

не экспрессирующими антигенами. В некоторых вариантах осуществления предпочтение для связывания наблюдается там, где количественно зафиксирована значительно большая степень связывания с антигенэкспрессирующими клетками по сравнению с неэкспрессирующими клетками. В некоторых случаях общий количественный показатель наблюдаемого связывания с целевым антигеном или с антигенэкспрессирующими клетками по меньшей мере равен или превышает связывание, наблюдаемое у неантигенспецифических доменов, CAR или клеток. В любом из представленных вариантов осуществления сравнение способностей к связыванию, таких как аффинность или конкуренция, может производиться посредством количественных измерений при помощи анализов, известных в данной области, таких как упомянутые выше.

В другом варианте осуществления антигенсвязывающий домен CAR специфически связывает одну или более изоформ HLA-G с константой аффинности K_d , равной по меньшей мере 10^{-6} М. В некоторых аспектах настоящего изобретения антигенсвязывающий домен CAR связывает одну или более изоформ HLA-G с высокой аффинностью, равной по меньшей мере около 10^{-7} М, предпочтительно – по меньшей мере около 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М. В предпочтительном варианте осуществления антигенсвязывающий домен CAR связывает одну или более изоформ HLA-G с аффинностью около 10^{-9} М.

В одном из аспектов антигенсвязывающий фрагмент CAR может специфически связывать HLA-G2 и HLA-G6 и/или изоформы HLA-G1 и HLA-G5, не содержащие $\beta 2M$. При этом антигенсвязывающий фрагмент CAR практически не связывает другие изоформы HLA-G, в особенности изоформы HLA-G1 и HLA-G5, ассоциированные с $\beta 2M$, HLA-G3, HLA-G4 и HLA-G7. Более конкретно, антигенсвязывающий фрагмент CAR является специфичным для изоформ HLA-G, не содержащих $\beta 2M$, и практически не связывает изоформы HLA-G, ассоциированные с $\beta 2M$.

В отдельном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент CAR содержит (i) переменную область тяжелой цепи, которая содержит последовательность с SEQ ID NO: 1 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с SEQ ID NO: 1; и/или (ii) переменную область легкой цепи, содержащую последовательность с SEQ ID NO: 2 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с SEQ ID NO: 2.

В дополнительном отдельном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент CAR содержит (i) тяжелую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 переменной области тяжелой цепи последовательности с SEQ ID NO: 1 и (ii) легкую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 переменной области легкой цепи последовательности с ИД. № ПОСЛЕД. 2.

В другом отдельном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент CAR содержит (i) тяжелую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащие последовательности с SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и (ii) легкую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащие последовательности с SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно, причем каждая CDR опционально может содержать 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены, делеции или вставки.

В еще одном аспекте настоящего изобретения антигенсвязывающий фрагмент CAR может специфически связывать изоформы HLA-G, ассоциированные с $\beta 2M$, такие как изоформы HLA-G1 и HLA-G5. При этом антигенсвязывающий фрагмент CAR практически не связывает другие изоформы HLA-G, в особенности изоформы, не содержащие $\beta 2M$, такие как HLA-G2, HLA-G3, HLA-G4, HLA-G6 и HLA-G7. В данном контексте антигенсвязывающий фрагмент CAR практически не связывает изоформы HLA-G1 и HLA-G5, не содержащие $\beta 2M$.

В отдельном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент CAR содержит (i) переменную область тяжелой цепи, которая содержит последовательность с SEQ ID NO: 3 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с SEQ ID NO: 3; и/или (ii) переменную область легкой цепи, содержащую последовательность с SEQ ID NO: 4 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с SEQ ID NO: 4.

В дополнительном отдельном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент CAR содержит (i) тяжелую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 переменной области тяжелой цепи последовательности с SEQ ID NO: 3 и (ii) легкую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 переменной области легкой цепи последовательности с SEQ ID NO: 4.

В еще одном отдельном конкретном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент CAR содержит (i) тяжелую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащие последовательности с SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно, и (ii) легкую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащие последовательности с SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно, причем каждая CDR опционально может содержать 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены, делеции или вставки.

В частности, антигенсвязывающий фрагмент CAR не связывает и не распознает все изоформы HLA-G.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий фрагмент CAR не связывает и не распознает домен альфа1 изоформ HLA-G. Это означает, что такой антигенсвязывающий фрагмент может распознавать изоформы HLA-G, не содержащие домен альфа-1, например

такие изоформы HLA-G, как описанные в Tronik-Le Roux et al., *Molecular Oncology* 11 (2017) 1561-1578, которые содержат домены альфа2 и альфа3 или только домен альфа3. К примеру, такой антигенсвязывающий фрагмент может связывать домен альфа2, альфа3 или β 2M.

В отдельном варианте осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой мультиспецифический антигенсвязывающий домен, предпочтительно – биспецифический антигенсвязывающий домен. К примеру, биспецифический антигенсвязывающий фрагмент содержит домен, который распознает свободные изоформы HLA-G, не содержащие β 2M, и второй домен, который распознает изоформы HLA-G, ассоциированные с доменом β 2M. Еще более предпочтительно – биспецифический антигенсвязывающий домен содержит один домен, который специфически связывает HLA-G2 и HLA-G6 и/или изоформы HLA-G1 и HLA-G5, не содержащие β 2M, и другой домен, который специфически связывает изоформы HLA-G1 и HLA-G5, ассоциированные с β 2M. В предпочтительном варианте осуществления биспецифический антигенсвязывающий фрагмент происходит как из антитела LFTT-1 с CDR, описанными выше (SEQ ID NO: 5-10), так и из антитела 15E7 с CDR, описанными выше (SEQ ID NO: 11-16).

В отдельном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент CAR представляет собой биспецифический антигенсвязывающий домен, который содержит: (i) домен, содержащий CDR 1, 2 и 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащие последовательности с SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно, (ii) домен, содержащий CDR 1, 2 и 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащие последовательности с SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно, (iii) домен, содержащий CDR 1, 2 и 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащие последовательности с SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, а также (iv) домен, содержащий CDR 1, 2 и 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащие последовательности с SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно, причем каждая CDR опционально может содержать 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены, делеции или вставки.

Такой биспецифический антигенсвязывающий домен, подходящий для CAR, может, например, представлять собой тандем scFv или нанотел (De Munter et al., *Molecular Sciences* 2018).

В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий домен содержит scFv, содержащий последовательности CDR моноклонального антитела к HLA-G. CDR могут быть определены с помощью общепринятых методов. Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR или FR могут быть легко определены при помощи любой из ряда хорошо известных схем, включая схемы, описанные Kabat et al. (1991),

«Последовательности белков, представляющих иммунологический интерес», 5-е изд. Служба общественного здравоохранения, Национальные институты здравоохранения, Бетесда, штат Мэриленд (схема нумерации “Kabat”), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 (схема нумерации “Chothia”), MacCallum et al., J. Mol. Биол. 262:732-745 (1996), «Взаимодействия «антитело-антиген»: контактный анализ и топография сайта связывания», J. Mol. Биол. 262, 732-745 (Схема нумерации “Contact”), Lefranc MP et al., «Уникальная нумерация IMGT для переменных доменов рецепторов иммуноглобулинов и Т-клеток, а также V-подобных доменов суперсемейства Ig», Dev Comp Immunol, 2003 January; 27(1):55-77 (схема нумерации «IMGT»), и Honegger A и Pluckthun A, «Еще одна схема нумерации для переменных доменов иммуноглобулина: инструмент автоматического моделирования и анализа», J Mol Biol, 2001, 8 июня; 309(3):657-70, (схема нумерации “Aho”).

В особых вариантах реализации антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). ScFv может также содержать пептидный линкер. Пептидный линкер, соединяющий домены V_H и V_L фрагмента scFv, соединяет карбоксильный конец домена одной переменной области с аминоконцом домена другой переменной области без ущерба для правильности строения участков связывания V_H-V_L и антигенсвязывающих участков. Пептидные линкеры могут иметь длину от 10 до 30 аминокислот. В одном из вариантов осуществления пептидный линкер фрагмента scFv представляет собой линкер Gly/Ser и содержит один или более повторов аминокислотной последовательности Gly-Gly-Gly-Ser или Gly-Gly-Gly-Gly-Ser. В одном из вариантов осуществления гибкий полипептидный линкер включает в себя, но не ограничивается $(Gly_3Ser)_3$ и $(Gly_4Ser)_3$.

Трансмембранный и шарнирный домены

Шарнирный домен

При взаимодействии Т-клетки с антигенпрезентирующей клеткой образуется иммунологический синапс с межмембранным расстоянием около 15 нм. Это расстояние обусловлено архитектурой ТКР и комплекса пептид-ГКТС. Данное пространственное разделение важно для эффективного запуска каскада фосфорилирования и активации Т-клеток. При искусственном укорачивании этот белок получает возможность оставаться в синапсе, что приводит к подавлению сигналов активации.

С учетом того, что положение эпитопа, распознаваемого конкретным scFv на поверхности клетки-мишени, обычно является фиксированным, длину и жесткость внеклеточного спейсера (шарнирного модуля) в CAR необходимо отрегулировать для

обеспечения максимальной пространственной совместимости с scFv и формирования компактного синапса. В некоторых аспектах настоящего изобретения часть константной области иммуноглобулина служит в качестве спейсерной области между антигенсвязывающим доменом, например, scFv, и трансмембранным доменом. Спейсер может иметь длину, которая

5 обеспечивает повышенную чувствительность клетки после связывания антигена по сравнению с отсутствием спейсера. В предпочтительном варианте осуществления спейсерный домен имеет последовательность, которая способствует связыванию CAR с антигеном и усиливает передачу сигналов в клетке. Примеры аминокислоты, которая, как предполагается, будет способствовать связыванию, включают цистеин, заряженную аминокислоту, серин и треонин

10 на потенциальном участке гликозилирования, и данные аминокислоты могут быть использованы в качестве аминокислоты, образующей спейсерный домен.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит шарнирную последовательность между антигенсвязывающим и трансмембранным доменами и/или между трансмембранным и цитоплазматическим доменами. Шарнирный домен может включать в себя до 150

15 аминокислот, предпочтительно от 10 до 100 аминокислот, еще более предпочтительно – от 50 до 100 аминокислот в длину. Для обычного специалиста в данной области очевидно, что шарнирная последовательность представляет собой короткую последовательность аминокислот, которая способствует гибкости структуры (см., к примеру, Woof et al, Nat. Rev. Immunol, 4 (2): 89-99 (2004)). Шарнирная последовательность может представлять собой

20 любую подходящую последовательность, происходящую или полученную из любой подходящей молекулы. В некоторых вариантах осуществления длина шарнирной последовательности может быть оптимизирована исходя из расстояния между CAR и связывающим эпитопом, например, более длинные шарниры могут быть оптимальными для ближайших эпитопов мембраны.

Шарнир может быть производным или включать в себя по крайней мере часть области Fc иммуноглобулина, например, область Fc IgG1, область Fc IgG2, область Fc IgG3, область Fc IgG4, область Fc IgE, область Fc IgM или область Fc IgA. В некоторых вариантах осуществления шарнирный домен включает в себя по крайней мере часть области Fc иммуноглобулина IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM или IgA, которая приходится на его домены

30 CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления спейсерный домен может также включать в себя по крайней мере часть соответствующей шарнирной области иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления шарнир является производным или включает в себя по крайней мере часть модифицированной области Fc иммуноглобулина, например,

модифицированную область Fc IgG1, модифицированную область Fc IgG2, модифицированную область Fc IgG3, модифицированную область Fc IgG4, модифицированную область Fc IgE, модифицированную область Fc IgM или модифицированную область Fc область IgA. Модифицированная область Fc иммуноглобулина
5 может иметь одну или более мутаций (например, точечные мутации, вставки, делеции, дупликации), которые приводят к одной или нескольким аминокислотным заменам, модификациям или делециям, которые вызывают нарушение связывания спейсерного домена с рецептором Fc (FcR). В некоторых аспектах модифицированная область Fc иммуноглобулина может быть сконструирована с одной или несколькими мутациями, которые
10 приводят к одной или нескольким аминокислотным заменам, модификациям или делециям, вызывающим нарушение связывания спейсерного домена с одним или несколькими FcR, включая, помимо прочих, FcyRI, FcyR2A, FcyR2B1, FcyR2B2, FcyR3A, FcyR3B, FcsRI, FcsR2, FcaRI, Fca/ μ K или FcRn.

Примеры шарниров включают, но не ограничиваются ими: шарнир CD8a, шарнир CD28,
15 последовательности IgG1/IgG4 (фрагмент шарнир Fc) (в отдельных исследованиях – CD4, CD7 и IgD), шарнир IgG4 в отдельности, шарнир IgG4, связанный с CH2 и домены CH3 или шарнир IgG4, связанные с доменом CH3, описанные в Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153, international patent application publication number WO2014031687, U.S. Pat. No. 8,822,647 или опубликованное приложение № US2014/0271635. Что касается шарнирного домена, настоящее
20 изобретение относится ко всем или части остатков CD8a с 118 по 178 (номер доступа в GenBank NP_001759.3), остаткам CD8 с 135 по 195 (номер доступа GenBank AAA35664), остаткам CD4 с 315 по 396 (номер доступа в GenBank NP_000607.1) или остаткам CD28 с 137 по 152 (номер доступа в GenBank NP_006130.1). Также в качестве спейсерного домена может быть использована часть константной области тяжелой цепи или легкой антитела (область CH1
25 или CL). Кроме того, спейсерный домен может представлять собой искусственно синтезированную последовательность. В частности, CAR по изобретению содержит шарнир, выбранный из последовательностей CD8a, CD28 и IgG1/IgG4 (фрагмент шарнир Fc) (в отдельных исследованиях – CD4, CD7 и IgD). Данный выбор основывается на том факте, что эти последовательности являются относительно нейтральными, пластичными и хорошо
30 изучены в плане структуры.

В предпочтительном варианте осуществления шарнирный домен содержит или включает в себя (i) шарнир CD28, (ii) шарнир CD8 альфа, (iii) шарнирный домен IgG4 человека, (iv) шарнирный домен IgG4 человека и домен CH3 IgG4 человека или (v) мутированный домен CH2

IgG4 человека, шарнирный домен IgG4 человека и шарнирный домен CH3 IgG4 человека. Еще более предпочтительно – шарнирная область содержит или включает в себя последовательности с: (a) SEQ ID NO: 18, (b) SEQ ID NO: 19, (c) SEQ ID NO: 25, (d) SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 27, или (e) SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с вышеуказанными.

В одном из вариантов осуществления шарнирный домен содержит или включает в себя: (i) шарнирный домен IgG4 человека, (ii) шарнирный домен IgG4 человека и домен CH3 IgG4 человека или (iii) мутированный домен CH2 IgG4 человека, шарнирный домен IgG4 человека и шарнирный домен CH3 IgG4 человека. В частности, шарнирный домен последовательно содержит или включает с себя от N-конца до С-конца: (i) шарнирный домен IgG4 человека, (ii) мутированный домен CH2 IgG4 человека, шарнирный домен IgG4 человека и шарнирный домен CH3 IgG4 человека.

В одном из вариантов осуществления CAR по изобретению содержит спейсерный домен, который содержит или включает в себя шарнирный домен IgG4 человека, который содержит или включает в себя последовательность с SEQ ID NO: 25 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней.

В другом варианте осуществления CAR по изобретению содержит спейсерный домен, который содержит или включает в себя: (i) домен CH3 IgG4 человека, который содержит или включает в себя последовательность с SEQ ID NO: 27 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней, и (ii) шарнирный домен IgG4 человека, который содержит или включает в себя последовательность с SEQ ID NO: 25 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней.

В одном из вариантов осуществления CAR по изобретению дополнительно содержит мутированный домен CH2 IgG4 человека, в котором мутация в домене CH2 IgG4 человека включает в себя мутацию аминокислот EFLG(113-116)PVA и N177Q, например, как описано в Watanabe et al. *Oncoimmunology*. 2016;5(12):e1253656. В предпочтительном варианте осуществления мутированный домен CH2 IgG4 человека содержит последовательность с SEQ ID NO: 26 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней.

В предпочтительном варианте осуществления CAR по изобретению содержит шарнирный домен, который последовательно содержит или состоит из (i) мутированного

домена CH2 IgG4 человека, содержащего или состоящего из последовательности с SEQ ID NO: 26 или последовательности, имеющей по меньшей мере 80, 85, 90, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней, (ii) домена CH3 IgG4 человека, который содержит или состоит из последовательности с SEQ ID NO: 27 или последовательности, имеющей по меньшей мере 80, 85, 90, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней, и (iii) шарнирного домена IgG4 человека, который содержит или состоит из последовательности с SEQ ID NO: 25 или последовательности, имеющей по меньшей мере 80, 85, 90, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности с ней. .

В частности, CAR по изобретению содержит шарнирный домен CD8a, в предпочтительном варианте осуществления содержащий или состоящий из последовательности с SEQ ID NO: 18 или последовательности, имеющей по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ней.

Другой конкретный CAR по изобретению содержит шарнирный домен CD28, предпочтительно содержащий или состоящий из последовательности с SEQ ID NO: 19 или последовательности, имеющей по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ней.

Трансмембранный домен

Трансмембранный модуль служит для фиксации рецептора на поверхности клетки. Что касается трансмембранного домена, CAR может быть сконструирован таким образом, чтобы содержать трансмембранный домен, слитый с антигенсвязывающим доменом CAR. В частности, CAR может быть сконструирован таким образом, чтобы содержать трансмембранный домен, слитый как с антигенсвязывающим доменом, так и с эндодоменом CAR.

В одном из вариантов осуществления используется трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен может быть выбран или модифицирован посредством аминокислотной замены для того, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же самых или других белков поверхностной мембраны для минимизации взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса. Трансмембранный домен может быть получен из естественного или искусственного источника. Если источник является естественным, домен может быть производным любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Обычно трансмембранный домен представляет собой одиночную трансмембранную спираль трансмембранного белка, также известного как интегральный белок. Данный домен обычно включает в себя трансмембранные последовательности CD3ζ,

CD28, CD8, FcRI γ и, реже, CD4, CD7, OX40 и ГКГС (H2-Kb), выбор зависит от соседнего спейсера и внутриклеточных последовательностей. Трансмембранные модули, основанные на CD3 ζ и FcRI γ обеспечивают эффективное включение CAR в эндогенный ТКР. К примеру, в WO 2008/045437 описывается CAR, имеющий трансмембранную часть, полученную из альфа CD8 или CD28 человека, и, в частности, белки химерного Т-клеточного рецептора с немодифицированной шарнирной областью CD8 с аминокислотными позициями 135-205, 135-203 или 135-182 (согласно нумерации аминокислот UniProtKB/Swiss-Prot P01732), каждый из которых содержит остатки цистеина на позициях 164 и 181. В WO 95/30014 используется немодифицированная шарнирная область CD8 мыши с аминокислотными позициями 132–191 (согласно нумерации аминокислот UniProtKB/Swiss-Prot P01731), содержащая остаток цистеина на позиции 178. В частности, в US 2008/0260738 используются модифицированные шарнирные области CD8 с аминокислотными позициями с 131 по 170 или с 136 по 169 (согласно нумерации аминокислот UniProtKB/Swiss-Prot P01731), где цистеин на позиции 164 замещен серином. Следовательно, специалисту в данной области должно быть известно, какой трансмембранный домен следует выбрать в соответствии с характеристиками доменов CAR.

Могут быть использованы трансмембранные области, предназначенные для особого использования в настоящем изобретении, которые могут быть производными (т.е. по крайней мере содержать трансмембранную область(и)) следующих фрагментов: CD28, CD3 ϵ , CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, TCR α , TCR β , H2-Kb, Fc γ RI, GITR или CD3 ζ и/или трансмембранных областей, содержащих их функциональные варианты, такие как те, которые сохраняют значительную часть структурных, например, трансмембранных свойств. См., к примеру, Kahlon et al. (2004) *Cancer Res.* 64:9160-9166; Schambach et al. (2009) *Methods Mol. Biol.* 506: 191-205; Jensen et al. (1998) *Biol. Blood Marrow Transplant* 4:75-83; Patel et al. (1999) *Gene Ther.* 6:412; Song et al. (2012) *Blood* 119:696- 706; Carpenito et al. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:3360-5; Hombach et al. (2012) *Oncoimmunology* 1 :458-66) and Geiger et al. (2001) *Blood* 98:2364-71.

В альтернативном варианте трансмембранный домен может быть синтетическим, и в этом случае он будет содержать преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В предпочтительном варианте осуществления триплет фенилаланина, триптофана и валина будет находиться на каждом конце синтетического трансмембранного домена. Трансмембранный домен по изобретению термодинамически стабилен в мембране. Это может быть одиночная альфа-спираль, трансмембранный бета-баррель, бета-спираль грамицидина А или какая-либо иная структура.

В качестве опции короткий олиго- или полипептидный линкер, предпочтительно длиной от 2 до 10 аминокислот, может образовывать связь между трансмембранным доменом и внутриклеточным сигнальным доменом(ами) CAR. Дуплет «глицин-серин» может обеспечить подходящий линкер.

5 В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен CAR выбран из трансмембранных доменов CD3 ζ , CD28, CD8, FcRI γ , CD4, CD7, OX40 и ГКГС (H2-Kb). В предпочтительном варианте осуществления трансмембранный домен CAR по изобретению выбран из трансмембранных доменов CD8 и CD28. Еще более предпочтительно трансмембранный домен CAR по изобретению представляет собой трансмембранный домен
10 CD28, предпочтительно содержащий или состоящий из последовательности с SEQ ID NO: 20 или последовательности, имеющей по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ней.

Внутриклеточный домен

В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический или внутриклеточный
15 сигнальный домен, такой как домен, полученный из ζ -цепи Т-клеточного рецептора, используется в качестве по крайней мере фрагмента химерного рецептора для отправки стимулирующих сигналов для пролиферации Т-лимфоцитов и эффекторной функции после взаимодействия химерного рецептора с целевым антигеном.

Роль сигнального модуля CAR заключается в передаче сигнала активации иммунной
20 клетке, как только внеклеточный домен распознает антиген. В Т-клетках активация начинается с фосфорилирования иммунорецепторного тирозинового мотива активации (ITAM) в цитоплазматической части субъединицы CD3 ζ комплекса ТКР. Таким образом, в большинстве разработок CAR, реализованных на сегодняшний день, сигнальные последовательности от CD3 ζ используются в качестве модуля, который запускает литическую активность клетки.

25 CAR первого поколения, содержащие только цепь CD3 ζ , посылали в клетку исключительно сигнал активации. Это привело к цитотоксической реакции против опухолевых клеток, но не привело к усилению пролиферации Т-клеток, активированных рецепторами CAR. В принципе, сигнал о пролиферации потенциально может быть обеспечен нативными корецепторами, присутствующими на Т-клетках CAR; однако многие опухоли не
30 экспрессируют соответствующие лиганды. Таким образом, CAR второго поколения содержат цитоплазматический домен, дополнительно содержащий костимулирующий домен CD28, слитый вместе с CD3 ζ , чтобы преодолеть это препятствие. Данная конструкция CAR обеспечивает отправку Т-клетке как сигнала активации, так и сигнала пролиферации; в

результате данная клетка активируется, разрушает клетку-мишень и пролиферирует. Помимо CD28, в CAR были успешно протестированы сигнальные последовательности костимулирующих рецепторов, такие как CD134 (TNFRSF4, OX40), CD154 (CD40L), CD137 (4-1BB), ICOS (CD278), CD27, CD244 (2B4).

5 Третье поколение CAR основывается на сочетании двух или более костимулирующих последовательностей (таких как 4-1BB-CD28-CD3 ζ). Эти рецепторы секретируют более широкий спектр цитокинов (включая TNF α , GM-CSF и IFN γ), менее восприимчивы к гибели клеток, вызванной активацией, и демонстрируют более высокую эффективность в уничтожении опухолей на мышинных моделях. Могут быть использованы один или более
10 эндодоменов, поскольку так называемые CAR третьего поколения имеют по меньшей мере 2 или 3 сигнальных домена, слитых вместе, например, для аддитивного или синергетического эффекта.

CAR по изобретению может представлять собой CAR первого поколения, второго поколения или третьего поколения, как описано выше. В предпочтительном варианте
15 реализации CAR представляет собой CAR второго или третьего поколения. Еще более предпочтительно – CAR представляет собой CAR третьего поколения при экспрессировании Т-клеткой, и CAR первого поколения – при экспрессировании NK- или NKT-клеткой.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный эндодомен передает сигнал в клетку, когда присутствующий в этой же молекуле домен, нацеленный на
20 внеклеточный антиген, связывается с антигеном.

Активация Т-клеток передается двумя различными типами цитоплазматических сигнальных эндодоменов, то есть последовательностью для инициации антигензависимой первичной активации через комплекс ТКР (первичный цитоплазматический сигнальный эндодомен) и последовательностью для действия независимо от антигена для обеспечения
25 вторичного или костимулирующего сигнала (вторичный цитоплазматический сигнальный эндодомен или костимулирующий эндодомен). Следовательно, хотя некоторые варианты осуществления охватывают только CAR с первичным цитоплазматическим сигнальным эндодоменом, в других вариантах осуществления CAR по изобретению включает в себя первичный сигнальный эндодомен и вторичный цитоплазматический сигнальный эндодомен.

30 Внутриклеточный сигнальный домен CAR по изобретению запускает или вызывает активацию по меньшей мере одной из нормальных эффекторных функций иммунной клетки, в которую помещен CAR. Термин «эффекторная функция» относится к специализированной функции клетки. Эффекторной функцией Т-клетки может быть, например, цитолитическая

активность или вспомогательная активность, включая секрецию цитокинов. Хотя обычно может использоваться весь внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях нет необходимости использовать всю цепь. В той мере, в которой используется усеченная часть внутриклеточного сигнального домена, такая усеченная часть может использоваться вместо интактной цепи до тех пор, пока она передает сигнал эффекторной функции. Таким образом, термин «внутриклеточный сигнальный домен» включает в себя любую усеченную часть внутриклеточного сигнального домена, достаточную для передачи сигнала эффекторной функции.

Примеры последовательностей внутриклеточного домена, которые особым образом используются в настоящем изобретении, включают последовательности, полученные из внутриклеточного сигнального домена рецепторной цепи лимфоцитов, комплексного белка TCR/CD3, субъединицы рецептора Fc, субъединицы рецептора IL-2, CD3 ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD66d, CD278 (ICOS), Fc ϵ RI, DAP10 и DAP12. Особенно предпочтительно, чтобы внутриклеточный сигнальный домен в CAR по изобретению содержал цитоплазматическую сигнальную последовательность, полученную из CD3 ζ . В частности, примеры ITAM включают остатки CD3 с 51 по 164 (номер доступа в GenBank NP_932170), остатки Fc ϵ RI γ с 45 по 86 (номер доступа в GenBank NP_004097), остатки Fc ϵ RI с 201 по 244 (номер доступа в GenBank NP_000130), остатки CD3 γ с 139 по 182 (номер доступа в GenBank NP_000064), остатки CD35 с 128 по 171 (номер доступа в GenBank NP_000723), остатки CD3 с 153 по 207 (номер доступа в GenBank NP_000724), остатки CD5 с 402 по 495 (номер доступа в GenBank NP_055022), остатки CD22 с 707 по 847 (номер доступа в GenBank NP_001762), остатки CD79a с 166 по 226 (номер доступа в GenBank NP_001774), остатки CD79b с 182 по 229 (номер доступа в GenBank NP_000611) и остатки CD66d с 177 по 252 (номер доступа в GenBank NP_001806), а также их варианты. Указанные остатки основываются на информации об аминокислотных последовательностях из GenBank и о полной длине предшественника (включая последовательность сигнального пептида и т. д.) каждого белка. Предпочтительные примеры внутриклеточных сигнальных доменов для использования в CAR по настоящему изобретению включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (ТКР) и корецепторов, которые действуют совместно для инициирования передачи сигнала после взаимодействия с антигенным рецептором, а также любое производное или вариант данных последовательностей и любой синтетической последовательности, которое имеет такие же функциональные возможности.

В предпочтительном варианте осуществления цитоплазматический домен CAR может быть сконструирован таким образом, чтобы он содержал сигнальный домен CD3 ζ в отдельности или в комбинации с каким-либо другим необходимым цитоплазматическим доменом(ами), применимым в контексте CAR по изобретению. В одном отдельном аспекте

5 CAR по изобретению содержит сигнальный домен CD3 ζ , предпочтительно содержащий или состоящий из последовательности с SEQ ID NO: 22 или последовательности, имеющей по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ней.

Цитоплазматический домен CAR может содержать участок цепи CD3 ζ и костимулирующую сигнальную область. Костимулирующая сигнальная область относится к

10 участку CAR, содержащему внутриклеточный домен костимулирующей молекулы.

Примеры костимулирующих молекул, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают молекулу ГКГС I класса, белки рецептора TNF (фактора некроза опухоли), иммуноглобулиноподобные белки, рецепторы цитокинов, интегрин, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы NK-клеток,

15 рецептор Toll-лиганда, B7-H3, BAFFR, BTLA, BLAME (SLAMF8), CD2, CD4, CD5, CD7, CD8a, CD8, CD11a, LFA-1 (CD11a/CD18), CD11b, CD11c, CD11d, CD18, CD19, CD19a, CD27, CD28, CD29, CD30, CD40, CD49a, CD49D, CD49f, CD69, CD84, CD96 (тактильный), CD100 (SEMA4D), CD103, CRTAM, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), CD160 (BY55), SELPLG (CD162), DNAM1 (CD226), Ly9 (CD229), SLAMF4 (CD244, 2B4), ICOS

20 (CD278), CEACAM1, CDS, CRTAM, DAP10, GADS, GITR, HVEM (LIGHTR), IA4, ICAM-1, IL2R β , IL2R γ , IL7Ra, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB1, ITGB2, ITGB7, KIRDS2, LAT, LFA-1, LIGHT, LTBR, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), PAG/Cbp, PD-1, PSGLI, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAMF7, SLP-76, TNFR2, TRANCE/RANKL, VLA-1, VLA-6, лиганд, который специфически связывается с CD83, и т.п.

25 Стимулирующие лиганды хорошо известны в данной области и включают, помимо прочего, молекулу ГКГС I класса, загруженную пептидом, антитело к CD3, суперагонистическое антитело к CD28 и суперагонистическое антитело к CD2.

В одном из вариантов осуществления внутриклеточные сигнальные домены содержат по меньшей мере один внутриклеточный домен, выбранный из следующих доменов:

30 внутриклеточный сигнальный домен рецепторной цепи лимфоцитов, комплексный белок TCR/CD3, субъединица рецептора Fc, субъединица рецептора IL-2, CD3, FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD66d, CD278 (ICOS), Fc ϵ RI, DAP10 и DAP 12.

В одном из вариантов осуществления костимулирующий домен CAR по изобретению выбран из: CD28, CD134 (TNFRSF4, OX40), CD154 (CD40L), CD137 (4-1BB), ICOS (CD278), CD27, CD244 (2B4), CD149, DAP10, CD30, IL2-R, IL7r6, IL21-R, NKp30, NKp44, CD27 и DNAM-1. Эти разные костимулирующие домены продуцируют разные профили цитокинов, которые, в свою очередь, могут оказывать влияние на цитотоксичность, опосредованную клетками-мишенями, и микроокружение опухоли. В частности, костимулирующий домен является слитым воедино с CD3 ζ . В одном из вариантов осуществления костимулирующий домен CAR по изобретению выбран из CD28, 4-1BB и OX40.

Несмотря на то, что в CAR по настоящему изобретению может быть использован любой подходящий эндодомен, в некоторых вариантах осуществления изобретение конкретно предполагает использование всех или части эндодоменов 4-1BB и CD3 ζ в качестве внутриклеточного домена. Цитоплазматические сигнальные последовательности в составе внутриклеточного сигнального домена CAR по изобретению могут быть связаны друг с другом в случайном или заданном порядке. В CAR, содержащем более одного внутриклеточного эндодомена, олигопептидный линкер, как описано выше, или полипептидный линкер, может быть вставлен между внутриклеточными эндодоменами для связывания доменов. Опционально короткий олиго- или полипептидный линкер, предпочтительно длиной от 2 до 10 аминокислот, может образовывать связь. Дублет «глицин-серин» или непрерывная последовательность обеспечивает особенно подходящий линкер. В частности, пептидный линкер может представлять собой линкер (Gly)₃-Ser или какую-либо его копию, такую как его дубликаты или триплеты.

В контексте настоящего документа термин «костимулирующая сигнальная область 4-1BB» относится к конкретному фрагменту белка, связанному с этим названием, и к любым другим молекулам, обладающим аналогичной биологической функцией, аминокислотная последовательность которых по меньшей мере на 70% или в альтернативном варианте – по меньшей мере на 80%, предпочтительно – по меньшей мере на 90%, более предпочтительно – по меньшей мере на 95% идентична последовательности костимулирующей сигнальной области 4-1BB с SEQ ID NO: 21. Примеры последовательностей костимулирующей сигнальной области 4-1BB представлены в US 20130266551A1.

Примеры последовательностей костимулирующего сигнального домена CD28 представлены в Патенте США № 5686281; Geiger, T. L. et al., Blood 98: 2364-2371 (2001); Hombach A. et al., J Immunol 167: 6123-6131 (2001); Maher J. et al. Nat Biotechnol 20: 70-75

(2002); Haynes N. M. et al., J Immunol 169: 5780-5786 (2002); Haynes N. M. et al., Blood 100: 3155-3163 (2002).

Неограничивающие примеры последовательностей костимулирующей сигнальной области OX40 раскрыты в US 2012/20148552 A1.

5 В отдельном варианте осуществления CAR по изобретению содержит костимулирующую сигнальную область 4-1BB, предпочтительно содержащую или состоящую из последовательности с SEQ ID NO: 21 или последовательности, имеющей по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ней.

Сигнальный пептид

10 Помимо домена, нацеленного на антиген, шарнирного домена, трансмембранного домена и сигнального эндодомена, CAR по изобретению может дополнительно содержать последовательность сигнального пептида, связанную с N-концом CAR. Последовательности сигнальных пептидов имеются на N-конце многих секреторных и мембранных белков и обычно имеют длину от 15 до 30 аминокислот. Поскольку многие из упомянутых выше
15 белковых молекул имеют последовательности сигнальных пептидов, эти сигнальные пептиды можно использовать в качестве сигнального пептида для CAR по настоящему изобретению.

В одном из вариантов осуществления последовательность, содержащая антигенсвязывающий домен, дополнительно содержит сигнальный пептид. В вариантах осуществления, где антигенсвязывающий домен содержит антигенсвязывающий фрагмент,
20 предпочтительно scFv, сигнальный пептид может располагаться на аминоконце антигенсвязывающего фрагмента или scFv. В некоторых вариантах осуществления, если переменная область тяжелой цепи является N-концевой, сигнальный пептид может располагаться на аминоконце переменной области тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления, если переменная область легкой цепи является N-концевой, лидерная
25 последовательность может располагаться на аминоконце переменной области легкой цепи.

Лидерная последовательность может содержать любую подходящую сигнальную последовательность. В одном из вариантов осуществления CAR по изобретению, предпочтительно антитело или антигенсвязывающий фрагмент, еще более предпочтительно – scFv, содержит сигнальный пептид, выбранный из группы, состоящей из следующего: CD8a,
30 сигнального пептида Ig каппа мыши, сигнальный пептид IgG4 человека, сигнальный пептид IL2, сигнальный пептид IgG2 человека и сигнальный пептид люциферазы Gaussia. В одном из вариантов осуществления CAR по изобретению, предпочтительно scFv, содержит сигнальный

пептид, выбранный из группы, состоящей из последовательностей с SEQ ID NO: 17, 24, 75, 76, 77 и 78.

В отдельном варианте осуществления CAR по изобретению содержит сигнальный пептид CD8a, предпочтительно содержащий или состоящий из последовательности с SEQ ID NO: 17 или последовательности, имеющей по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ней.

Расщепляемый линкер

В отдельном варианте осуществления CAR по изобретению дополнительно содержит расщепляемый линкер. Расщепляемый линкер может представлять собой пептид, полипептид или фрагмент полипептида, который расщепляется после образования белка или полипептида, в частности, после трансляции CAR по изобретению.

В частности, расщепляемый линкер представляет собой саморасщепляемый, саморасщепляющийся пептид или линкер. Данные термины используются здесь взаимозаменяемо.

В одном из вариантов осуществления расщепляемый линкер содержит пептид 2A. «2A» или «2A-подобные» последовательности являются частью большого семейства пептидов, которые могут вызывать пропуск в пептидной связи. В частности, недавно было обнаружено, что механизм опосредованного 2A «самоотщепления» заключается в пропуске рибосомой образования пептидной связи «глицил-пролил» на С-конце пептида 2A. Опосредованное пептидом 2A расщепление начинается после трансляции. В результате успешного пропуска и возобновления трансляции образуются два «расщепленных» белка: белок, расположенный выше 2A, присоединяется к полноразмерному пептиду 2A, за исключением С-концевого пролина, а белок, расположенный ниже 2A, присоединяется к одному пролину на N-конце. Успешный пропуск с последующим выпадением рибосомы и прекращением трансляции приводит только к образованию белка, расположенному выше 2A. Несколько пептидов 2A были выявлены в пикорнавирусах, вирусах насекомых и ротавирусах типа С.

Примеры расщепляемого линкера по изобретению включают, но не ограничиваются ими: тешовирус-1 2A (P2A) свиньи, ящур 2A (F2A); вирус ринита А лошадей (ERAV) 2A (E2A); и вирус Thea asigna 2A (T2A), вирус цитоплазматического полиэдроса 2A (BmCPV2A) и вирус флашери 2A (BmIFV2A) или их сочетание, например, такое, которое описано в Kim et al. (2011) PLoS ONE 6(4): e18556 and in Liu et al (2017) Sci Rep. 2017; 7: 2193.

В предпочтительном варианте осуществления расщепляемый линкер представляет собой P2A, который содержит или состоит из последовательности с SEQ ID NO: 28 или последовательности, имеющей по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ней.

В одном из вариантов осуществления N-конец расщепляемого линкера функционально связан с С-концом эндодомена CAR и/или С-конец расщепляемого линкера функционально связан с N-концом репортера.

Репортер

5 По соображениям безопасности, для целей отслеживания или для устранения клеток, экспрессирующих нежелательные модифицированные CAR, конструкция CAR по изобретению может дополнительно содержать селективируемый маркер или репортер. В частности, клетки CAR могут быть сконструированы с саморасщепляющимся линкером для совместной с репортером экспрессии CAR для того, чтобы обеспечить возможность отбора или
10 уничтожения клеток CAR, например, с помощью антител.

В отдельном варианте осуществления N-конец репортера соединен с CAR к HLA-G с помощью расщепляемого линкера, такого как линкер 2A, как описано выше, чтобы обеспечить высвобождение молекулы репортера. Затем репортер может быть использован для подтверждения успешной доставки или экспрессии конструкции CAR в представляющие
15 интерес клетки.

В частности, репортер выбран из группы, состоящей из следующего: тег с-тус, CD20, CD52 (Кэмпас), усеченный EGFR (EGFRt), усеченный CD19 (CD19t) или какая-либо их часть или комбинация, или какая-либо другая молекула-маркер, которая может экспрессироваться и/или обнаруживаться в клетке.

20 В предпочтительном варианте осуществления репортер представляет собой репортер CD19, предпочтительно усеченный репортер CD19 человека (hCD19t), в котором были удалены аминокислоты с позиций 314-556 (т.е. удалено 313 аминокислот). В отдельном варианте осуществления усеченный CD19 человека синтезируется GeneArt содержащим внеклеточные и трансмембранные части CD19 человека (аминокислоты 1-313), известные под
25 номером доступа NP_001171569.1.

В предпочтительном варианте осуществления репортер представляет собой усеченный репортер CD19 человека, который содержит или состоит из последовательности с SEQ ID NO: 28 или последовательности, имеющей по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ней.

Особые CAR по настоящему изобретению

30 В отдельном варианте осуществления CAR по настоящему изобретению содержит сигнальный пептид, предпочтительно сигнальный пептид CD8a; антигенсвязывающий домен, специфичный для одной или нескольких изоформ HLA-G, в частности, предпочтительно scFv, как подробно описано выше; опционально – шарнир, предпочтительно содержащий или

состоящий из следующего: (i) шарнирный домен IgG4 человека, (ii) шарнирный домен IgG4 человека и домен CH3 IgG4 человека или (iii) мутированный домен CH2 IgG4 человека, шарнирный домен IgG4 человека и домен CH3 IgG4 человека или (iv) шарнир CD28 или (v) шарнир CD8a; трансмембранный домен, предпочтительно трансмембранный домен CD28; 5 костимулирующая сигнальная область, предпочтительно выбранная из костимулирующих сигнальных областей CD28, 4-1BB и OX40, более предпочтительно – костимулирующая сигнальная область 4-1BB; и сигнальный домен CD3ζ, а также опционально – расщепляемый линкер, предпочтительно линкер 2A, и репортер, предпочтительно репортер hCD19t.

В одном из вариантов осуществления конструкция CAR представляет собой 10 биспецифическую конструкцию CAR, которая содержит (i) домен, содержащий CDR 1, 2 и 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащие последовательности с SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно, (ii) домен, содержащий CDR 1, 2 и 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащие последовательности с SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно, (iii) домен, содержащий CDR 1, 2 и 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащие последовательности с SEQ ID NO: 5, 6 и 7, 15 соответственно, а также (iv) домен, содержащий CDR 1, 2 и 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащие последовательности с SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно, где опционально каждая CDR может содержать 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены, делеции или вставки.

Более конкретно, CAR по настоящему изобретению может содержать или состоять из 20 полипептидной последовательности с ИД. № ПОСЛЕД. 32, 33, 34, 35, 36, 37, 83 или 85 или последовательности, имеющей не менее 80, 85, 90 или 95% идентичности с последовательностью с SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37, 83 или 85 и имеющей те же функции.

Разновидности CAR

В настоящем разделе описываются функциональные элементы CAR по изобретению, включенные в объем изобретения. Термин «функциональный элемент» применительно к CAR, 25 относится к какой-либо части или фрагменту CAR по изобретению, которая(ый) сохраняет биологическую активность CAR, частью которого он(а) является (родительский CAR). Функциональные элементы включают, например, те части CAR, которые сохраняют способность распознавать антиген или клетки-мишени, или выявлять, лечить или предотвращать заболевание в сходной степени, в равной степени или в большей степени по 30 сравнению с родительским CAR. Что касается родительского CAR, функциональный элемент может содержать, например, около 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90%, 95% или более родительского CAR.

Функциональный элемент может иметь на амино- или карбокси-конце элемента или на обоих концах дополнительные аминокислоты, которые отсутствуют в аминокислотной последовательности родительского CAR. Желательно, чтобы дополнительные аминокислоты не мешали биологической функции, например, распознавать клетки-мишени, выявлять рак, 5 лечить или предотвращать рак и т. п. Более желательно, чтобы дополнительные аминокислоты усиливали биологическую активность по сравнению с биологической активностью родительского CAR.

В настоящем разделе описываются функциональные варианты или биологический эквивалент CAR или антитела по изобретению, включенные в объем изобретения.

10 Функциональный вариант может, например, содержать аминокислотную последовательность родительского полипептида по меньшей мере с одной консервативной аминокислотной заменой. В альтернативном или дополнительном варианте осуществления, функциональные варианты могут содержать аминокислотную последовательность родительского полипептида по меньшей мере с одной неконсервативной аминокислотной заменой. В этом случае 15 предпочтительно, чтобы неконсервативная аминокислотная замена не мешала или не подавляла биологическую активность функционального варианта. Неконсервативная аминокислотная замена может усиливать биологическую активность функционального варианта таким образом, чтобы биологическая активность функционального варианта возрастала по сравнению с родительским полипептидом.

20 Такой биологический вариант (включая его функциональные элементы) может содержать синтетические аминокислоты вместо одной или нескольких аминокислот естественного происхождения.

Такой биологический вариант (включая его функциональные элементы) может быть гликозилирован, амидирован, карбоксилирован, фосфорилирован, этерифицирован, N- 25 ацилирован, циклизован, например, через дисульфидный мостик, или превращен в кислотно-аддитивную соль и/или опционально – димеризован или полимеризован, или конъюгирован.

Такой биологический вариант (включая его функциональные элементы) может быть получен способами, известными в данной области. Полипептиды могут быть получены любым применимым способом получения полипептидов или белков. Применимые методы синтеза 30 полипептидов и белков *de novo* описаны в приведенных источниках, в частности, в Chan et al., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2001 and U.S. Pat. No.

5,449,752. Кроме того, полипептиды и белки могут быть получены рекомбинантным способом с использованием нуклеиновых кислот, описанным в настоящем документе, с помощью стандартных рекомбинантных методов. См., например, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994.

Конструкция нуклеиновой кислоты и векторы для экспрессии CAR

Настоящее изобретение также относится к кодирующей антитело нуклеиновой кислоте, как описано выше, или к нуклеиновой кислоте, кодирующей CAR по изобретению. Такая нуклеиновая кислота может быть трансдуцирована в клетку, в частности, в иммунную клетку для создания клетки, экспрессирующей CAR. В частности, конструкция нуклеиновой кислоты содержит последовательности, кодирующие внешний домен, внутриклеточный домен, трансмембранный домен, опционально – шарнирный домен, а также опционально – расщепляемый линкер, репортер и/или сигнальный пептид, как описано выше.

В одном из вариантов осуществления конструкция нуклеиновой кислоты от N-конца до С-конца последовательно состоит или содержит: опционально – пептидную сигнальную последовательность, антитело к HLA-G или его фрагмент, предпочтительно scFv к HLA-G, спейсерный домен, трансмембранный домен, по меньшей мере один внутриклеточный домен и опционально – расщепляемый линкер и репортер.

В еще одном варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит тег, предпочтительно тег Flag. К примеру, тег Flag содержит или состоит из последовательности с SEQ ID NO: 23, 60 или 79.

В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержит:

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую scFv к HLA-G, как описано выше;

(ii) опционально – последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую шарнир, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из следующего: (i) шарнир CD28, (ii) шарнир CD8 альфа, (iii) шарнирный домен IgG4 человека, (iv) шарнирный домен IgG4 человека и домен CH3 IgG4 человека или (v) мутированный домен CH2 IgG4 человека, шарнирный домен IgG4 человека и шарнирный домен CH3 IgG4 человека;

(iii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую трансмембранный домен, предпочтительно трансмембранный домен CD28;

(iii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую эндодомен, предпочтительно домен 4-1BB и/или домен CD3ζ;

(iv) опционально – расщепляемый линкер, предпочтительно расщепляемый линкер P2A;

(v) опционально – репортер, предпочтительно репортер hCD19t; и/или

5 (vi) опционально – сигнальный пептид, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из следующего: CD8a, сигнальный пептид Ig каппа мыши, сигнальный пептид IgG4 человека и сигнальный пептид IL2.

В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержит:

10 (i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HCDR1, HCDR2 и HCDR, с SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, например SEQ ID NO: 42, 43 и 44 соответственно; а также

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, с SEQ ID NO: 8, 9 и 10 соответственно, например SEQ ID NO: 45, 46 и 47 соответственно.

В альтернативном варианте конструкция нуклеиновой кислоты содержит:

15 (i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HCDR1, HCDR2 и HCDR 3, с SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно, например SEQ ID NO: 48, 49 и 50 соответственно, и

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую LCDR1, LCDR2 и LCDR3, с SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно, например SEQ ID NO: 51, 52 и 53 соответственно.

В отдельном варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержит или в основном состоит из следующих последовательностей:

20 (i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность с SEQ ID NO: 1 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с SEQ ID NO: 1, например SEQ ID NO: 38;

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность с SEQ ID NO: 2 или последовательность, имеющую не менее 80, 85, 90 или 95% идентичности с SEQ ID NO: 2, например SEQ ID NO: 39;

25 (iii) опционально – последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательности с SEQ ID NO: (a) 18, (b) 19, (c) 25, (d) 25 и 27, или (e) 25, 26 и 27, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ними, например последовательности с SEQ ID NO: (a) 55, (b) 56, (c) 62, (d) 62 и 64, или (e) 62, 63 и 64

30 соответственно;

(iv) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая трансмембранный домен, предпочтительно трансмембранный домен CD28, еще более предпочтительно – последовательность с SEQ ID NO: 57 или 80;

(v) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая эндодомен, предпочтительно домен 4-1BB, например, последовательность с SEQ ID NO: 58 или 81, и/или эндодомен CD3ζ, например последовательность с SEQ ID NO: 59 или 82, предпочтительно – домен 4-1BB и эндодомен CD3ζ;

5 (vi) опционально – последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая расщепляемый линкер, предпочтительно расщепляемый линкер P2A, еще более предпочтительно – кодирующая последовательность SEQ ID NO. 28 или последовательность, имеющую не менее 80, 85, 90 или 95% идентичности с ИД. № ПОСЛЕД. 28, например ИД. № ПОСЛЕД. 65;

10 (vii) опционально – последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая репортер, предпочтительно репортер hCD19t, еще более предпочтительно – кодирующая последовательность SEQ ID NO. 29 или последовательность, имеющую не менее 80, 85, 90 или 95% идентичности с ИД. № ПОСЛЕД. 29, например ИД. № ПОСЛЕД. 66;

(viii) опционально – последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая сигнальный пептид, предпочтительно сигнальный пептид CD8 α, более предпочтительно – последовательность SEQ ID NO. 54 или 61.

В еще одном варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую тег, предпочтительно тег Flag, например последовательность SEQ ID NO. 23 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ней.

В еще одном отдельном варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты содержит или в основном состоит из следующих последовательностей:

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность SEQ ID NO. 3 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ИД. № ПОСЛЕД. 3; например, ИД. № ПОСЛЕД. 40; и/или

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность SEQ ID NO. 4 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ИД. № ПОСЛЕД. 4; например, ИД. № ПОСЛЕД. 41;

(iii) опционально – последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательности с SEQ ID NO: (a) 18, (b) 19, (c) 25, (d) 25 и 27, или (e) 25, 26 и 27, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ними, например последовательности с SEQ ID NO: (a) 55, (b) 56, (c) 62, (d) 62 и 64, или (e) 62, 63 и 64 соответственно;

(iv) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая трансмембранный домен, предпочтительно трансмембранный домен CD28, более предпочтительно – последовательность с SEQ ID NO: 57 или 80;

5 (v) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая эндодомен, предпочтительно домен 4-1BB, например последовательность SEQ ID NO. 58 или 81, и/или эндодомен CD3 ζ , например последовательность SEQ ID NO. 59 или 82, предпочтительно домен 4-1BB и эндодомен CD3 ζ ;

(vi) опционально – последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая расщепляемый линкер, предпочтительно расщепляемый линкер P2A, более предпочтительно – кодирующая последовательность SEQ ID NO. 28 или последовательность, имеющую не менее 80, 85, 90 или 95% идентичности с ИД. № ПОСЛЕД. 28, например ИД. № ПОСЛЕД. 65;

15 (vii) опционально – последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая репортер, предпочтительно репортер hCD19t, более предпочтительно – кодирующая последовательность SEQ ID NO. 29 или последовательность, имеющую не менее 80, 85, 90 или 95% идентичности с ИД. № ПОСЛЕД. 29, например ИД. № ПОСЛЕД. 66;

(viii) опционально – последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая сигнальный пептид, предпочтительно сигнальный пептид CD8 α , более предпочтительно – последовательность SEQ ID NO. 54 или 61.

20 В еще одном варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую тег, предпочтительно тег Flag, например последовательность SEQ ID NO. 23 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ней.

В другом отдельном варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты от N-конца до C-конца последовательно содержит или состоит из следующего:

25 (i) опционально – сигнальный пептид, предпочтительно сигнальный пептид CD8 α , более предпочтительно – последовательность SEQ ID NO. 54 или 61;

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO. 30 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ИД. № ПОСЛЕД. 30; например ИД. № ПОСЛЕД. 67; или последовательность нуклеиновой
30 кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO. 31 или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ИД. № ПОСЛЕД. 31; например ИД. № ПОСЛЕД. 68;

(iii) опционально – последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательности с SEQ ID NO: (a) 18, (b) 19, (c) 25, (d) 25 и 27, или (e) 25, 26 и 27, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ними, например последовательности с SEQ ID NO: (a) 55, (b) 56, (c) 62, (d) 62 и 64, или (e) 62, 63 и 64
5 соответственно;

(iv) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая трансмембранный домен, предпочтительно трансмембранный домен CD28, более предпочтительно – последовательность с SEQ ID NO: 57 или 80;

(v) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая эндодомен, предпочтительно домен 4-1BB, например последовательность SEQ ID NO. 58 или 81, и/или эндодомен CD3ζ, например последовательность SEQ ID NO. 59 или 82, предпочтительно домен 4-1BB и эндодомен CD3ζ;
10

(vi) опционально – последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая расщепляемый линкер, предпочтительно расщепляемый линкер P2A, более предпочтительно – кодирующая последовательность SEQ ID NO. 28 или последовательность, имеющую не менее 80, 85, 90 или 95% идентичности с ИД. № ПОСЛЕД. 28, например ИД. № ПОСЛЕД. 65;
15

(vii) опционально – последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая репортер, предпочтительно репортер hCD19t, более предпочтительно – кодирующая последовательность SEQ ID NO. 29 или последовательность, имеющую не менее 80, 85, 90 или 95% идентичности с ИД. № ПОСЛЕД. 29, например ИД. № ПОСЛЕД. 66;
20

В отдельном варианте осуществления Согласно настоящему изобретению предложен последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая определенный CAR по настоящему изобретению, предпочтительно CAR, состоящий из последовательности с SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37, 83 или 85, более предпочтительно – из последовательности нуклеиновой кислоты или конструкции, содержащей или состоящей из последовательности с SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 73, 74, 84 или 86, или последовательности, имеющей по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ними.
25

Последовательность открытой рамки считывания, кодирующая химерный рецептор, может быть получена из источника геномной ДНК, источника кДНК, созданного с помощью ПЦР из источника кДНК или иным способом. В противном случае она может быть синтезирована химическим путем или сочетанием вышеуказанных способов. В зависимости от размера геномной ДНК и количества интронов может быть желательно использовать кДНК или их комбинацию, поскольку обнаружено, что интроны стабилизируют мРНК или
30

обеспечивают экспрессию, специфичную для иммунных клеток, особенно для Т-клеток (Barthel and Goldfeld, 2003). Кроме того, дополнительным преимуществом для стабилизации мРНК может быть использование эндогенных или экзогенных некодирующих областей.

Для экспрессии химерного антигенного рецептора по настоящему изобретению
5 естественная или эндогенная область инициации транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей N-концевые компоненты химерного рецептора, может быть использована для создания химерного рецептора в целевой клетке-хозяине. В альтернативном варианте может использоваться экзогенная область инициации транскрипции, которая обеспечивает конститутивную или индуцибельную экспрессию, при этом экспрессия
10 может контролироваться в зависимости от целевого хозяина, требуемого уровня экспрессии, природы целевого хозяина и т. п.

Аналогично, сигнальная последовательность, направляющая химерный рецептор к
поверхностной мембране, может быть эндогенной сигнальной последовательностью N-концевого компонента химерного рецептора. Опционально в некоторых случаях может быть
15 желательно заменить данную последовательность другой сигнальной последовательностью. Однако выбранная сигнальная последовательность должна быть совместима с секреторным путем иммунной клетки, которая будет экспрессировать CAR, чтобы химерный рецептор находился на поверхности клетки.

Согласно настоящему изобретению, конструкция нуклеиновой кислоты
20 трансформируется или вводится в клетку, транскрибируется и транслируется с образованием продукта (т.е. химерного рецептора). Таким образом, конструкция нуклеиновой кислоты может дополнительно включать в себя по меньшей мере один промотор для управления транскрипцией CAR.

В одном из вариантов осуществления промотор функционально связан с
25 последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный рецептор по настоящему изобретению, т.е. они расположены так, чтобы способствовать транскрипции информационной РНК из ДНК, кодирующей химерный рецептор. Промотор может быть геномного происхождения или полученным искусственно. В данной области хорошо известны различные промоторы для использования в иммунных клетках и, в частности, в Т-клетках
30 (например, промотор CD4, описанный Marodon et al. (2003)). Промотор может быть конститутивным или индуцибельным, в котором индукция связана с определенным видом клеток или определенным уровнем созревания, или, например, с лекарственным препаратом (например, тетрациклином или доксорубицином). Примеры индуцируемых промоторов

включают, но не ограничиваются следующими: промотор металлотионина, промотор глюкокортикоида, промотор прогестерона и промотор тетрациклина. В качестве альтернативы также подходит ряд хорошо известных вирусных промоторов.

К представляющим интерес промоторам относятся: промотор β -актина, ранний и поздний промоторы SV40, промотор иммуноглобулина, промотор цитомегаловируса человека, промотор ретровируса и промотор вируса некроза селезёнки Френда, промоторы вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор длинного концевой повтора (LTR), промотор MoMuLV (вируса мышинного лейкоза Молони), промотор вируса лейкемии птиц, немедленно-ранний промотор цитомегаловируса, промотор вируса саркомы Рауса, а также промоторы генов человека, такие как, помимо прочего, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Промоторы могут быть связаны или не связаны с энхансерами, причем энхансеры могут быть естественным образом связаны с определенным промотором или связаны с другим промотором.

Аналогичным образом, область терминации может быть обеспечена естественной или эндогенной областью терминации транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей С-концевой компонент химерного рецептора. В качестве альтернативы, область терминации может быть получена из другого источника. По большей части источник области терминации обычно не считается критичным для экспрессии рекомбинантного белка, и можно использовать широкий спектр областей терминации без неблагоприятного воздействия на экспрессию. Для специалиста в данной области очевидно, что в некоторых случаях несколько аминокислот на концах антигенсвязывающего домена в CAR могут быть удалены, например, обычно не более 10, чаще не более 5 остатков. Также может быть желательно введение небольшого количества аминокислот на границах, обычно не более 10, чаще не более 5 остатков. Удаление или вставка аминокислот может происходить в результате удовлетворения потребностей конструкции, обеспечивая удобные участки рестрикции, простоту манипуляций, улучшение уровней экспрессии и т.п. Кроме того, замена одной или нескольких аминокислот другой аминокислотой может происходить по сходным причинам, при этом обычно заменяются не более пяти аминокислот в любом отдельно взятом домене.

В другом варианте осуществления конструкция нуклеиновой кислоты дополнительно содержит промотор, правильную последовательность инициации трансляции, такую как участок связывания рибосомы и стартовый кодон, кодон терминации и последовательность терминации транскрипции.

Конструкция нуклеиновой кислоты по изобретению может также содержать другие регуляторные области, такие как энхансеры, сайленсеры и граничные элементы/инсуляторы для управления уровнем транскрипции данного гена.

5 Конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный рецептор по изобретению, может быть получена общепринятыми способами. Поскольку в большинстве случаев могут использоваться последовательности естественного происхождения, естественные гены можно изолировать и при необходимости манипулировать ими для обеспечения надлежащего соединения различных компонентов. Таким образом, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие N-концевые и C-концевые белки химерного рецептора, могут быть
10 выделены с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием соответствующих праймеров, которые вызывают делецию нежелательных фрагментов гена. В качестве альтернативы, для создания химерной конструкции можно использовать фрагменты рестрикции клонированных генов. В любом случае данные последовательности могут быть
15 выбраны для обеспечения участков рестрикции, имеющих тупые концы или комплементарные перекрытия.

Различные манипуляции для получения химерной конструкции можно производить *in vitro*, и в определенных вариантах осуществления химерная конструкция вводится в векторы для клонирования и экспрессии в подходящем организме хозяина с помощью стандартных методов трансформации или трансфекции. Таким образом, после каждой манипуляции
20 производится клонирование итоговой конструкции, полученной в результате объединения последовательностей ДНК, выделение вектора и скрининг последовательности с целью убедиться, что данная последовательность кодирует требуемый химерный рецептор. Скрининг последовательности может быть произведен методом рестрикционного анализа, секвенирования и т. п.

25 CAR могут быть получены при помощи экспрессионных векторов. Аспекты настоящего раскрытия относятся к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR к HLA-G, а также к векторам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, как описано выше.

К примеру, конструкция нуклеиновой кислоты по изобретению может быть клонирована
30 в вектор, включая, но не ограничиваясь: плазмиду, фагмиду, производное фага, вирус и космиду. Векторы, представляющие особый интерес, включают векторы экспрессии, векторы репликации, векторы генерации зондов и векторы секвенирования. В соответствии с конструкцией нуклеиновой кислоты и клеткой-хозяином, вектор по изобретению может

содержать: промотор, терминатор, точку начала репликации, селективируемые маркеры, множественные сайты клонирования, сайты упаковки и т.п. В некоторых других вариантах осуществления вектор содержит или, в альтернативном варианте, в основном состоит из вышеуказанного, или, помимо этого, включает в себя консенсусную последовательность

5 Козака, расположенную перед последовательностью, кодирующей CAR. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, придающий устойчивость к антибиотикам.

В частности, вектор по изобретению может быть введен в клетку в форме вирусного вектора. Для переноса генов в клетки млекопитающих был разработан ряд вирусных систем.

10 Технология вирусных векторов хорошо известна в данной области и описана, к примеру, в in Sambrook, et al. ((2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), а также в других руководствах по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые могут применяться в качестве векторов, включают, но не ограничиваются: ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, герпесвирусы и лентивирусы. В

15 предпочтительном варианте осуществления вектор представляет собой интегративный лентивирусный вектор.

Лентивирусные векторы обладают дополнительным преимуществом перед векторами, полученными из онкоретровирусов, которое состоит в том, что они могут трансдуктировать непролиферирующие клетки и обладают низкой иммуногенностью. Как правило, подходящий

20 вектор содержит точку начала репликации, функционирующую по меньшей мере в одном организме, последовательность промотора, хорошо пригодные участки рестрикционных эндонуклеаз и один или более селективируемых маркеров, таких как маркеры, описанные в WO 01/96584; WO 01/29058; и US 6,326,193.

В частности, для того, чтобы оценить экспрессию CAR, вектор экспрессии,

25 предназначенный для введения в клетку, может также содержать селективный маркерный ген, или репортерный ген, или и то и другое вместе для того, чтобы облегчить выявление и отбор экспрессирующих клеток из популяции клеток, предназначенных для трансфекции или инфицирования вирусными векторами. В других аспектах селективируемый маркер может быть перенесен на отдельный участок ДНК и применен в процессе котрансфекции. Как

30 селективируемые маркеры, так и репортерные гены могут быть фланкированы соответствующими регуляторными последовательностями для запуска экспрессии в клетках-хозяевах. Пригодные селективируемые маркеры включают, например, гены устойчивости к антибиотикам и т.п.

В одном из аспектов настоящего изобретения термин «вектор» означает рекомбинантный вектор, который сохраняет способность инфицировать и трансдуцировать неделящиеся и/или медленно делящиеся клетки и интегрироваться в геном клетки-мишени. В некоторых аспектах вектор получен из вируса дикого типа или основывается на нем. В дополнительных аспектах вектор получен из ретровируса дикого типа или основывается на нем. В частности, ретровирус может быть выбран из следующего: вирус лейкемии, например, вирус лейкемии мышей Молони (MMLV), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) или вирус лейкоза гиббонов (GALV). Чужеродный энхансер и промотор могут представлять собой немедленно-ранний (IE) энхансер и промотор цитомегаловируса человека (HCMV), энхансер и промотор (область U3) вируса саркомы мышей Молони (MMSV), область U3 вируса саркомы Рауса (RSV), область U3 вируса некроза селезенки (SFFV), или энхансер IE HCMV, присоединенный к промотору нативного вируса мышинного лейкоза Молони (MMLV).

Метод на основе вирусных векторов, и особенно ретровирусных векторов, стал наиболее широко используемым методом встраивания генов в клетки млекопитающих, в том числе в клетки человека. Вирусные векторы также могут быть получены из лентивируса, поксвирусов, вируса простого герпеса I (HSV), вируса Эпштейна-Барра (EBV), вируса папилломы, аденовирусов и аденоассоциированных вирусов и т. п. См., к примеру, Патенты США №№ 5,350,674 и 5,585,362.

В предпочтительном варианте осуществления вектор по изобретению представляет собой лентивирусный вектор. В частности, вектор получен из лентивируса приматов и неprimатного лентивируса. Примеры лентивирусов приматов включают вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), возбудитель синдрома приобретенного иммунодефицита человека (СПИД) и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). Группа неprimатных лентивирусов включает прототип «медленного вируса» вируса Висна/Меди (VMV), а также родственный вирус козьего артрита-энцефалита (CAEV), вирус инфекционной анемии лошадей (EIAV) и недавно описанный вирус иммунодефицита кошек (FIV), а также вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV). Рекомбинантные лентивирусные векторы предшествующего уровня техники хорошо известны в данной области. См. к примеру, Патенты США №№ 6924123; 7,056,699; 7,07,993; 7,419,829 и 7,442,551, включенные в настоящий документ посредством ссылки.

Серийно производимые ретровирусные векторы для использования в настоящем раскрытии включают, но не ограничиваются: pFB-neo vectors (STRATAGENE®), Invitrogen's pLenti series versions 4, 6, and 6.2 "ViraPower" system, производимые Lentigen Corp.; pHIV-7-

GFP, lab созданный и используемый НИИ City of Hope; лентивирусный вектор «Lenti-X», pLVX, производимый Clontech; pLKO.1-puro, производимый Sigma-Aldrich; pLemiR, производимый Open Biosystems; и pLV, lab, созданный и используемый Медицинской школой Шарите, Институт вирусологии (CBF), Берлин, Германия.

5 Очевидно, что вирусный вектор по изобретению не должен ограничиваться компонентами определенного вируса. Вирусный вектор может содержать компоненты, полученные из двух или более разных вирусов, а также может содержать синтетические компоненты. Компонентами вектора можно манипулировать для получения желаемых характеристик, таких как специфичность к клетке-мишени.

10 В патенте США 6924123 раскрывается информация, что определенные ретровирусные последовательности облегчают интеграцию в геном клетки-мишени. В данном патенте говорится, что каждый ретровирусный геном содержит гены, называемые gag, pol и env, которые кодируют белки и ферменты вириона. Эти гены с обоих концов фланкированы участками, называемыми длинными концевыми повторами (LTR). LTR ответственны за
15 провирусную интеграцию и транскрипцию. Они также служат последовательностями энхансера-промотора. Соответственно, вектор по изобретению может иметь одну или более характеристик интеграции.

В некоторых вариантах осуществления наличие компонентов частиц, не кодируемых векторным геномом, обеспечивается *in trans* с помощью дополнительных последовательностей
20 нуклеиновых кислот («система упаковки», которая обычно включает в себя один или оба гена gag/pol и env), экспрессируемых в клетке-хозяине, например, используя стратегию вируса-помощника. Набор последовательностей, необходимых для продуцирования частиц вирусного вектора, может быть введен в клетку-хозяин посредством транзientной трансфекции или они могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина, или могут быть получены различными
25 способами, такими как хелперные последовательности. Используемые методы хорошо известны специалистам в данной области. К примеру, ретровирусные конструкции представляют собой упаковывающие плазмиды, содержащие по меньшей мере одну хелперную последовательность ДНК ретровируса, полученную из неспособного к репликации ретровирусного генома, кодирующего *in trans* все белки вириона, необходимые для упаковки
30 неспособного к репликации ретровирусного вектора, а также для продуцирования белков вириона, способных упаковывать неспособный к репликации ретровирусный вектор с высоким титром без продуцирования неспособного к репликации хелперного вируса.

В процессе упаковки упаковывающие плазмиды и ретровирусные векторы, экспрессирующие CAR по изобретению, временно котрансфицируются в первую популяцию клеток млекопитающих, способных продуцировать вирус, таких как клетки эмбриональной почки человека, например клетки 293 (ATCC № CRL1573, ATCC, Rockville, MD) для получения супернатантов, содержащих рекомбинантный ретровирус с высоким титром. В другом способе по изобретению вышеупомянутую временно трансфицированную первую популяцию клеток затем выращивают совместно с клетками-мишенями млекопитающих, например, с лимфоцитами человека, для трансдукции клеток-мишеней с помощью чужеродного гена с высокой эффективностью.

В еще одном способе по изобретению супернатанты из описанной выше временно трансфицированной первой популяции клеток инкубируют с клетками-мишенями млекопитающих, например, с лимфоцитами человека или гемопоэтическими стволовыми клетками, для трансдукции клеток-мишеней с помощью чужеродного гена с высокой эффективностью.

Конструкция нуклеиновой кислоты по изобретению вставляется в вектор и упаковывается в ретровирусные или лентивирусные частицы при помощи методов, известных в данной области. Затем рекомбинантный вирус можно выделить и доставить в клетки субъекта *in vivo* или *ex vivo*. В отдельном аспекте настоящего изобретения упаковывающие плазмиды стабильно экспрессируются в первой популяции клеток млекопитающих, способных продуцировать вирус, таких как клетки эмбриональной почки человека, например клетки 293. Ретровирусные или лентивирусные векторы вводятся в клетки путем котрансфекции селективным маркером или путем инфицирования псевдотипированным вирусом. В обоих случаях векторы объединяются. В качестве альтернативы векторы могут быть введены в эписомально поддерживаемую плазмиду.

Клетки, экспрессирующие CAR к HLA-G

Настоящее изобретение относится к клетке, экспрессирующей CAR, как описано в настоящем документе. Данная клетка может представлять собой клетку любого вида, включая иммунную клетку, способную экспрессировать CAR, или такую, как бактериальная клетка, которая содержит вектор экспрессии, кодирующий CAR.

Применительно к экспрессии последовательности гетерологичной нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR по изобретению, термин «клетка-хозяин» относится к клетке, которая способна реплицировать вектор и/или экспрессировать гетерологичный ген, кодируемый вектором. Термин «клетка» также включает в себя потомство клеток, которое представляет

собой все без исключения последующие поколения. Очевидно, что все потомство не может быть идентичным вследствие специально спровоцированных или случайных мутаций. Клетка-хозяин может быть трансфицирована конструкцией нуклеиновой кислоты или вектором по изобретению. Трансформированная клетка включает в себя первичную клетку субъекта и ее

5 потомство. В контексте настоящего документа термины «сконструированные» и «рекомбинантные» клетки или клетки-хозяева относятся к клеткам, в которые была введена экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты, такая как, например, вектор, более конкретно – CAR. Следовательно, рекомбинантные отличаются от клеток естественного происхождения, которые не содержат рекомбинантно введенную нуклеиновую кислоту.

10 После трансдукции клетки конструкцией нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, клетка распознает изоформу HLA-G, специфичную для CAR. Таким образом, настоящее изобретение также относится к клеткам, экспрессирующим CAR по изобретению. В частности, клетки, экспрессирующие CAR к HLA-G по изобретению, представляют собой иммунные клетки, способные экспрессировать CAR по изобретению. В некоторых вариантах

15 осуществления иммунные клетки трансфицируют таким образом, чтобы они содержали по крайней мере CAR по настоящему изобретению.

Клетка может содержать CAR, который специфически связывает изоформы HLA-G, ассоциированные с $\beta 2M$, в предпочтительном варианте осуществления – изоформы HLA-G1 и HLA-G5. В альтернативном варианте клетка может содержать CAR, который специфически

20 связывает изоформы HLA-G, не содержащие $\beta 2M$, предпочтительно – изоформы HLA-G2 и HLA-G6, и/или изоформы HLA-G1, не содержащие $\beta 2M$, и/или изоформы HLA-G5, не содержащие $\beta 2M$.

В одном из вариантов осуществления клетка экспрессирует по меньшей мере два разных CAR. К примеру, клетка может содержать CAR, который специфически связывает изоформы

25 HLA-G, ассоциированные с $\beta 2M$, предпочтительно HLA-G1 и HLA-G5, а также связывается с другим CAR, который специфически связывает другой антиген. В альтернативном варианте клетка может содержать CAR, который специфически связывает изоформы HLA-G, не содержащие $\beta 2M$, предпочтительно HLA-G2 и HLA-G6, и/или изоформы HLA-G1, не содержащие $\beta 2M$, и/или изоформы HLA-G5, не содержащие $\beta 2M$, а также связывается с другим

30 CAR, который специфически связывает другой антиген. В частности, клетка может содержать как CAR, специфически связывающий изоформы HLA-G, ассоциированные с $\beta 2M$, предпочтительно HLA-G1 и HLA-G5, так и CAR, специфически связывающий изоформы HLA-

G, не содержащие $\beta 2M$, предпочтительно HLA-G2 и HLA-G6, и/или изоформы HLA-G1, не содержащие $\beta 2M$, и/или изоформы HLA-G5, не содержащие $\beta 2M$.

В предпочтительном варианте осуществления клетка содержит CAR, содержащий антигенсвязывающий фрагмент, полученный из антитела LFTT-1, как описано выше, и CAR, содержащий антигенсвязывающий фрагмент, полученный из антитела 15E7, как описано выше.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления такая клетка содержит первый CAR, который содержит: (i) одну тяжелую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащие последовательности с ИД. № ПОСЛЕД. 11, 12 и 13 соответственно, и (ii) одну легкую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащие последовательности с ИД. № ПОСЛЕД. 14, 15 и 16 соответственно, и второй CAR, который содержит (i) одну тяжелую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащие последовательности с ИД. № ПОСЛЕД. 5, 6 и 7 соответственно, и (ii) одну легкую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащие последовательности с ИД. № ПОСЛЕД. 8, 9 и 10 соответственно, причем каждая CDR опционально может содержать 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены, делеции или вставки.

Таким образом, более предпочтительно такая клетка содержит первый CAR, содержащий или состоящий из последовательности с ИД. № ПОСЛЕД. 32, 33, 34 или 85, или последовательности, имеющей по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ней, и второй CAR, содержащий или состоящий из последовательности с ИД. № ПОСЛЕД. 35, 36, 37 или 83, или последовательности, имеющей по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности с ней.

В альтернативном варианте клетка может экспрессировать биспецифический CAR, содержащий биспецифический антигенсвязывающий домен, как описано выше, который содержит домен, который распознает изоформы HLA-G, не содержащие $\beta 2M$, предпочтительно HLA-G2 и HLA-G6, и/или изоформы HLA-G1 и HLA-G5, не содержащие $\beta 2M$, и второй домен, который распознает изоформы HLA-G, ассоциированные с доменом $\beta 2M$, предпочтительно HLA-G1 и HLA-G5.

Опционально, клетка, экспрессирующая CAR к HLA-G по изобретению, дополнительно экспрессирует CAR, который нацелен на антиген, участвующий в заболевании, предпочтительно таком, как рак или вирусная инфекция, предпочтительно антиген нацелен на лечение рака или противовирусную терапию. Очевидно, что такой антиген не является HLA-G.

Клетка по изобретению может представлять собой прокариотическую или эукариотическую клетку. В предпочтительном варианте осуществления клетки представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, и чаще всего представляют собой клетки человека, кошки или собаки, еще чаще – клетки человека, предпочтительно первичные клетки человека.

В предпочтительном варианте осуществления клетки представляют собой иммунные клетки. Клетки могут быть выбраны из группы, состоящей из следующего: Т-клетка, включая Т-клетку CD4⁺ и Т-клетку CD8⁺, В-клетка, НК-клетка, НКТ-клетка, моноцит и дендритная клетка. В предпочтительном варианте осуществления клетка представляет собой Т-клетку, В-клетку и НК клетку.

Клетки могут быть аутологичными, сингенными, аллогенными, а в некоторых случаях даже ксеногенными клетками. К примеру, подходящие иммунные клетки, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают аутологичные Т-лимфоциты, аллогенные Т-клетки, ксеногенные Т-клетки, предшественников какой-либо из вышеперечисленных, трансформированные опухолевые или ксеногенные иммунологические эффекторные клетки, инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), цитотоксические лимфоциты или иные клетки, способные убивать клетки-мишени при активации.

Иммунные клетки могут быть выделены у людей или субъектов, не относящихся к людям, или могут быть получены из стволовых клеток, например, эмбриональных стволовых клеток, мультипотентных стволовых клеток, плюрипотентных стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), стволовых клеток взрослых особей или иных перепрограммированных клеток. Клетки для введения описанных здесь конструкций нуклеиновых кислот могут быть выделены из образца, такого как биологический образец, например, полученный от субъекта или происходящий из организма субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект, у которого была выделена клетка, представляет собой субъект, имеющий заболевание или патологическое состояние, или нуждающийся в клеточной терапии, или которому предстоит получить клеточную терапию. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека, нуждающегося в особом терапевтическом вмешательстве, таком как адоптивная клеточная терапия, для которой производится выделение, обработка и/или инженерия клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки имеют происхождение из крови, костного мозга, лимфы или лимфоидных органов, представляют собой клетки иммунной системы, такие как клетки

врожденной или адаптивной иммунной системы, например, миелоидные или лимфоидные клетки, включая лимфоциты, обычно Т-клетки и/или НК-клетки.

В некоторых вариантах осуществления клетки включают один или более субпопуляций Т-клеток или иных видов клеток, таких как целые популяции Т-клеток, клетки CD4⁺, клетки CD8⁺ и их субпопуляции, такие как те, которые характеризуются функцией, состоянием активации, зрелостью, потенциалом для дифференциации, способностью к размножению, рециркуляции, локализации и/или персистенции, специфичностью к антигенам, типом рецептора антигена, присутствием в определенном органе или части тела, профилем маркеров или секреции цитокинов и/или степенью дифференциации.

В некоторых вариантах реализации иммунная клетка представляет собой Т-клетку, например, Т-клетку животного, Т-клетку млекопитающего, Т-клетку кошки, Т-клетку собаки или Т-клетку человека. Среди подтипов и субпопуляций Т-клеток и/или Т-клеток CD4⁺ и/или CD8⁺ существуют наивные Т- (TN-) клетки, эффекторные Т-клетки (TEFF), Т-клетки памяти и их подтипы, такие как стволовые Т-клетки памяти (TSCM), Т-клетки центральной памяти (TCM), Т-клетки эффекторной памяти (TEM) или терминально дифференцированные эффекторные Т-клетки памяти, инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), незрелые Т-клетки, зрелые Т-клетки, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, инвариантные Т-клетки, ассоциированные со слизистой оболочкой (MAIT), естественные и адаптивные регуляторные Т-клетки (Treg), хелперные Т-клетки, такие как клетки TH1, клетки TH2, клетки TH3, клетки TH17, клетки TH9, клетки TH22, фолликулярные хелперные Т-клетки, Т-клетки α/β и Т-клетки δ/γ . Неограничивающие примеры доступных на рынке линий Т-клеток включают: линии BCL2 (AAA) Jurkat (ATCC® CRL-2902™), BCL2 (S70A) Jurkat (ATCC® CRL-2900™), BCL2 (S87A) Jurkat (ATCC® CRL-2901™), BCL2 Jurkat (ATCC® CRL-2899™), Neo Jurkat (ATCC® CRL-2898™), TALL-104, линию цитотоксических Т-клеток человека TALL-104 (ATCC # CRL-11386). Дополнительные примеры включают, но не ограничиваются: линии зрелых Т-клеток, например, такие как Deglis, EBT-8, HPB-MLp-W, HUT 78, HUT 102, Karpas 384, Ki 225, My-La, Se-Ax, CKB-3, CM3-1 и T34; и линии незрелых Т-клеток, например, ALL-SIL, Be13, CCRF-CEM, CML-T1, DND-41, DU.528, EU-9, HD-Mar, HPB-ALL, H-SB2, HT-1, JK-T1, Jurkat, Karpas 45, KE-37, KOPT-K1, K-T1, L-KAW, Loucy, MAT, MOLT-1, MOLT 3, MOLT-4, MOLT 13, MOLT-16, MT-1, MT-ALL, P12/Ichikawa, Peer, PER0117, PER-255, PF-382, PFI-285, RPMI-8402, ST-4, SUP-T1 – SUP-T14, TALL-1, TALL-101, TALL-103/2, TALL-104, TALL-105, TALL-106, TALL-107, TALL-197, TK-6, TLBR-1, -2, -3 и -4, CCRF-HSB-2 (CCL-120.1), J.RT3-T3.5 (ATCC TIB-153), J45.01 (ATCC CRL-1990), J.CaM1.6 (ATCC CRL-2063),

RS4; 11 (ATCC CRL-1873), CCRF -CEM (ATCC CRM-CCL-119); а также линии кожной Т-клеточной лимфомы, например, HuT78 (ATCC CRM-TIB-161), MJ [G11] (ATCC CRL-8294), HuT102 (ATCC TIB-162). Неограничивающие примеры источников таких доступных на рынке клеточных линий включают Американскую коллекцию типовых культур или ATCC (http://www.atcc.org/) и Германскую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (https://www.dsmz.de/).

В некоторых вариантах осуществления клетки по изобретению представляют собой естественные киллерные (NK) клетки, естественные киллерные Т- (NKT-) клетки, цитокин-индуцированные киллерные клетки (CIK), инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), лимфокин-активированные киллерные клетки (LAK) или их аналоги. NK-клетки могут быть выделены или получены из коммерчески доступного источника. Неограничивающие примеры производимых на продажу линий NK-клеток включают линии NK-92 (ATCC® CRL-2407™), NK-92MI (ATCC® CRL-2408™). Дополнительные примеры включают, но не ограничиваются ими: линии NK HANK1, KHYG-1, NKL, NK-YS, NOI-90 и YT. Неограничивающие примеры источников таких доступных на рынке клеточных линий включают Американскую коллекцию типовых культур или ATCC (http://www.atcc.org/) и Германскую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (https://www.dsmz.de/).

В отдельном варианте осуществления клетка-хозяин, представляющая собой CAR по изобретению, выбрана из цитотоксических Т-клеток (также известных как ТС, цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL), Т-киллеров, литических Т-клеток, Т-клеток CD8⁺ или киллерных Т-клеток) и NK-клеток.

В некоторых вариантах осуществления клетки по изобретению представляют собой В-клетки, моноциты или гранулоциты, например, миелоидные клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки, эозинофилы и/или базофилы.

Метод получения клеток, экспрессирующих CAR

Способы введения генов в клетку и экспрессия генов в клетке известны в данной области.

В частности, методы продуцирования клеток, содержащих векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области. См., к примеру, (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Что касается вектора экспрессии, вектор может быть с легкостью введен в клетку-хозяин, например, в клетку млекопитающих, бактерий, дрожжей или насекомых, каким, или способом, применяемым в данной области. К примеру, вектор экспрессии может быть перенесен в клетку-хозяин

физическими, химическими или биологическими средствами, которые более подробно описаны здесь ниже.

В некоторых вариантах осуществления данные методы включают забор клеток у субъекта, их подготовку, обработку, выращивание и/или конструирование, как описано в настоящем документе, и повторное введение их тому же пациенту до или после криоконсервации.

В частности, в настоящей заявке предложен способ получения клеток, экспрессирующих CAR к HLA-G, включающий в себя, или в альтернативном варианте состоящий в основном из, или дополнительно включающий в себя следующие этапы: (i) трансдукция популяции выделенных клеток последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, как описано в настоящей заявке; и (ii) отбор субпопуляции указанных выделенных клеток, которые были успешно трансдуцированы последовательностью нуклеиновой кислоты, упомянутой в пункте (i), в результате чего образуются клетки, экспрессирующие CAR к HLA-G. В одном из аспектов настоящего изобретения выделенные клетки выбираются из группы, состоящей из T-клеток и NK-клеток.

Здесь даже более конкретно предложен способ получения клеток, экспрессирующих CAR к HLA-G, включающий в себя, или в альтернативном варианте состоящий в основном из, или дополнительно включающий в себя следующие этапы: (i) забор популяции иммунных клеток (например, клеток крови) (ii) выделение определенной популяции клеток (например, T-клеток и/или NK-клеток) (iii) трансдукция популяции выделенных клеток последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, как описано в настоящем документе; и (ii) отбор субпопуляции вышеупомянутых выделенных клеток, которые были успешно трансдуцированы последовательностью нуклеиновой кислоты по пункту (iii), в результате чего образуются клетки, экспрессирующие CAR к HLA-G. Эти различные этапы более подробно описаны ниже.

Забор клеток

Перед размножением и генетической модификацией описанных здесь клеток данные клетки могут быть получены у субъекта – к примеру, в вариантах осуществления, включающих аутологичную терапию, или из культуры, доступной на рынке.

Клетка может быть получена из образцов, таких как ткань, биологическая жидкость (например, кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, моча и пот), а также из иных образцов, взятых непосредственно у субъекта, а также образцов, полученных в результате одного или нескольких этапов обработки, таких как разделение,

центрифугирование, генная инженерия (например, трансдукция вирусным вектором), отмывание и/или инкубация.

Клетки могут быть получены из ряда неограничивающих источников, включая цельную кровь, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), лейкоциты, костный мозг, 5 ткань тимуса, ткань лимфатических узлов, пуповинную кровь, ткань из инфицированного участка, асцит, плевральный выпот, биопсию ткани, опухоль, лейкемию, лимфому, лимфоидную ткань, связанную с кишечником, лимфоидную ткань, связанную со слизистой оболочкой, селезенку, другие лимфоидные ткани, печень, легкое, желудок, кишечник, толстую кишку, почки, поджелудочную железу, молочные железы, кости, простату, шейку матки, 10 яички, яичники, миндалины или иной орган и/или полученные из них клетки. Применительно к клеточной терапии, к примеру, адоптивной клеточной терапии, образцы могут представлять собой, помимо прочего, образцы из аутологических и аллогенных источников.

В некоторых примерах клетки из циркулирующей крови субъекта получают, к примеру, методом афереза или лейкоафереза. В некоторых аспектах настоящего изобретения образцы 15 содержат лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядродержащие лейкоциты, эритроциты и/или тромбоциты, а в некоторых аспектах содержат клетки, не являющиеся красными кровяными тельцами и тромбоцитами.

В некоторых вариантах осуществления может использоваться любое количество доступных и известных специалистам линий НК-клеток Т-клеток, таких как описанные выше. 20 В некоторых вариантах осуществления клетки могут быть получены от здорового донора, от пациента, у которого диагностирован рак, от пациента, у которого диагностировано аутоиммунное или воспалительное заболевание, или от пациента, у которого диагностировано инфекционное заболевание. В некоторых вариантах осуществления клетки могут быть частью смешанной популяции клеток, которые обладают разными фенотипическими 25 характеристиками.

Выделение клеток

Специалисту в данной области известно, что для выделения иммунных клеток у субъекта могут быть легко использованы или адаптированы к настоящему применению различные методы например, выделение с помощью наборов для разделения клеток Life Technologies 30 Dynabeads® system; STEMcell Technologies EasySep™, RoboSep™, RosetteSep™, SepMate™; Miltenyi Biotec MACS™, экспрессия маркеров клеточной поверхности и другие доступные на рынке наборы для разделения и выделения клеток (например, ISOCELL от Pierce, Rockford, IL). Отдельные субпопуляции иммунных клеток можно выделить с помощью гранул или иных

связывающих агентов, имеющихся в таких наборах, специализированных для уникальных маркеров клеточной поверхности. Например, MACS™ CD4+ и CD8+ MicroBeads можно использовать для выделения Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺. Стратегия выделения и размножения антиген-специфических Т-клеток в качестве терапевтического вмешательства при

5 заболеваний человека также была подтверждена в клинических испытаниях (Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995; Heslop et al., 1996).

В некоторых вариантах осуществления выделение клеток включает одну или более стадий подготовки и/или разделения клеток, не основанных на аффинности. В некоторых примерах клетки промывают, центрифугируют и/или инкубируют в присутствии одного или

10 нескольких реагентов, к примеру, для удаления нежелательных компонентов, обогащения желаемыми компонентами, лизирования или удаления клеток, чувствительных к определенным реагентам. В некоторых примерах клетки сепарируют на основе одного или нескольких свойств, таких как плотность, адгезионные свойства, размер, чувствительность и/или устойчивость к определенным компонентам.

В некоторых вариантах осуществления взятые у субъекта клетки крови промывают, например, для удаления фракции плазмы и помещения клеток в соответствующий буфер или среду для последующих этапов обработки. В некоторых вариантах осуществления клетки промывают фосфатным буфером (ФСБ). В некоторых вариантах осуществления в промывочном растворе отсутствуют кальций и/или магний и/или многие или все

20 двухвалентные катионы. В некоторых аспектах настоящего изобретения этап промывки выполняется с помощью полуавтоматической «проточной» центрифуги (например, устройства для обработки клеток Cobe 2991, Baxter) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых аспектах этап промывки выполняется методом фильтрации тангенциальным потоком (TFF) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых вариантах

25 осуществления после промывки клетки ресуспендируют в ряде биосовместимых буферов, таких как, например, ФСБ, не содержащий Ca²⁺/Mg²⁺. В некоторых вариантах осуществления компоненты образца клеток крови удаляют, а клетки напрямую ресуспендируют в культуральной среде.

В некоторых вариантах осуществления методы выделения клеток включают разделения

30 разных типов клеток на основе экспрессии или присутствия в клетке одной или нескольких специфических молекул, таких как поверхностные маркеры, например, поверхностные белки, внутриклеточные маркеры или нуклеиновая кислота. В некоторых вариантах осуществления можно применять какой-либо известный метод разделения на основе таких маркеров. В

некоторых вариантах осуществления разделение представляет собой разделение на основе аффинности или иммуноаффинности. К примеру, выделение в некоторых аспектах включает в себя разделение клеток и популяций клеток на основе экспрессии или уровня экспрессии клетками одного или нескольких маркеров, обычно маркеров клеточной поверхности, например, посредством инкубации с антителом или партнером по связыванию, который специфически связывается с такими маркерами, за которой обычно следуют этапы промывки и разделения клеток, связанных с антителом или партнером по связыванию, от клеток, не связанных с антителом или партнером по связыванию. Такие этапы разделения могут быть основаны на позитивном отборе, при котором клетки, связанные с реагентами, остаются для дальнейшего применения, и/или на негативном отборе, при котором остаются клетки, не связанные с антителом или партнером по связыванию. В некоторых примерах обе фракции остаются для дальнейшего применения. В некоторых аспектах негативный отбор может быть особенно полезен при отсутствии антител, специфически идентифицирующих тип клеток в гетерогенной популяции, таким образом, разделение лучше всего производить на основе маркеров, экспрессируемых клетками, отличными от желаемой популяции.

В некоторых вариантах осуществления этап разделения делится на несколько циклов, в ходе которых фракция, выбранная в ходе позитивного или негативного отбора, с одного этапа подвергается другому этапу разделения, например последующему позитивному или негативному отбору. В некоторых примерах единый этап разделения может истощить клетки, экспрессирующие несколько маркеров одновременно, например, посредством инкубации клеток с несколькими антителами или партнерами по связыванию, каждый из которых является специфичным для маркера, нацеленного на негативный отбор. Аналогичным образом, несколько видов клеток могут быть отобраны одновременно в ходе позитивного отбора посредством инкубации клеток с несколькими антителами или партнерами по связыванию, экспрессируемыми различными видами клеток.

К примеру, в некоторых аспектах настоящего изобретения отдельные субпопуляции Т-клеток, такие как позитивные клетки или экспрессирующие высокие уровни одного или нескольких поверхностных маркеров, например, Т-клетки CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, и/или CD45RO+ выделяют методами позитивного или негативного отбора. К примеру, Т-клетки CD3+ могут быть увеличены в объеме с помощью конъюгированных CD3/CD28 магнитных микроносителей (например, увеличитель объема Т-клеток DYNABEADS® M-450 CD3/CD28).

В некоторых вариантах осуществления выделение производится путем обогащения определенной популяции клеток посредством позитивного отбора или истощения определенной популяции клеток посредством негативного отбора. В некоторых вариантах осуществления позитивный или негативный отбор осуществляется посредством инкубации
5 клеток с одним или несколькими антителами или иным связывающим агентом, которые специфически связываются с одним или несколькими экспрессируемыми поверхностными маркерами или с экспрессируемым (маркер+) на относительно более высоком уровне клетками, отобранными в результате позитивного или негативного отбора соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки отделяют от образца посредством
10 негативного отбора маркеров, экспрессируемых клетками, отличными от Т-клеток, такими как В-клетки, моноциты или иные белые кровяные тельца, такие как CD14. В некоторых аспектах настоящего изобретения этап отбора CD4 или CD8 применяется для разделения хелперных CD4+ и цитотоксических CD8+ Т-клеток. Такие популяции CD4+ и CD8+ могут быть дополнительно разделены на субпопуляции посредством позитивного или негативного отбора
15 экспрессируемых маркеров, или маркеров, экспрессируемых в относительно более высокой степени в одной или нескольких субпопуляциях наивных, запоминающих и/или эффекторных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления клетки CD8+ дополнительно обогащаются или истощаются наивными клетками, клеткам центральной памяти, эффекторной памяти и/или
20 стволовыми клетками центральной памяти, например, посредством позитивного или негативного отбора на основе поверхностных антигенов, связанных с соответствующей субпопуляцией. В некоторых вариантах осуществления обогащение Т-клетками центральной памяти (TCM) производится для повышения эффективности, например, для улучшения долгосрочной выживаемости, размножения и/или приживаемости после введения, что в
25 некоторых аспектах является особенно надежным в таких субпопуляциях. См. Terakura et al. (2012) Blood. 1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701. В некоторых вариантах осуществления сочетание Т-клеток CD8+, обогащенных TCM, и Т-клеток CD4+, дополнительно повышает эффективность.

В вариантах осуществления изобретения Т-клетки памяти присутствуют в
30 субпопуляциях CD62L+ и CD62L- лимфоцитов CD8+ периферической крови. МКПК могут быть обогащены или истощены фракциями CD62L-CD8 + и/или CD62L+CD8, например, при помощи антител к CD8 и CD62L.

В некоторых вариантах осуществления обогащение Т-клетками центральной памяти (TCM) основано на позитивной или высокой поверхностной экспрессии CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 и/или CD127; в некоторых аспектах оно основано на негативном отборе клеток, экспрессирующих или интенсивно экспрессирующих CD45RA и/или гранзим В. В некоторых аспектах настоящего изобретения выделение популяции CD8+, обогащенной клетками TCM, осуществляется посредством истощения клеток, экспрессирующих CD4, CD14, CD45RA, и позитивного отбора или обогащения клеток, экспрессирующих CD62L. В одном из аспектов обогащение Т-клеток центральной памяти (TCM) производится, начиная с негативной фракции клеток, отобранных на основе экспрессии CD4, которые подвергаются негативному отбору на основе экспрессии CD14 и CD45RA, и позитивному отбору на основе CD62L. Такие отборы в некоторых аспектах производятся одновременно, а в других аспектах – последовательно в любом порядке. В некоторых аспектах тот же самый этап отбора на основе экспрессии CD4, используемый при подготовке популяции или субпопуляции клеток CD8+, также используется для создания популяции или субпопуляции клеток CD4+, таким образом, позитивные и негативные фракции, полученные из разделения на основе CD4, остаются и используются на последующих этапах данных методов, опционально после одного или нескольких дополнительных этапов позитивного или негативного отбора.

В некоторых вариантах осуществления обогащение НК-клетками основано на позитивной или высокой поверхностной экспрессии CD56 и CD16, а также на негативной экспрессии CD3 и/или, опционально – на присутствии рецепторов NKp46 или NKp30.

В некоторых аспектах настоящего изобретения образец или состав клеток, подлежащих разделению, инкубируют с мелким намагничивающимся или чувствительным к магнитному полю материалом, таким как магниточувствительные частицы или микрочастицы, такие как парамагнитные микроносители (например, такие как микроносители Dynabeads или MACS). Магниточувствительный материал, например, частица, обычно прямо или косвенно присоединен к партнеру по связыванию, например, к антителу, которое специфически связывается с молекулой, например, поверхностным маркером, присутствующим на клетке, клетках или популяции клеток, которые требуется разделить, например, желательно посредством негативного или позитивного отбора. В некоторых вариантах осуществления магнитная частица или шарик содержат магниточувствительный материал, связанный со специфическим связывающим элементом, таким как антитело или иной связывающий партнер. Существует много хорошо известных магниточувствительных материалов, используемых в методах магнитного разделения. К подходящим магнитным частицам, помимо прочих,

относятся частицы, описанные в Патенте США № 4452773 от Molday, а также в описании европейского патента EP 452342 B, которые включены здесь в качестве ссылки. Другими примерами являются частицы коллоидного размера, такие как описанные в Owen U. S. Pat. No. 4,795,698, and Liberti et al., U. S. Pat. No. 5,200,084.

5 Инкубацию обычно проводят в условиях, при которых антитела или партнеры по связыванию, или молекулы, такие как вторичные антитела или иные реагенты, которые специфически связываются с такими антителами или партнерами по связыванию, которые прикреплены к магнитной частице или носителю, специфически связываются с молекулами поверхности клетки, если они присутствуют на клетках образца.

10 В некоторых аспектах образец помещают в магнитное поле, и клетки, к которым прикреплены магниточувствительные или намагничиваемые частицы, будут притягиваться к магниту и отделяться от немеченых клеток. При позитивном отборе остаются клетки, которые притягиваются магнитом; при негативном отборе остаются клетки, которые не притягиваются (немеченые клетки). В некоторых аспектах сочетание позитивного и негативного отборов
15 практикуется на одном и том же этапе отбора, где позитивные и негативные фракции остаются и далее обрабатываются или подвергаются дальнейшим этапам разделения.

В отдельных вариантах осуществления магниточувствительные частицы покрыты первичными антителами или иными партнерами по связыванию, вторичными антителами, лектинами, ферментами или стрептавидином. В отдельных вариантах осуществления
20 магнитные частицы прикреплены к клеткам через покрытие из первичных антител, специфичных для одного или нескольких маркеров. В отдельных вариантах осуществления первичным антителом или партнером по связыванию метят клетки, а не микроносители, а затем добавляют магнитные частицы, покрытые вторичным антителом или иным партнером по связыванию (например, стрептавидином). В отдельных вариантах осуществления покрытые
25 стрептавидином магнитные частицы применяются в комбинации с биотинилированными первичными или вторичными антителами.

В некоторых вариантах осуществления магниточувствительные частицы остаются прикрепленными к клеткам, которые впоследствии должны быть инкубированы, культивированы и/или сконструированы; в некоторых аспектах частицы остаются
30 прикрепленными к клеткам для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления намагничивающиеся или магниточувствительные частицы удаляются с клеток. Способы удаления намагничивающихся частиц с клеток известны и включают, например, применение альтернативных немеченых антител, намагничивающихся частиц или антител,

конъюгированных расщепляемыми линкерами, и т. п. В некоторых вариантах осуществления намагничиваемые частицы являются биоразлагаемыми.

В отдельных вариантах осуществления выделение или разделение производят с помощью системы, устройства или прибора, которые выполняют один или более этапов, включающих
5 выделение и подготовку клеток, разделение, обработку, инкубацию, выращивание и/или приготовление препарата вышеупомянутых методов. В некоторых аспектах настоящего изобретения система применяется для выполнения каждого из этих этапов в закрытой или стерильной среде, например, для минимизации ошибок, манипуляций пользователя и/или загрязнения. В одном из примеров система представляет собой систему, описанную в
10 Международной патентной заявке, номер публикации WO2009/072003 или US 20110003380.

В некоторых вариантах осуществления описанная здесь популяция клеток собирается и обогащается (или истощается) посредством проточной цитометрии, при котором клетки, окрашенные несколькими маркерами клеточной поверхности, переносятся в жидком потоке. В некоторых вариантах осуществления описанная здесь популяция клеток собирается и
15 обогащается (или истощается) посредством флуоресцентной сортировки клеток (FACS) в соответствии с препаративной шкалой. В отдельных вариантах реализации описанная здесь популяция клеток собирается и обогащается (или истощается) с помощью чипов микроэлектромеханических систем (МЭМС) в комбинации с системой обнаружения на основе FACS (см., к примеру, WO 2010/033140, Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573; and Godin et
20 al. (2008) J Biophoton. 1(5):355-376). В обоих случаях клетки могут быть помечены несколькими маркерами, что позволяет выделить четко определенные субпопуляции Т-клеток с высокой чистотой. В некоторых вариантах осуществления антитела или партнеры по связыванию помечены одним или несколькими детектируемыми маркерами для облегчения разделения при позитивном и/или негативном отборе. Например, разделение может быть основано на
25 связывании с флуоресцентно меченными антителами. В некоторых примерах разделение клеток на основе связывания антител или иных партнеров по связыванию, специфичных для одного или нескольких маркеров клеточной поверхности, осуществляется в жидком потоке, например, методом сортировки флуоресцентно активированных клеток (FACS), включая препаративную шкалу (FACS) и/или с помощью чипов микроэлектромеханической
30 микросхемы (МЭМС), например, в комбинации с проточно-цитометрической системой обнаружения. Такие методы позволяют производить позитивный и негативный отбор одновременно по нескольким маркерам.

В некоторых вариантах осуществления вышеупомянутые методы включают методы разделения клеток на основе плотности, такие как получение лейкоцитов из периферической крови путем лизирования эритроцитов и центрифугирования в градиенте Перколла или Фиколла.

5 На любом из вышеупомянутых этапов разделения разделение не приводит к 100% обогащению или удалению определенной популяции клеток или клеток, экспрессирующих конкретный маркер. К примеру, позитивный отбор или обогащение клеток определенного типа, таких как те, которые экспрессируют маркер, относится к увеличению количества или процента таких клеток, но не приводит к полному отсутствию клеток, не экспрессирующих маркер. Аналогичным образом, негативный отбор, удаление или истощение клеток
10 определенного типа, например, экспрессирующих маркер, относится к уменьшению количества или процента таких клеток, но не приводит к полному удалению всех таких клеток.

В альтернативном варианте клетки могут быть получены из доступных на рынке культур клеток, включая, помимо прочего, для Т-клеток – линии BCL2 (AAA) Jurkat (ATCC® CRL-
15 2902™), BCL2 (S70A) Jurkat (ATCC® CRL-2900™), BCL2 (S87A) Jurkat (ATCC® CRL-2901™), BCL2 Jurkat (ATCC® CRL-2899™), Neo Jurkat (ATCC® CRL-2898™), TALL-104 (ATCC® CRL-11386); and, for NK cells, lines NK-92 (ATCC® CRL-2407™), NK-92MI (ATCC® CRL-2408™).

Неограничивающие источники примеров таких доступных на рынке клеточных линий
20 включают Американскую коллекцию типовых культур или ATCC (<http://www.atcc.org/>) и Германскую коллекцию микроорганизмов и клеточных культур (<https://www.dsmz.de/>).

Получение и размножение клеток

До или после генетической модификации иммунных клеток, предназначенных для экспрессии требуемых CAR, клетки могут быть активированы и размножены с помощью
25 общеизвестных методов или с помощью метода, быстро адаптированного к настоящей заявке, таких как методы, описанные в патентах США №№ 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7, 172,869; 7,232,566; 7, 175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041 и в публикации Заявки на патент США № 20060121005 комплекты для активации и размножения системы Life Technologies Dynabeads®;
30 наборы для активации BD Biosciences Phosflow™, наборы для активации/размножения Miltenyi Biotec MACS™ и другие доступные на рынке наборы клеток, специфичные для активационных компонентов соответствующей клетки. Стимуляция антигеном HLA-G *ex vivo* может активировать и размножить выбранную субпопуляцию клеток, экспрессирующих CAR. В

альтернативном варианте клетки могут быть активированы *in vivo* посредством взаимодействия с антигеном HLA-G.

Инкубация и/или инженерия могут производиться в сосуде для культивирования, таком как ячейка, камера, лунка, колонка, пробирка, набор пробирок, вальва, флакон, чашка для
5 культивирования, пакет или иная емкость для выращивания и размножения клеток.

В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют и/или выращивают до или для генной инженерии. Этапы инкубации могут включать выращивание на питательной среде, культивирование, стимуляцию, активацию и/или размножение. В некоторых вариантах осуществления композиции или клетки инкубируют в присутствии стимулирующих условий
10 или стимулирующего агента. Такие условия включают условия, разработанные для индукции пролиферации, размножения, активации и/или выживаемости клеток в популяции, для имитации воздействия антигена и/или для праймирования клеток для генной инженерии, например для введения рецептора рекомбинантного антигена. Условия могут включать одну или более определенных сред, температуру, содержание кислорода, содержание углекислого
15 газа, время, агенты, например, питательные вещества, аминокислоты, антибиотики, ионы и/или стимулирующие факторы, такие как цитокины, хемокины, антигены, партнеры по связыванию, слитые белки, рекомбинантные растворимые рецепторы и какие-либо иные агенты, предназначенные для активации клеток.

В некоторых вариантах осуществления иммунные клетки по изобретению можно
20 размножать *in vitro* путем совместного культивирования с тканью или клетками. Клетки также можно размножать *in vivo*, например, в крови субъекта после введения клетки субъекту.

Как правило, Т-клетки по изобретению могут быть размножены, например, посредством контакта с агентом, стимулирующим комплекс CD3 TCR, и костимулирующей молекулой на поверхности Т-клеток для создания сигнала активации для Т-клетки. Например, химические
25 вещества, такие как ионофор кальция A23187, форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА) или митогенные лектины, такие как фитогемагглютинин (РНА), могут быть использованы для создания сигнала активации для Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления популяции Т-клеток можно стимулировать *in vitro* посредством контакта, например, с антителом к CD3 или его антигенсвязывающим
30 фрагментом, или с поверхностно иммобилизованным антителом к CD2, или посредством контакта с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в комбинации с ионофором кальция. В некоторых вариантах осуществления популяции Т-клеток можно стимулировать *in vitro* посредством контакта с Muromonab-CD3 (ОКТ3). Для костимуляции

вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток используется лиганд, который связывает вспомогательную молекулу. Например, популяция Т-клеток может быть инкубирована с антителом к CD3 и антителом к CD28 в условиях, стимулирующих пролиферацию Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетки размножаются посредством добавления в композицию, стимулирующую рост, питающих клеток, таких как неделящиеся МКПК (например, таким образом, чтобы полученная популяция клеток содержала по меньшей мере около 5, 10, 20, 40 или большее количество питающих клеток МКПК на каждый Т-лимфоцит в исходной популяции, предназначенной для размножения); и инкубирования культуры (например, в течение времени, достаточного для увеличения количества Т-клеток). В некоторых аспектах настоящего изобретения неделящиеся питающие клетки могут содержать питающие клетки МКПК, облученные гамма-лучами. В некоторых вариантах осуществления МКПК облучают гамма-лучами в диапазоне от примерно 3000 до 3600 рад для предотвращения деления клеток. В некоторых аспектах питающие клетки добавляют в культуральную среду перед добавлением популяций Т-клеток.

В отдельных вариантах осуществления костимуляторные молекулы применяются для усиления активации, пролиферации и цитотоксичности Т-клеток, продуцируемых рецепторами CAR после взаимодействия с антигеном. Костимулирующий лиганд может включать в себя, помимо прочего: B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), B7-H3, BAFFR, BTLA, BLAME (SLAMF8), CD2, CD4, CD5, CD7, CD8a, CD8 β , CD1a, LFA-1 (CD11a/CD18), CD1b, CD1c, CD1d, CD18, CD19, CD19a, CD27, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD40, CD40MICA, CD49a, CD49D, CD49f, CD69, , CD70, CD83, CD84, CD96 (Tactile), CD 100 (SEMA4D), CD 103, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), CD160 (BY55), SELPLG (CD 162), DNAM1 (CD226), Ly9 (CD229), SLAMF4 (CD244, 2B4), ICOS (CD278), CEACAM1, CDS, CRTAM, DAP10, GADS, GITR, HVEM (LIGHTR), HLA-G, IA4, ICAM-1, IL2R β , IL2R γ , IL7R a, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB1, ITGB2, ITGB7, KIRDS2, LAT, LFA-1, LIGHT, LTBR, MICB, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), PAG/Cbp, PD-1, PD-L1, PD-L2, PSGL1, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAMF7, SLP-76, TNFR2, TRANCE/RANKL, VLA1, VLA-6, индуцибельный костимулирующий лиганд (ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (rCAM), рецептор лимфотоксина бета, 3 TR6, ILT3 и ILT4. Костимулирующий лиганд также может представлять собой, помимо прочего, антитело, которое специфически связывается с костимулирующей молекулой, присутствующей на Т-клетке, такой как, помимо прочего, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS,

функционально-связанный антиген лимфоцитов 1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, а также лиганд, который специфически связывается с CD83.

В некоторых вариантах осуществления популяции НК-клеток можно размножить *in vitro* при помощи интерлейкина-2 (IL-2), IL-15, комплекса IL-15/IL-15RA, IL-18 и IL-12. .

5 Условия, подходящие для культуры Т-клеток и НК-клеток, включают подходящую среду (например, Minimal Essential Media или RPMI Media 1640, или X-Vivo 10, X-Vivo 15 и X-Vivo 20 (Lonza)), которая может содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, фетальную бычью или человеческую сыворотку), интерлейкин-2 (IL-2), инсулин, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-2, IL-10, IL-18, IL-21, TGF и TNF или какие-либо другие добавки для роста клеток, известные 10 специалисту в данной области. В предпочтительном варианте осуществления Т-клетки стимулируются *in vitro* воздействием ОКТ3 и IL-2. Другие добавки для роста клеток включают, но не ограничиваются ими, поверхностно-активное вещество, плазманат и восстанавливающие агенты, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол. Среда может включать в себя RPMI 15 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 10, X-Vivo 15 и X-Vivo 20, оптимизатор, с добавленными аминокислотами, пируватом натрия и витаминами, без содержания сыворотки или с добавлением соответствующего количества сыворотки (или плазмы) или определенного набора гормонов, и/или количества цитокина(ов), достаточного для роста и размножения Т-клеток.

20 Антибиотики, например пенициллин и стрептомицин, вводятся только экспериментальным культурам, а не культурам клеток, предназначенным для введения субъекту. Клетки-мишени содержатся в условиях, необходимых для поддержания роста, например, при соответствующей температуре (например, 37 градусов Цельсия) и газовой среде (например, воздух плюс 5% CO₂). Т-клетки, стимуляция которых производилась в разные 25 сроки, могут проявлять разные характеристики.

В некоторых вариантах осуществления способы подготовки включают этапы замораживания, например криоконсервации, клеток до или после выделения, инкубации и/или инженерии. В некоторых вариантах осуществления в ходе этапа замораживания и последующего оттаивания удаляются гранулоциты и, в некоторой степени, моноциты, 30 содержащиеся в популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки суспендируют в замораживающем растворе, например, после стадии промывки для удаления плазмы и тромбоцитов. В некоторых аспектах может быть использован любой из ряда известных замораживающих растворов и параметров. Один из примеров включает

использование ФСБ, содержащего 20% ДМСО (диметилсульфоксида) и 8% сывороточного альбумина человека (ЧСА), или других подходящих сред для замораживания клеток. Затем его разбавляют средой 1:1 так, чтобы конечная концентрация ДМСО и ЧСА составляла 10% и 4% соответственно. Затем клетки замораживают до -80°C со скоростью 1 градус в минуту и хранят в паровой фазе резервуара для хранения жидкого азота.

В способы по настоящему изобретению НК-клетки или Т-клетки в предпочтительном варианте осуществления размножаются *ex vivo* в течение по меньшей мере около 5 дней, предпочтительно – по меньшей мере около 10 дней, более предпочтительно – по меньшей мере около 15 дней и наиболее предпочтительно – по меньшей мере около 20 дней перед введением пациенту.

В другом варианте осуществления перед введением пациенту НК-клетки или Т-клетки были размножены по меньшей мере примерно в 100 раз, предпочтительно по меньшей мере примерно в 200 раз, более предпочтительно – по меньшей мере примерно в 400 раз, более предпочтительно – по меньшей мере примерно в 600 раз, более предпочтительно – по меньшей мере примерно в 1000 раз, еще более предпочтительно – по меньшей мере примерно в 1500 раз по сравнению с 0 днем размножения.

Трансдукция и отбор клеток

Конструкция нуклеиновой кислоты по изобретению может быть трансдуцирована в иммунные клетки для создания иммунной клетки, экспрессирующей CAR к HLA согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления клетки трансдуцируются таким образом, чтобы они содержали по меньшей мере один CAR по настоящему изобретению.

Предполагается, что конструкция химерной нуклеиновой кислоты может вводиться в собственные иммунные клетки субъекта в виде голей ДНК или в подходящем векторе. Методы устойчивой трансфекции иммунных клеток, в частности Т-клеток, посредством электропорации с помощью голей ДНК известны в данной области. См., к примеру, Патент США. № 6410319. Голая ДНК обычно относится к ДНК, кодирующей химерный рецептор по настоящему изобретению, которая содержится в векторе экспрессии плазмиды в правильной ориентации для экспрессии. Преимущество использования голей ДНК заключается в сокращении времени, необходимого для получения Т-клеток, экспрессирующих химерный рецептор по настоящему изобретению. Физические методы введения конструкции нуклеиновой кислоты в клетку-хозяин включают осаждение фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и т. п.

В альтернативном варианте биологические методы введения представляющего интерес полинуклеотида в клетку-хозяин включают использование векторов ДНК и РНК. Для введения конструкции нуклеиновой кислоты по изобретению в иммунные клетки можно использовать ряд вирусных векторов, таких как вектор, описанный выше. Векторы, подходящие для использования в соответствии с методом по настоящему изобретению, не реплицируются в иммунных клетках субъекта.

В одном из вариантов осуществления конструкция нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR по изобретению, вводится в иммунную клетку с помощью вирусного вектора, в частности лентивирусного вектора, как описано выше.

В альтернативном варианте химические средства для введения полинуклеотида в клетку-хозяин включают коллоидные дисперсионные системы, такие как комплексы макромолекул, нанокапсулы, микросферы, микроносители, а также системы на основе липидов, включая водно-масляные эмульсии, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Типичной коллоидной системой для использования в качестве средства доставки *in vitro* и *in vivo* является липосома (например, искусственная мембранная везикула).

Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяин или иного воздействия на клетку ингибитора по настоящему изобретению, для подтверждения присутствия последовательности рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине может быть проведен ряд анализов. Такие анализы включают, например, «молекулярно-биологические» анализы, хорошо известные специалистам в данной области, такие как Southern и Northern блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; «биохимические» анализы, такие как обнаружение присутствия или отсутствия определенного пептида, к примеру, иммунологическими методами (ELISA и вестерн-блоттинг) или с помощью анализов, описанных в настоящем документе, для выявления агентов, подпадающих под объем настоящего изобретения. Методы тестирования CAR на способность распознавать клетки-мишени и на специфичность к антигенам известны в данной области. Например, в работе Clay et al., J. Immunol., 163:507-513 (1999), излагаются методы измерения высвобождения цитокинов (например, интерферона- γ , фактора, стимулирующего колонии гранулоцитов/моноцитов (GM-CSF), фактора некроза опухоли, (TNF- γ) или интерлейкина 2 (IL-2)). Кроме того, функция CAR может быть оценена путем измерения клеточной цитотоксичности, как описано в Zhao et al., J. Immunol., 174: 4415-4423 (2005).

После установления факта, что трансфицированная или трансдуцированная иммунная клетка способна экспрессировать химерный рецептор в виде поверхностного мембранного

белка с требуемой регуляцией и на требуемом уровне, можно определить, является ли химерный рецептор функциональным в клетке-хозяине для обеспечения индукции необходимого сигнала. Впоследствии трансдуцированные иммунные клетки могут быть дополнительно повторно введены субъекту или введены ему с целью активации

5 противоопухолевых ответов у субъекта. Чтобы облегчить введение, трансдуцированные Т-клетки по изобретению могут быть введены в виде фармацевтической композиции или в виде имплантата, подходящих для введения *in vivo* с фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями.

После введения субъекту экспрессирующих CAR клеток по изобретению, биологическая

10 активность сконструированных популяций клеток и/или антител в некоторых аспектах может быть измерена любым из ряда известных методов. Параметры оценки включают специфическое связывание с антигеном сконструированной или естественной Т-клетки или другой иммунной клетки *in vivo*, например, с помощью визуализации, или *ex vivo*, например, методом ИФА (ELISA) или проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления

15 способность сконструированных клеток разрушать клетки-мишени может быть измерена с помощью любого подходящего метода, известного в данной области, такого как анализы цитотоксичности, описанные, к примеру, в Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009), and Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004). В некоторых вариантах осуществления биологическая активность клеток также может быть измерена посредством

20 анализа экспрессии и/или секреции определенных цитокинов, таких как GM-CSF, IL-3, MIP-1 α , TNF- α , IL-10, IL-13, IFN- γ или ИЛ-2.

В некоторых аспектах настоящего изобретения биологическая активность измеряется посредством оценки клинического результата, такого как снижение массы опухоли или опухолевой нагрузки, стабилизация опухоли, выживаемость без прогрессирования или общая

25 выживаемость.

Фармацевтическая или ветеринарная композиция

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической или ветеринарной композиции, содержащей антитело или фрагмент антитела к HLA-G, CAR, конструкцию нуклеиновой кислоты, вектор и/или клетку, как было изложено выше.

30 В отдельном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической или ветеринарной композиции, содержащей клетки, предпочтительно иммунные клетки, содержащие CAR, как было сказано выше, и/или содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую его, как было сказано выше. В одном из аспектов настоящего

изобретения фармацевтическая или ветеринарная композиция может содержать по меньшей мере две разные популяции клеток, первая – с клетками, содержащими CAR, специфически связывающий HLA-G, ассоциированный с $\beta 2M$, в предпочтительном варианте реализации – HLA-G1 и HLA-G5, а вторая – с клетками, содержащими CAR, специфически связывающий HLA-G, не содержащий $\beta 2M$, предпочтительно HLA-G2 и HLA-G6, и/или изоформы HLA-G1 и HLA-G5, содержащие/не содержащие $\beta 2M$. В другом аспекте фармацевтическая или ветеринарная композиция может содержать популяцию клеток, содержащих по меньшей мере два CAR, первый CAR специфически связывает HLA-G, ассоциированным с $\beta 2M$, предпочтительно HLA-G1 и HLA-G5, а второй CAR специфически связывает HLA-G, не содержащий $\beta 2M$, предпочтительно HLA-G2 и HLA-G6, и/или изоформы HLA-G1 и HLA-G5, содержащие/не содержащие $\beta 2M$. В еще одном аспекте фармацевтическая или ветеринарная композиция может включать в себя популяцию клеток, содержащих биспецифический CAR, позволяющий специфически связывать HLA-G, ассоциированный с $\beta 2M$, предпочтительно HLA-G1 и HLA-G5, а также HLA-G, не содержащий $\beta 2M$, предпочтительно HLA-G2 и HLA-G6, и еще более предпочтительно – HLA-G2 и HLA-G6, и/или изоформы HLA-G1 и HLA-G5, содержащие/не содержащие $\beta 2M$.

В дополнительном аспекте изобретения фармацевтическая или ветеринарная композиция может содержать две популяции клеток, в первой из которых клетки экспрессируют один CAR или по меньшей мере два CAR, или биспецифический CAR, как было сказано выше, нацеленные на изоформы HLA-G, ассоциированные с $\beta 2M$ и/или изоформы HLA-G, не содержащие $\beta 2M$, и вторую популяцию клеток, экспрессирующих CAR, которые не распознают HLA-G, но распознают антиген, представляющий интерес для терапии с использованием CAR, такой как противоопухолевые и/или противовирусные виды терапии. Очевидно, что данная вторая популяция клеток, экспрессирующих CAR, не нацелена на HLA-G.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической или ветеринарной композиции, содержащей множество экспрессирующих CAR клеток по изобретению, таких как Т-клетки и/или НК-клетки. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель. Фармацевтическая композиция может опционально содержать один или более дополнительных фармацевтически активных полипептидов и/или соединений.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения концентрация клеток, экспрессирующих CAR согласно изобретению, которые включены в фармацевтическую или

ветеринарную композицию, составляет по меньшей мере 0,001 мг/мл, по меньшей мере 0,1 мг/мл, по меньшей мере 0,5 мг/мл, по меньшей мере 1 мг/мл, по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл, по меньшей мере 15 мг/мл, по меньшей мере 20 мг/мл, по меньшей мере 25 мг/мл, по меньшей мере 30 мг/мл, по меньшей мере 35 мг/мл, по меньшей мере 40 мг/мл, по меньшей мере 45 мг/мл, по меньшей мере 50 мг/мл, по меньшей мере 55 мг/мл, по меньшей мере 60 мг/мл, по меньшей мере 65 мг/мл, по меньшей мере 70 мг/мл, по меньшей мере 75 мг/мл, по меньшей мере 80 мг/мл, по меньшей мере 85 мг/мл, по меньшей мере 90 мг/мл, по меньшей мере 95 мг/мл, по меньшей мере 100 мг/мл, по меньшей мере 105 мг/мл, по меньшей мере 110 мг/мл, по меньшей мере 115 мг/мл, по меньшей мере 120 мг/мл, по меньшей мере 125 мг/мл, по меньшей мере 130 мг/мл, по меньшей мере 135 мг/мл, по меньшей мере 140 мг/мл, по меньшей мере 150 мг/мл, по меньшей мере 175 мг/мл, по меньшей мере 200 мг/мл, по меньшей мере 250 мг/мл, по меньшей мере 275 мг/мл или по меньшей мере 300 мг/мл.

В другом варианте осуществления концентрация клеток экспрессирующих CAR согласно изобретению, которые включены в фармацевтическую или ветеринарную композицию, составляет 0,001-0,01 мг/мл, 0,01-0,1 мг/мл, 0,1-1 мг/мл, 1-10 мг/мл, 10-50 мг/мл, 50-100 мг/мл, 50-150 мг/мл, 50-200 мг/мл, 50-250 мг/мл, 50- 300 мг/мл, 100-200 мг/мл, 100-300 мг/мл или 200-300 мг/мл.

В еще одном варианте осуществления фармацевтическая или ветеринарная композиция содержит клетки, экспрессирующие CAR согласно изобретению, в частности, по меньшей мере 100 клеток, по меньшей мере 200 клеток, по меньшей мере 400 клеток, по меньшей мере 500 клеток, по меньшей мере 700 клеток, по меньшей мере 1000 клеток, по меньшей мере 1500 клеток, по меньшей мере 2000 клеток, по меньшей мере 3000 клеток, по меньшей мере 5000 клеток, по меньшей мере 10 000 клеток, по меньшей мере 100 000 клеток, по меньшей мере 1 миллион клеток, по меньшей мере 10 миллионов клеток или по меньшей мере 100 миллионов клеток, экспрессирующих CAR согласно изобретению.

Фармацевтическая или ветеринарная композиция по изобретению может быть составлена для любого общепринятого способа введения, включая местное, энтеральное, пероральное, парентеральное, интраназальное, внутривенное, внутримышечное, подкожное или внутриглазное введение и т.п.

В предпочтительном варианте реализации фармацевтическая или ветеринарная композиция по изобретению может вводиться энтерально или парентерально. При парентеральном введении в предпочтительном варианте реализации фармацевтическая или ветеринарная композиция по изобретению вводится внутривенно. При энтеральном введении

в предпочтительном варианте реализации фармацевтическая или ветеринарная композиция по изобретению вводится перорально.

Специалисту в данной области будет понятно, что составы по настоящему изобретению могут быть изотоничными крови человека, то есть составы по настоящему изобретению имеют
5 практически такое же осмотическое давление, что и человеческая кровь. Осмотическое давление таких изотонических составов обычно равно примерно от 250 до 350 мОсм. Изотоничность может быть измерена, например, с помощью осмометра, работающего на принципе давления пара или кристаллизации льда. Тоничность состава регулируется с помощью модификаторов тоничности. «Модификаторы тоничности» представляют собой
10 фармацевтически приемлемые инертные вещества, которые могут быть добавлены в состав для обеспечения изотоничности состава. Модификаторами тоничности, подходящими для данного изобретения, являются (не ограничиваясь ими) сахараиды, соли и аминокислоты.

Композиции и составы для парентерального, интратекального или внутрижелудочкового введения могут включать в себя стерильные водные растворы, которые также могут содержать
15 буферы, разбавители и другие подходящие добавки, такие как, помимо прочего, усилители проникновения, вещества-носители и иные фармацевтически приемлемые носители или вспомогательные вещества.

Фармацевтическая или ветеринарная композиция по изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Таким образом, дополнительные аспекты
20 изобретения относятся к композициям, содержащим носитель, а также один или более продуктов, например, клетку, содержащую CAR против HLA-G, нуклеиновую кислоту, вектор, антитело или фрагмент антитела к HLA-G, о чем говорится в вариантах осуществления изобретения, раскрытых в настоящем документе. Данные составы можно стерилизовать и, при желании, смешивать со вспомогательными агентами, такими как носители и вспомогательные
25 вещества, которые не взаимодействуют, вызывая негативный эффект, с данными продуктами, например, с клеткой, содержащей CAR против HLA-G, нуклеиновой кислотой, вектором, антителом или фрагментом антитела к HLA-G, входящими в состав препарата.

В предпочтительном варианте реализации фармацевтические или ветеринарные композиции по настоящему изобретению, включая, но не ограничиваясь, любую из заявленных
30 композиций, могут содержать экспрессирующие CAR клетки, как сказано в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или наполнителями, как сказано ниже. Желательно использовать фармацевтически приемлемую форму, которая не оказывает отрицательного

воздействия на желаемые иммуностимулирующие эффекты рекомбинантных клеток согласно изобретению.

Чтобы облегчить введение препарата, трансдуцированные иммунные клетки, предпочтительно Т-клетки и/или NK-клетки, трансдуцированные конструкцией нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR согласно изобретению, могут быть включены в фармацевтическую композицию для введения *in vivo* с соответствующими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями. Способы создания такой композиции описаны в данной области техники (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins, 21st edition (2005)).

В частности, составы, содержащие популяции клеток, экспрессирующих CAR, могут включать в себя фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества. Вспомогательные вещества, включенные в составы, будут иметь различное назначение в зависимости, например, от конструкции CAR, используемой субпопуляции клеток и способа введения. Составы, содержащие популяции экспрессирующих CAR клеток, обычно готовились и выращивались при отсутствии каких-либо компонентов не человеческого происхождения, таких как сыворотка животных (например, альбумин бычьей сыворотки).

Состав или композиция также могут содержать более одного активного ингредиента, полезного для конкретного показания, заболевания или состояния, которые лечатся связывающими молекулами или клетками, действие которых в предпочтительном варианте реализации комплементарно связывающей молекуле или клетке, причем соответствующие виды действия не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Такие активные ингредиенты содержатся в надлежащем сочетании, в количествах, эффективных для предполагаемой цели.

В некоторых аспектах изобретения в фармацевтической или ветеринарной композиции могут использоваться системы доставки с растянутым во времени высвобождением, отсроченным высвобождением и замедленным высвобождением, так что доставка композиции происходит до лечения, обеспечивая достаточное время, чтобы вызвать сенсibilизацию участка, подлежащего лечению. Средства, известные в данной области, могут быть использованы для предотвращения или минимизации высвобождения и всасывания композиции до тех пор, пока она не достигнет ткани или органа-мишени, или для обеспечения высвобождения композиции в течение требуемого времени. Такие системы позволяют избежать повторных введений композиции, тем самым делая это более удобным для пациента и врача.

Задача, схема и способ введения препарата

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению или клеткам, экспрессирующим CAR по настоящему изобретению, для применения в качестве лекарственного средства или для лечения заболевания или расстройства у субъекта. Оно также относится к применению фармацевтической композиции по настоящему изобретению или клеток, экспрессирующих CAR по настоящему изобретению, в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства у субъекта. В конечном счете, оно относится к способу лечения заболевания или расстройства у субъекта, включающему в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по настоящему изобретению или экспрессирующих CAR клеток по настоящему изобретению.

Субъект-человек согласно изобретению может быть человеком на пренатальной стадии, новорожденным, ребенком, младенцем, подростком или взрослым, в частности взрослым в возрасте не менее 40 лет, предпочтительно – взрослым в возрасте не менее 50 лет, более предпочтительно – взрослым в возрасте не менее 60 лет, еще более предпочтительно – взрослым в возрасте не менее 70 лет.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субъектом является валидированная животная модель заболевания для проведения адоптивной клеточной терапии и/или для оценки последствий интоксикации, таких как синдром высвобождения цитокинов (CRS).

В некоторых вариантах реализации субъект страдает хроническим или рецидивирующим заболеванием, к примеру, после лечения другой иммунотерапией и/или другой терапией, включая химиотерапию, лучевую терапию и/или трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), например, аллогенную ТГСК. В некоторых вариантах реализации введение препарата эффективно лечит субъекта, несмотря на то, что у субъекта выработалась резистентность к другой терапии. В некоторых вариантах реализации у субъекта нет рецидива, но было установлено, что он подвержен риску рецидива, к примеру, высокому риску рецидива, и поэтому препарат или композиция вводится для профилактики, например, для снижения вероятности или предотвращения рецидива.

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение включает в себя введение клеток, экспрессирующих CAR по настоящему изобретению, или композиции, содержащей экспрессирующие CAR клетки, субъекту, такому как субъект, имеющий заболевание, болезненное состояние или расстройство, или подверженный риску вышеуказанного, или

имеющий симптомы для подозрения на вышеуказанное. В некоторых вариантах реализации данные клетки и композиции вводятся субъекту, имеющему определенное заболевание или состояние, которое необходимо лечить, к примеру, адоптивной клеточной терапией, такой как адоптивная терапия Т-клетками. В некоторых вариантах реализации клетки или композиции
5 вводят субъекту, такому как субъект, имеющий или подверженный риску заболевания или болезненного состояния. В некоторых аспектах настоящего изобретения данные способы лечат, к примеру, облегчают один или более симптомов заболевания или болезненного состояния. В предпочтительном варианте реализации у субъекта было диагностировано иммунное заболевание, предпочтительно рак. Методы диагностики аутоиммунного
10 заболевания или рака хорошо известны специалистам в данной области.

В отдельном варианте реализации субъект уже получил по меньшей мере одну линию терапии, предпочтительно несколько линий терапии, до введения иммунных клеток по изобретению или фармацевтической или ветеринарной композиции по изобретению.

В предпочтительном варианте реализации лечение проводится регулярно:
15 предпочтительно с регулярностью от ежедневного до ежемесячного, более предпочтительно – от ежедневного до одного раза в две недели, более предпочтительно – от ежедневного до еженедельного, еще более предпочтительно – лечение проводится ежедневно. В отдельном варианте реализации лечение проводится несколько раз в день, предпочтительно 2 или 3 раза в день, еще более предпочтительно – 3 раза в день.

Продолжительность лечения вектором по изобретению, иммунными клетками по изобретению или фармацевтической или ветеринарной композицией по изобретению в предпочтительном варианте реализации составляет от 1 дня до 20 недель, более предпочтительно – от 1 дня до 10 недель, еще более предпочтительно – от 1 дня до 4 недель, еще более предпочтительно – от 1 дня до 2 недель. В отдельном варианте реализации
25 продолжительность лечения составляет около 1 недели. В альтернативном варианте лечение может длиться столько, сколько продолжается болезнь.

Форма фармацевтических или ветеринарных композиций, способ и доза введения иммунных клеток по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению могут быть скорректированы специалистом в данной области в зависимости от типа и степени
30 тяжести инфекционного заболевания, возраста, веса, пола и общего физического состояния пациента. Композиции по настоящему изобретению можно вводить несколькими способами в зависимости от того, какое лечение требуется – местное или системное.

В случае применения адоптивной клеточной терапии способы введения клеток для адоптивной клеточной терапии известны и могут применяться в связи с предлагаемыми методами и композициями. К примеру, методы адоптивной Т-клеточной терапии описаны, например, в публикации заявки на патент США № 2003/0170238, выданной Gruenberg и др.;
5 Патенте США № 4,690,915, выданном Rosenberg; Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol.* 8(10):577-85). См., к примеру, Themeli et al. (2013) *Nat Biotechnol.* 31 (10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338.

Для специалиста в данной области очевидно, что несмотря на то, что для введения
10 препарата можно использовать несколько путей, один из путей может обеспечить более быструю и эффективную реакцию, чем другой путь. Например, для лечения меланомы внутрикожная доставка препарата может быть более эффективной, чем ингаляция. Местная или системная доставка может осуществляться путем введения такими способами, как нанесение или закапывание композиции в полости тела, ингаляция или вдывание аэрозоля, или
15 путем парентерального введения такими способами, как внутримышечное, внутривенное, интрапортальное, внутripеченочное, перитонеальное, подкожное или внутрикожное введение.

Несмотря на то, что системные (внутривенные, ВВ) инъекции являются более предпочтительными в клиническом применении в связи с более простым введением, в
20 нескольких доклинических исследованиях (Carpenito, et al. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:3360-3365; Song, et al. (2011) *Cancer Res.* 71:4617-4627; Parente-Pereira, et al. (2011) *J. Clin. Immunol.* 31:710-718) высказывается предположение, что региональное (внутриопухолевое, ВО или внутрибрюшинное, ВБ) введение Т-клеток может обеспечить оптимальный терапевтический эффект, что отчасти может быть связано с повышенным переносом Т-клеток
25 в опухоль. Например, было показано, что при доставке внутрибрюшинным или внутриопухолевым введением Т-клетки CAR остаются в месте инокуляции с минимальным системным всасыванием (Parente-Pereira, et al. (2011) *J. Clin. Immunol.* 31:710-718). Напротив, после внутривенного введения Т-клетки CAR сначала достигают легких, а затем перераспределяются в селезенку, печень и лимфатические узлы. Кроме того, Т-клетки,
30 электропорированные CAR РНК, могут быть особенно подходящими для регионального введения в связи с временным характером экспрессии CAR на Т-клетках (Zhao, et al. (2010) *Cancer Res.* 70:9053-9061). Кроме того, клинические исследования продемонстрировали осуществимость и безопасность как внутриопухолевой, так и внутрибрюшинной инъекции Т-

клеток (Canevari, et al. (1995) J. Natl. Cancer Inst. 87:1463-1469; Duval, et al. (2006) Clin. Cancer Res. 12:1229-1236). В целом, местный способ введения рекомбинантных Т-клеток может обеспечить оптимальный терапевтический эффект и снизить вероятность токсичности «на мишени, вне органа». Соответственно, в одном из вариантов осуществления изобретения

5 клетки, экспрессирующие CAR по изобретению, вводятся местно, предпочтительно путем внутритуморальной и внутривентрикулярной инъекции.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция содержит клетки CAR в количествах, эффективных для лечения или предотвращения заболевания или болезненного состояния, таких как терапевтически эффективное или профилактически эффективное

10 количество. В некоторых вариантах реализации терапевтическая или профилактическая эффективность отслеживается путем периодической оценки субъектов, получающих лечение. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение повторяют до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Однако могут быть эффективны и определены также и другие режимы

15 дозирования. Желаемая доза может быть доставлена однократным болюсным введением композиции, многократным болюсным введением композиции или непрерывным инфузионным введением композиции. Количество иммунных клеток по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению, предназначенное для введения, может быть определено при помощи стандартной процедуры, хорошо известной специалистам в данной

20 области. Для определения подходящей дозировки, то есть, чтобы пациенту было введено терапевтически эффективное количество препарата, необходимо учесть физиологические данные пациента (например, возраст, габариты, вес, состояние здоровья, а также вес реципиента, вид сопутствующего лечения, если таковое имеется, регулярность лечения и характер желаемого эффекта) и пути введения препарата. В частности, подходящие дозировки

25 и режим дозирования могут быть определены на основе клинических исследований или хорошо зарекомендовавшей себя клеточной терапии (см. к примеру, Topalian & Rosenberg (1987) Acta Haematol. 78 Suppl 1:75-6; US 4,690,915), или в качестве альтернативы может быть использована стратегия непрерывной инфузии.

В некоторых вариантах реализации эффективное количество клеток или

30 фармацевтической композиции, содержащей эти клетки, вводится парентерально. В некоторых вариантах введение может быть внутривенным. В некоторых вариантах препарат может быть введен непосредственно путем инъекции внутрь опухоли.

В некоторых вариантах реализации в случае использования генно-инженерных клеток, экспрессирующих CAR, субъекту вводится от примерно одного миллиона до примерно 100 миллиардов клеток, например, от 1 миллиона до примерно 50 миллиардов клеток (например, около 5 миллионов клеток, около 25 миллионов клеток, около 500 миллионов клеток, около 1 миллиарда клеток, около 5 миллиардов клеток, около 20 миллиардов клеток, около 30 миллиардов клеток, около 40 миллиардов клеток или количество в диапазоне между любыми двумя из вышеуказанных значений), к примеру, от примерно 10 миллионов до примерно 100 миллиардов клеток (например, около 20 миллионов клеток, около 30 миллионов клеток, около 40 миллионов клеток, около 60 миллионов клеток, около 70 миллионов клеток, около 80 миллионов клеток, около 90 миллионов клеток, около 10 миллиардов клеток, около 25 миллиардов клеток, около 50 миллиардов клеток, около 75 миллиардов клеток, около 90 миллиардов клеток или количество в диапазоне между любыми двумя из вышеуказанных значений), а в некоторых случаях от примерно 100 миллионов клеток до примерно 50 миллиардов клеток (например, около 120 миллионов клеток, около 250 миллионов клеток, около 350 миллионов клеток, около 450 миллионов клеток, около 650 миллионов клеток, около 800 миллионов клеток, около 900 миллионов клеток, около 3 миллиардов клеток, около 30 миллиардов клеток, около 45 миллиардов клеток) или любое значение между этими диапазонами и/или такое количество клеток на килограмм веса тела субъекта. Например, в некоторых вариантах реализации введение клеток или популяции клеток может включать в себя введение от примерно 10^3 до примерно 10^9 клеток на килограмм веса тела, включая все целые значения количества клеток в этих диапазонах, например, клеточные композиции по настоящему изобретению могут вводиться в дозе или дозировках, в которых каждая доза содержит не менее 10 клеток/кг веса тела, не менее 100 клеток/кг веса тела; не менее 1000 клеток/кг веса тела; не менее 10 000 клеток; не менее 100 000 клеток; не менее 1 миллиона клеток; не менее 10 миллионов клеток; не менее 100 миллионов клеток; не менее 1 миллиарда клеток или не менее 10 миллиардов клеток/кг веса тела.

В частности, для достижения желаемого терапевтического ответа должно быть введено достаточное количество трансдуцированных иммунных клеток. Желательно, чтобы в композиции присутствовало эффективное количество или достаточное количество выделенных трансдуцированных клеток, которые должны быть введены субъекту так, чтобы вызвать долгосрочные, специфические, противоопухолевые или противомикробные реакции для уменьшения размера или повторного роста опухоли или роста возбудителя инфекции, которые имели бы место при отсутствии такого лечения. Желательно, чтобы

количество трансдуцированных иммунных клеток, предпочтительно Т-клеток, повторно введенных субъекту, вызывало 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или 100%-ное уменьшение размера опухоли по сравнению с теми же условиями, в которых отсутствуют трансдуцированные иммунные клетки.

5 Композиция по настоящему изобретению может предоставляться в единичных лекарственных формах, где каждая единица дозирования, например инъекция, содержит заранее определенное количество композиции в отдельности или в соответствующем сочетании с другими активными агентами. Термин «единичная лекарственная форма», используемый в настоящем документе, относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для человеческих и субъектов-животных. Каждая единица содержит заранее определенное количество композиции по настоящему изобретению в отдельности или в комбинации с другими активными агентами, рассчитанными в количестве, достаточном для достижения желаемого эффекта, в комбинации с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем, где это необходимо. Спецификации новых единичных лекарственных форм по изобретению зависят от конкретной фармакодинамики, связанной с фармацевтической композицией в определенном субъекте.

Клетки или популяция клеток можно вводить одной или несколькими дозами. В некоторых вариантах реализации указанное эффективное количество клеток можно вводить в виде разовой дозы. В некоторых вариантах реализации указанное эффективное количество клеток можно вводить несколькими дозами в течение определенного периода времени. Время введения определяется лечащим врачом и зависит от клинического состояния пациента. Несмотря на то, что индивидуальные потребности различны, определение оптимальных диапазонов эффективных количеств данного типа клеток для конкретного заболевания или болезненного состояния находится в пределах компетенции специалистов в данной области.

25 Эффективное количество означает количество, которое обеспечивает терапевтический или профилактический эффект.

Для целей настоящего изобретения количество или доза вводимого материала CAR по изобретению должна быть достаточной для создания терапевтического или профилактического ответа у субъекта в течение объективно необходимого срока. Например, доза материала CAR по изобретению должна быть достаточной для связывания с антигеном, к примеру, с изоформой(ами) HLA-G, или для обнаружения, лечения или предотвращения заболевания в период продолжительностью примерно от 2 часов или дольше, например, от примерно 12 до примерно 24 или более часов с момента введения. В некоторых вариантах

осуществления данный период времени даже может быть больше. Доза должна определяться в зависимости от эффективности конкретного материала CAR по изобретению и состояния субъекта, а также массы тела субъекта, подлежащего лечению.

Для целей настоящего изобретения анализ, включающий в себя, к примеру, сравнение количественных показателей лизирования клеток-мишеней или секреции IFN- γ Т-клетками, экспрессирующими CAR, полипептид или белок по изобретению при введении данной дозы таких Т-клеток млекопитающему, входящему в группу млекопитающих, каждое из которых получает различную дозу Т-клеток, может быть использован для определения начальной дозы, предназначенной для введения млекопитающему. Количественные показатели лизирования клеток-мишеней или секреции IFN- γ Т-клетками при введении определенной дозы можно определить с помощью методов, известных в данной области.

Виды применения

Применение в лечении заболеваний или расстройств и в Комбинированной терапии

В одном из аспектов настоящего изобретения подлежащее лечению заболевание или расстройство представляет собой состояние, вызванное одним из следующих заболеваний: пролиферативное заболевание или расстройство, предпочтительно рак; инфекционное заболевание или расстройство, предпочтительно вирусная инфекция; воспалительное заболевание или расстройство; а также иммунное заболевание или расстройство, предпочтительно аутоиммунные или аутоаллергические заболевания, аллергии и отторжение трансплантата. В некоторых вариантах реализации данное состояние может быть вызвано раком.

Настоящее изобретение относится к использованию антитела, клетки, конструкции нуклеиновой кислоты, вектора и/или фармацевтической композиции по изобретению для интерференции или нейтрализации понижающей регуляции иммунитета, вызванной белками HLA-G, в организме хозяина при необходимости в этом.

В частности, клетка, конструкция нуклеиновой кислоты, вектор и/или фармацевтическая композиция по изобретению особенно эффективны в лечении вирусных инфекций, таких как, например, ВИЧ-1, вирус гепатита В и гепатита С.

В частности, клетка, конструкция нуклеиновой кислоты, вектор и/или фармацевтическая композиция по изобретению особенно эффективны в лечении рака, в частности в лечении солидных опухолей или рака кроветворной системы, даже более предпочтительно, если наличие хороших селективных одиночных мишеней ограничено.

Иммунная система способна специфически идентифицировать и уничтожать опухолевые клетки исходя из экспрессии в них опухолеспецифических антигенов или молекул, индуцированных во время трансформации злокачественных клеток. Этот процесс называется иммунным надзором над опухолью. Несмотря на иммунный надзор над опухолью, опухоли все же могут развиваться при наличии функционирующей иммунной системы. Это происходит за счет иммуноредактирования опухоли – процесса, который включает в себя три основные стадии: 1) стадия уничтожения, в которой большинство иммуногенных опухолевых клеток уничтожается цитотоксическими Т- и NK-клетками; 2) стадия равновесия, в которой происходит отбор опухолевых клеток с пониженной иммуногенностью; и 3) стадия ускользания, в которой продуцируются виды клеток, которые больше не реагируют на иммунную систему организма хозяина (Urosevic and Dummer, 2008). HLA-G участвует в каждой стадии иммуноредактирования опухоли, тормозя уничтожение опухолевых клеток за счет ингибирования цитотоксической функции Т- и NK-клеток, а также за счет трогицитоза (т.е. межклеточного переноса жизнеспособных молекул HLA-G), что делает компетентные цитотоксические клетки невосприимчивыми к опухолевым антигенам (LeMaoult et al., 2007; Caumartin et al., 2007). Поэтому химерные конструкции по настоящему изобретению находят применение в лечении субъектов, имеющих или подозреваемых в наличии заболевания, расстройства или особого состояния, в частности субъектов, больных раком или подозреваемых в наличии рака. В частности, химерные конструкции по настоящему изобретению находят применение в лечении субъектов, больных раком или подозреваемых в наличии рака, при котором они сокращают размер опухоли или предотвращают рост или повторный рост опухоли у этих субъектов, или предотвращают индукцию иммуносупрессивной микросреды.

Соответственно, настоящее изобретение также относится к способам ингибирования роста опухоли у субъекта при необходимости в этом, и/или для лечения пациента, больного раком, при необходимости в этом. Опухоль может быть солидной или жидкой. В некоторых вариантах реализации опухоль или рак экспрессирует или сверхэкспрессирует HLA-G. В некоторых вариантах реализации данные способы включают в себя, или в альтернативном варианте – в основном заключаются, или же дополнительно включают в себя введение субъекту или пациенту эффективного количества изолированных клеток. В других вариантах реализации клетка, экспрессирующая CAR по изобретению, представляет собой Т-клетку или NK-клетку. Данная изолированная клетка может быть аллогенной или аутологичной по отношению к субъекту или пациенту, получающему лечение. В дополнительном аспекте

настоящего изобретения опухоль экспрессирует или сверхэкспрессирует антиген HLA-G, а субъект был выбран для лечения посредством диагностики.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу сокращения роста или предотвращения образования опухоли у субъекта путем введения химерной конструкции по настоящему изобретению в иммунную клетку, предпочтительно Т-клетку или NK-клетку субъекта, и повторного введения субъекту трансформированной иммунной клетки, тем самым вызывая экспрессию CAR по изобретению и противоопухолевые ответы для сокращения или уничтожения опухолей у субъекта. Этап доставки конструкции нуклеиновой кислоты субъекту обычно включает в себя введение конструкции нуклеиновой кислоты по изобретению в изолированную иммунную клетку (например, аутологичную иммунную клетку, выделенную из МКПК (мононуклеарных клеток периферической крови), или иммунные клетки, полученные от стороннего аллогенного донора иммунных клеток) и введение субъекту трансформированной иммунной клетки, тем самым вызывая противоопухолевые ответы для сокращения или уничтожения опухолей у субъекта, как в методе адоптивной Т-клеточной терапии. К примеру, иммунная клетка может содержать Т-клетку, а у субъекта имеется опухоль или рак, или подозрения на их наличие, или соответствующий диагноз, например, рак, экспрессирующий HLA-G. К примеру, молекулы CAR против HLA-G, кодируемые типичными конструкциями нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, могут вводиться субъекту в виде рекомбинантных иммунных клеток, сконструированных для экспрессии молекулы CAR против HLA-G.

Клетки, экспрессирующие CAR по изобретению и полученные описанными выше способами, или клеточные линии, полученные из таких клеток, могут быть использованы в качестве лекарственного средства при лечении заболевания, расстройства или болезненного состояния у субъекта. В некоторых вариантах реализации такое лекарственное средство можно использовать для лечения рака.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения лечение субъекта может включать в себя адоптивную клеточную терапию (АКТ) с использованием иммунных клеток, собранных у субъекта или у одного или нескольких доноров. Соответственно, клетки могут быть ксеногенными, аллогенными или аутологичными по отношению к субъекту. Как правило, клетки являются аутологичными к субъекту.

В некоторых вариантах реализации клеточная терапия, к примеру, адоптивная клеточная терапия, например адоптивная Т-клеточная терапия проводится посредством аутологичного переноса, при котором клетки выделяют и/или иным образом получают из субъекта, которому

предстоит пройти клеточную терапию, или из образца, полученного от такого субъекта. Таким образом, в некоторых аспектах настоящего изобретения клетки берутся у субъекта, например пациента, нуждающегося в лечении. После выделения и обработки эти клетки вводятся этому же субъекту.

5 В некоторых вариантах реализации клеточная терапия, к примеру, адоптивная клеточная терапия, например адоптивная Т-клеточная терапия проводится посредством аллогенного переноса, при котором клетки выделяются и/или иным образом получают от субъекта, не являющегося тем субъектом, который должен получать или кто в конечном итоге получает клеточную терапию, условно – от «первого субъекта». В таких вариантах клетки затем вводят
10 другому субъекту, условно «второму субъекту» этого же вида. В некоторых вариантах реализации первый и второй субъекты генетически идентичны. В некоторых вариантах первый и второй субъекты генетически схожи. В некоторых вариантах второй субъект экспрессирует тот же класс или супертип HLA, что и первый субъект. Клетки по настоящему изобретению могут быть способны убивать клетки-мишени, такие как раковые клетки. Клетка-мишень
15 может быть узнаваема по определенному профилю экспрессии антигена, например экспрессии антигена А или антигена В.

В некоторых вариантах осуществления АКТ может включать в себя выделение первичных иммунных клеток у субъекта или у одного или нескольких доноров, трансдукцию первичных иммунных клеток конструкцией или конструкциями нуклеиновой кислоты по
20 любому из вышеизложенных вариантов осуществления, экспрессию CAR в трансдуцированных первичных иммунных клетках, и доставку трансдуцированных иммунных клеток субъекту. АКТ может дополнительно включать в себя стимуляцию и/или размножение иммунных клеток перед доставкой трансдуцированных иммунных клеток субъекту.

К примеру, в некоторых вариантах осуществления АКТ может включать в себя сбор
25 аутологичных или аллогенных Т-клеток и трансдукцию этих Т-клеток одной или несколькими конструкциями нуклеиновых кислот, таким образом, чтобы Т-клетки экспрессировали CAR, опосредующий экспрессию провоспалительных цитокинов, а последующее вливание клеток субъекту при необходимости этого.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения рака, включающий в себя
30 доставку нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества конструкций нуклеиновой кислоты, вектора или векторов или трансдуцированных иммунных клеток или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вышеизложенных вариантов осуществления, таким образом осуществляя лечение рака. В некоторых вариантах реализации

прогресс в лечении рака можно количественно оценивать по уменьшению количества опухолевых клеток или повышению выживаемости.

В изобретении дополнительно предложен способ иммунотерапии, включающий в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества конструкции или конструкций нуклеиновой кислоты, вектора или векторов, рекомбинантной клетки или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вышеизложенных вариантов осуществления изобретения. Лечение клетками по изобретению может помочь предотвратить ускользание или выброс опухолевых клеток, которые часто происходят при стандартных подходах.

В некоторых вариантах реализации экспрессирующие CAR клетки модифицируются несколькими способами таким образом, чтобы их терапевтическая или профилактическая эффективность увеличивалась. Например, CAR может быть конъюгирован напрямую или опосредованно через линкер с нацеливающим фрагментом. Практика конъюгирования соединений, например CAR, с нацеливающими фрагментами известна в данной области. См., к примеру, Wadhwa et al., J. Drug Targeting 1995;3(2): 111-127 и патент США № 5,087,616. В частности, настоящее изобретение включает в себя один из видов клеточной терапии, при котором изолированные клетки генетически модифицируются для экспрессии CAR, а клетка CAR вводится субъекту при необходимости этого. Такое введение может стимулировать активацию клеток (например, активацию Т-клеток) специфическим для мишени образом, так что клетки заболевания или расстройства становятся мишенью для разрушения. В случае, если данная клетка является Т-клеткой, Т-клетки CAR, в отличие от терапии антителами, способны реплицироваться в условиях *in vivo*, что приводит к длительной персистенции, что может привести к устойчивому контролю целевых заболеваний, расстройств или болезненных состояний.

Согласно изложенному в данном документе, экспрессирующие CAR клетки могут вводиться отдельно или в комбинации с разбавителями, известными противораковыми терапевтическими средствами и/или иными компонентами, такими как цитокины или другие иммуностимулирующие популяции клеток. Их можно вводить в качестве терапии первой линии, терапии второй линии, терапии третьей линии или дополнительной терапии.

В некоторых вариантах реализации экспрессирующие CAR клетки вводятся в рамках комбинированной терапии, например, одновременно или последовательно в любом порядке с другим терапевтическим вмешательством, таким как антитело или сконструированная клетка, или рецептор или агент, такой как цитотоксический или терапевтический агент. Клетки или антитела в некоторых вариантах реализации вводят совместно с одним или несколькими

дополнительными терапевтическими агентами или в связи с другим терапевтическим вмешательством, одновременно или последовательно в любом порядке. В некоторых случаях клетки вводятся совместно с другой терапией, достаточно близкой по времени, таким образом, чтобы клеточные популяции усиливали эффект одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов или наоборот. В некоторых вариантах реализации клетки или антитела вводятся до введения одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах клетки или антитела вводятся после введения одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов, таких как противораковые агенты. «Противораковый» агент способен оказывать негативное воздействие на рак в организме субъекта, например, убивая раковые клетки, вызывая апоптоз в раковых клетках, снижая скорость роста раковых клеток, снижая частоту или количество метастазов, уменьшая размер опухоли, ингибируя рост опухоли, снижая кровоснабжение опухоли или раковых клеток, стимулируя иммунный ответ против раковых клеток или опухоли, предотвращая или ингибируя прогрессирование рака, или увеличивая продолжительность жизни больного раком субъекта. В более общем случае, эти композиции с другим составом могут быть предоставлены в комбинированном количестве, эффективном для уничтожения или ингибирования пролиферации клетки. Этот процесс может включать в себя контактирование раковых клеток с клеткой, экспрессирующей CAR по изобретению, и агентом(ами) или множественным фактором(ами) одновременно. Это может быть достигнуто посредством контактирования клетки с единичной композицией или фармакологическим составом, содержащим оба агента, или посредством контакта клетки с двумя различными композициями или составами одновременно, при этом одна композиция содержит экспрессионную конструкцию, а другая – второй агент(ы).

В отдельном варианте реализации клетки, экспрессирующие CAR против изоформ HLA-G по изобретению, вводятся в рамках комбинированной терапии, например, одновременно или последовательно в любом порядке с другими экспрессирующими CAR клетками, которые не распознают HLA-G, однако известно, что они полезны в других видах терапии с использованием CAR, таких как противоопухолевые и/или противовирусные виды терапии CAR. Такие экспрессирующие CAR клетки нацеливают антиген, участвующий в заболевании, предпочтительно таком, как рак или вирусная инфекция, предпочтительно – антиген, нацеленный на противораковые или противовирусные виды терапии. Очевидно, что такой антиген не является HLA-G.

В контексте настоящего изобретения предполагается, что клеточная терапия может использоваться аналогичным образом в комбинации с химиотерапевтическим, радиотерапевтическим или иммунотерапевтическим вмешательством, а также с проапоптотическими агентами или агентами, регулирующими клеточный цикл, такими как ингибитор иммунных контрольных точек.

В альтернативном варианте реализации терапия по настоящему изобретению может предшествовать или следовать за лечением другим препаратом с интервалами от нескольких минут до нескольких недель. В вариантах осуществления, где другой препарат и настоящее изобретение вводятся субъекту лечения по отдельности, как правило, можно обеспечить, чтобы между доставками обоих препаратов не прошел слишком большой период времени, так, чтобы другой препарат и терапия по изобретению были способны оказывать благоприятное комбинированное воздействие на клетку. В таких случаях предусмотрено, что можно применять к клетке оба способа воздействия с интервалом в пределах около 12-24 часов между ними и, более предпочтительно – в пределах около 6-12 между ними. Однако в некоторых ситуациях может быть желательно значительно продлить период лечения, чтобы между соответствующими введениями препаратов был промежуток времени от нескольких дней (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Предполагается, что циклы лечения будут повторяться по мере необходимости. Также предполагается, что различные стандартные методы лечения, а также хирургическое вмешательство могут применяться в комбинации с клеточной терапией по настоящему изобретению.

Целевые виды рака

HLA-G аномально экспрессируется во многих солидных злокачественных опухолях *in situ* человека и при многих злокачественных гематопоезических заболеваниях, включая рак груди, рак яичников, светлоклеточный рак почки, рак толстой и прямой кишок, рак желудка, пищевода, легких и печеночно-клеточный рак, а также острый миелоидный лейкоз и хронический лимфолейкоз (ХЛЛ). Аберрантная экспрессия HLA-G в злокачественном новообразовании в значительной степени коррелирует с неблагоприятным клиническим исходом у пациентов с раком толстой и прямой кишок (РТПК), раком желудка (РЖ), немелкоклеточным раком легких (НМРЛ), плоскоклеточным раком пищевода (ПКРП), раком груди, печеночно-клеточным раком и ХЛЛ. Кроме того, у пациентов с различными типами рака (включая пациентов с меланомой, острым лейкозом, множественной миеломой, нейробластомой, лимфопролиферативными расстройствами, раком груди или яичников,

немелкоклеточным раком легких, раком пищевода, раком толстой и прямой кишок; раком желудка и печеночно-клеточной карциномой) повышается содержание растворимого в сыворотке HLA-G по сравнению с нормальным здоровым контролем или доброкачественными заболеваниями.

5 Раковые образования, которые можно лечить экспрессирующей CAR клеткой, конструкцией нуклеиновой кислоты, вектором или фармацевтической композицией по изобретению, включают неваккуляризованные опухоли или опухоли еще не ваккуляризованные в значительной степени, а также ваккуляризованные опухоли.

10 Экспрессирующая CAR клетка, конструкция нуклеиновой кислоты, вектор или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения следующих видов рака: рак полости рта и глотки, включая рак языка, оральный рак и рак глотки; рак пищеварительной системы, включая рак пищевода, желудка и толстой кишки; рак печени и желчных протоков, включая гепатоцеллюлярные карциномы и холангиокарциномы; рак дыхательной системы, включая бронхогенный рак, рак легких и рак
15 гортани; рак костей и суставов, включая остеосаркому; рак кожи, в том числе меланому; рак молочной железы; рак половой системы, включая рак матки, эндометрия, яичников и шейки матки у женщин, рак простаты и яичек у мужчин; рак мочевыводящих путей, включая почечно-клеточную карциному и переходно-клеточную карциному мочеточников или мочевого пузыря; опухоль стромы желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, рак почек,
20 рак толстой кишки, рак шейки матки, рак мозга, включая глиомы, мультиформную глиобластому и медуллобластому; рак эндокринной системы, включая рак щитовидной железы, карциному надпочечников и рак, связанный с синдромами множественных эндокринных новообразований; лимфомы, включая лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому; В-клеточная лимфома, моноцитарная лимфома, лимфома маргинальной зоны, лимфома
25 Беркитта, Т- и В-лимфомы, множественная миелома и плазмоцитомы; острые и хронические лейкемии, прогемоцитарный лейкоз, острый нелимфобластный лейкоз (ОНЛ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), эритролейкоз, миелоидный или лимфоидный лейкоз; а также рак других и неупомянутых участков, включая нейробластому. В предпочтительном варианте реализации раковое заболевание является одним из следующих: почечно-клеточная карцинома
30 (ПКК), меланома, рак почки и рак мочевого пузыря.

 Раковые образования могут включать в себя несолидные опухоли (такие как гематологические опухоли, например лейкоз и лимфому) или солидные опухоли. В контексте настоящего документа термин «солидная опухоль» означает аномальную массу ткани, которая

обычно не содержит кист или жидких участков. Солидные опухоли могут быть доброкачественными и злокачественными. Различные типы солидных опухолей названы по типу клеток, которые их образуют (например, саркомы, карциномы и лимфомы).

Примеры солидных опухолей, таких как саркомы и карциномы, включают
5 фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеосаркому и прочие саркомы, синовиому, мезотелиому, саркому Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному толстой кишки, лимфоидную злокачественную опухоль, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак легких, рак яичников, рак простаты, гепатоцеллюлярную карциному, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному, аденокарциному, карциному
10 потовых желез, медуллярную карциному щитовидной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, феохромоцитому, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичек, семинома, карцинома мочевого пузыря, меланома,
15 а также опухоли ЦНС (такие как глиома (например, глиома ствола мозга и смешанные глиомы), глиобластома (также известная как мультиформная глиобластома), астроцитомы, лимфома ЦНС, герминома, медуллобластома, шваннома, краниофарингиома, эпендимомы, пинеалома, гемангиобластома, акустическая неврома, олигодендроглиома, менингиома, нейробластома, ретинобластома и метастазы в головной мозг).

Гематологические виды рака – это рак крови или костного мозга. Примеры гематологического (или гематогенного) рака включают лейкемии, в том числе острые лейкозы (такие как острый лимфолейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз, а также миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный лейкозы и эритролейкоз) хронические лейкозы (такие как хронический миелоцитарный
25 (гранулоцитарный) лейкоз, хронический миелогенный лейкоз и хронический лимфолейкоз), истинная полицитемия, лимфома, болезнь Ходжкина, неходжкинская лимфома (вялотекущая и тяжелая форма), множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрёма, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром, волосатоклеточный лейкоз и миелодисплазия.

В некоторых вариантах осуществления раковые клетки экспрессируют или сверхэкспрессируют HLA-G. В отдельном варианте осуществления раковые клетки экспрессируют или сверхэкспрессируют от одной до шести, предпочтительно от двух до пяти изоформ HLA-G, выбранных из HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3, HLA-G4, HLA-G5, HLA-G6 и

HLA-G7, предпочтительно из HLA-G1, HLA-G2, HLA-G5 или HLA-G6 и более предпочтительно из HLA-G1 или HLA-G2.

В предпочтительном варианте реализации раковые клетки экспрессируют или сверхэкспрессируют HLA-G1 и/или HLA-G5; или раковые клетки экспрессируют или
5 сверхэкспрессируют HLA-G2 и/или HLA-G6. В предпочтительном варианте реализации при экспрессировании такими раковыми клетками этих конкретных изоформ HLA-G, CAR по изобретению специфически связывается с HLA-G1 и HLA-G5 или с HLA-G2 и HLA-G6 соответственно.

Применение в диагностике и прогностике

10 Описанные в настоящем документе анти-HLA-G моноклональные антитела или scFv также могут успешно применяться в диагностических и прогностических методах. Таким образом, настоящее изобретение относится к применению описанных здесь антител для диагностики у субъекта заболеваний, связанных с HLA-G.

Описанные в настоящем документе моноклональные антитела или scFv успешно
15 используются в методах, известных в данной области, относящихся к локализации и/или количественному определению полипептида HLA-G (например, для использования при измерении уровней полипептида HLA-G в соответствующих физиологических образцах, для применения в диагностических способах, для применения в визуализации полипептида и т.п.). Описанные здесь моноклональные антитела или scFv применимы для выделения полипептида
20 HLA-G стандартными методами, такими как вестерн-блоттинг, методы аффинной хроматографии для выделения клеток или клеточного анализа на основе проточной цитометрии, сортировка клеток или иммунопреципитация. Описанное здесь HLA-G-антитело может способствовать очистке природных полипептидов HLA-G из биологических образцов, например, сыворотки или клеток млекопитающих, а также рекомбинантно продуцируемых
25 полипептидов HLA-G, экспрессируемых в системе организма хозяина. Более того, анти-HLA-G моноклональные антитела или scFv могут быть использованы для обнаружения полипептида HLA-G (например, в плазме, клеточном лизате или клеточном супернатанте) с целью оценки количества и паттерна экспрессии полипептида. Описанные здесь антитела к HLA-G могут использоваться для диагностики при мониторинге уровней HLA-G в ткани в рамках процедуры
30 клинических испытаний, например, для определения эффективности конкретной схемы лечения. Обнаружение может быть облегчено за счет сцепления (т.е. физического связывания) описанных здесь антител к HLA-G с обнаруживаемым веществом таким образом, чтобы антитела к HLA-G или их фрагменты помечались хорошо обнаруживаемой меткой. Термин

«меченый» применительно к данному антителу подразумевает непосредственное мечение антитела путем сцепления (т.е. физического связывания) обнаруживаемого вещества с антителом, а также непрямого мечения антитела посредством способности реагировать с другим соединением, помеченным непосредственным образом. Неограничивающие примеры
5 непрямого мечения включают обнаружение первичного антитела при помощи флуоресцентно-меченного вторичного антитела и мечение конца ДНК-зонда биотином таким образом, чтобы его можно было обнаружить с помощью флуоресцентно-меченного стрептавидина.

Способ обнаружения по настоящему изобретению может использоваться для обнаружения уровней экспрессии полипептидов HLA-G в биологическом образце *in vitro*, а
10 также *in vivo*. Способы обнаружения полипептидов HLA-G *in vitro* включают твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), вестерн-блоттинг, проточную цитометрию, иммунопреципитацию, радиоиммунологический анализ и иммунофлуоресценцию (например, ИГХ – иммуногистохимическое исследование). Кроме того, способы обнаружения полипептидов HLA-G *in vivo* включают введение субъекту меченого антитела к HLA-G. Только
15 в качестве примера антитело может быть помечено радиоактивным маркером, присутствие и расположение которого в организме субъекта можно определить стандартными способами визуализации.

В некоторых аспектах настоящего изобретения антитела к HLA-G, содержащие структурные модификации, способствующие быстрому связыванию и захвату и/или
20 медленному высвобождению клеткой, применимы в способах обнаружения *in vivo* с помощью визуализации. В некоторых аспектах антитело к HLA-G содержит делецию в константной области тяжелой цепи CH2 антитела для облегчения быстрого связывания и захвата и/или медленного высвобождения клетками. В некоторых аспектах для облегчения быстрого связывания и захвата и/или медленного высвобождения клетками используется фрагмент Fab.
25 В некоторых аспектах для облегчения быстрого связывания и захвата и/или медленного высвобождения клетками используется фрагмент F(ab)'2.

Соответственно, в настоящем изобретении также предлагаются прогностические (или предиктивные) способы анализа для определения, подвержен ли субъект риску развития внутреннего заболевания или болезненного состояния, связанного с повышенной экспрессией
30 или активностью полипептида HLA-G (например, обнаружение предраковых клеток). Такие анализы могут быть использованы для прогностических или предиктивных целей, чтобы с их помощью провести профилактическое лечение индивида до возникновения внутреннего

заболевания или болезненного состояния, характеризующегося или связанного с экспрессией полипептида HLA-G.

В другом аспекте настоящего раскрытия предложены способы определения экспрессии HLA-G у субъекта, чтобы с их помощью выбрать подходящие терапевтические или профилактические составы для данного субъекта.

В альтернативном варианте реализации, прогностические анализы могут быть использованы для выявления субъекта, имеющего или подверженного риску развития рака и/или солидных опухолей. Таким образом, в настоящем раскрытии предложен способ выявления заболевания или патологического состояния, связанного с повышенными уровнями экспрессии изоформ HLA-G, в котором у субъекта берется образец для исследования на обнаружение изоформ HLA-G, при этом присутствие повышенных уровней полипептидов HLA-G по сравнению с контрольным образцом указывает на наличие у субъекта или подверженность его риску развития заболевания или патологического состояния, связанного с повышенными уровнями экспрессии изоформ HLA-G. В некоторых аспектах настоящего изобретения данное заболевание или патологическое состояние, связанное с повышенными уровнями экспрессии изоформ HLA-G, выбирается из группы, включающей случаи развивающегося рака и/или солидных опухолей.

В еще одном варианте осуществления в настоящем раскрытии предложены способы определения, возможно ли эффективное лечение субъекта лекарственным средством от расстройства или патологического состояния, связанного с повышенной экспрессией HLA-G, при котором у субъекта берется образец, а обнаружение изоформ HLA-G осуществляется при помощи антител или ScFv против HLA-G, как описано выше. В биологическом образце, полученном у субъекта, определяется уровень экспрессии полипептида HLA-G и сравнивается с уровнями экспрессии HLA-G, обнаруженными в биологическом образце, полученном у субъекта, у которого нет данного заболевания. Повышенные уровни HLA-G в образце, полученном у субъекта с подозрением на заболевание или патологическое состояние, по сравнению с образцом, полученным у здорового субъекта, указывают на наличие у исследуемого субъекта заболевания или патологического состояния, связанного с HLA-G.

Существует ряд болезненных состояний, при которых повышенный уровень экспрессии изоформ HLA-G, как известно, показывает, будет ли определенный тип терапии или лечения эффективным для субъекта с данным заболеванием. Таким образом, способ обнаружения изоформ HLA-G в биологическом образце может быть использован в качестве способ

прогноза, например, для оценки вероятности того, будет ли терапия или лечение эффективным для данного субъекта.

Дополнительные аспекты настоящего изобретения относятся к методам определения вероятности того, будет ли терапия CAR к HLA-G эффективной для пациента или нет. В 5 конкретных вариантах осуществления данный способ включает в себя нанесение эффективного количества антител к HLA-G на образец опухоли, взятый у пациента, и определение наличия антител, связанных с клетками данного образца опухоли. В дополнительных вариантах осуществления наличие антител, связанных с клетками образца опухоли, указывает на то, что терапия CAR к HLA-G, скорее всего, будет эффективной для 10 данного пациента, а отсутствие таких антител – на то, что данная терапия, скорее всего, не будет эффективной для пациента. В некоторых вариантах осуществления данный способ включает в себя дополнительный этап введения эффективного количества CAR к HLA-G пациенту, для которого было установлено, что данная терапия будет эффективной.

Дополнительные аспекты настоящего изобретения относятся к способам определения 15 вероятности того, будет ли терапия CAR к HLA-G эффективной для пациента или нет, в зависимости от изоформ, которые экспрессируются опухолью, в частности, изоформ, выбранных из HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3, HLA-G4, HLA-G5, HLA-G6 и HLA-G7, предпочтительно – из HLA-G1, HLA-G2, HLA-G5 или HLA-G6, и более предпочтительно – из HLA-G1 или HLA-G2, еще более предпочтительно – HLA-G1 и G5 или HLA-G-2 и G6. 20 Идентификация изоформ, экспрессируемых HLA-G, перед лечением позволила выбрать наиболее подходящий CAR, который специфически связывает от одной до шести, предпочтительно от двух до пяти изоформ HLA-G, выбранных из HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3, HLA-G4, HLA-G5, HLA-G6 и HLA-G7, предпочтительно – из HLA-G1, HLA-G2, HLA-G5 или HLA-G6 и более предпочтительно – из HLA-G1 или HLA-G2, еще более предпочтительно – 25 связывает изоформы HLA-G1 и HLA-G5 или HLA-G2 и HLA-G6 для использования в эффективном лечении, таком как клеточная терапия.

Наборы

Любая из описанных здесь композиций может быть включена в набор, предусмотренный настоящим изобретением. Таким образом, в наборах, в подходящих для этого емкостях 30 должны содержаться рекомбинантные/сконструированные клетки по настоящему изобретению и/или векторы, кодирующие конструкции нуклеиновых кислот по изобретению, и/или конструкции нуклеиновых кислот или родственные реагенты по изобретению. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно включает в себя дополнительный

препарат для лечения рака или инфекционного заболевания, и данный дополнительный препарат может содержаться совместно с конструкцией(ями) нуклеиновой кислоты или клетками, или иными компонентами набора по настоящему изобретению, или поставляться отдельно в комплекте. В некоторых вариантах осуществления в наборе могут быть
5 предусмотрены средства для взятия образца у индивидуума и/или для анализа образца. В определенных вариантах осуществления набор включает в себя, например, клетки, буферы, клеточные среды, векторы, праймеры, рестрикционные ферменты, соли и т. п. Наборы могут также включать в себя средства, которые служат в качестве емкости для стерильного фармацевтически приемлемого буфера и/или другого разбавителя.

10 Компоненты наборов могут содержаться в упаковке, или в водной среде, или быть в лиофилизированной форме. Емкости наборов обычно включают по меньшей мере один флакон (ампулу), пробирку, колбу, бутылку, шприц или иные средства для хранения, в которые компонент может быть помещен и предпочтительно соответствующим образом разделен на аликвоты. Если в наборе более одного компонента, набор также, как правило, должен
15 содержать второй, третий или другой дополнительный контейнер, в которые отдельно могут быть помещены дополнительные компоненты. Однако во флаконе (ампуле) могут содержаться различные комбинации компонентов. Такие емкости могут включать пластиковые контейнеры, изготовленные литьем под давлением или выдувным формованием, в которых хранятся необходимые флаконы (ампулы). Наборы по настоящему изобретению также обычно
20 должны включать в себя средства, которые служат в качестве емкостей для компонентов, со строгими ограничениями для коммерческой продажи. Такие емкости могут включать пластиковые контейнеры, изготовленные литьем под давлением или выдувным формованием, в которых хранятся необходимые флаконы (ампулы).

Если компоненты набора представлены в одном и/или нескольких жидких растворах,
25 данный жидкий раствор представляет собой водный раствор, причем особенно предпочтительным является стерильный водный раствор. Композиции также могут быть составлены в виде композиции, пригодной для введения шприцом. В этом случае сама вмещающая емкость может представлять собой шприц, пипетку и/или иное подобное устройство, из которого состав может быть нанесен на инфицированный участок тела, введен
30 животному и/или даже нанесен на и/или смешан с другими компонентами набора. Кроме того, компоненты набора могут иметь форму сухого порошка(ов). Если реагенты и/или компоненты представлены в виде сухого порошка, порошок можно ресуспендировать путем добавления

подходящего растворителя. Предполагается, что растворитель также может быть предоставлен в другой емкости.

В отдельных вариантах осуществления изобретения в наборе представлены клетки, предназначенные для использования в клеточной терапии, и в некоторых случаях они являются, по существу, единственным компонентом набора. Набор может включать в себя реагенты и материалы для приготовления необходимых клеток. В конкретных вариантах осуществления реагенты и материалы включают праймеры для амплификации необходимых последовательностей, нуклеотидов, применимые буферы или буферные реагенты, соли и т. п., а в некоторых случаях реагенты включают векторы и/или ДНК, кодирующие CAR, как описано в настоящем документе, и/или регулирующие элементы для них.

В отдельных вариантах осуществления в наборе имеется одно или более устройств, пригодных для экстракции одного или нескольких образцов у индивидуума. Такое устройство может представлять собой шприц, скальпель и т. п.

В некоторых версиях изобретения набор, помимо вариантов осуществления клеточной терапии, также включает в себя средства для дополнительной противораковой терапии такой, как например, химиотерапия и/или иммунотерапия. Набор(ы) могут быть специализированы для определенного вида рака у больного и включать в себя соответствующие средства для дополнительных видов противораковой терапии для больного, как было сказано выше.

20

ПРИМЕРЫ

РЕЗУЛЬТАТЫ

Специфичность паратопов антител к HLA-G

Ранее было сказано, что различные изоформы HLA-G могут экспрессироваться с содержанием от одного до трех глобулярных доменов, связанных или не связанных с $\beta 2M$ и пептидом. Ранее были выработаны различные специфичные к HLA-G антитела против различных областей или «эпитопов» HLA-G. Ранее была определена специфичность моноклональных анти-HLA-G антител против различных изоформ HLA-G. Говоря коротко, как показано на Фиг. 2А, антитело 15Е7 обладает высокой аффинностью к HLA-G1/5, не содержащему $\beta 2M$, а также к HLA-G6, демонстрируя, что данное Mab (моноклональное антитело) является специфичным для изоформ HLA-G, не ассоциированным с $\beta 2M$. Как показано на Фиг. 2В, K562 HLA-G1p представляет более высокую долю HLA-G без $\beta 2M$, чем K562 HLA-G1Lv после окрашивания моноклональным антителом 15Е7 по сравнению с моноклональным антителом MEM-G/09, специфичным для изоформ HLA-G, ассоциированных

с $\beta 2M$ (данные не показаны). Аналогичным образом, была оценена специфичность 15E7 в отношении клеточных линий Jurkat wt, Jurkat HLA-G1Lv и Jeg-3, которая продемонстрировала, что моноклональное антитело 15E7 обладает высокой аффинностью к изоформам HLA-G, не содержащим $\beta 2M$, как показано на Фиг. 2В.

5 Специфичность моноклонального антитела LFTT-1 определялась в тех же экспериментах. В отличие от антитела 15E7, антитело LFTT-1 является высокоспецифичным к изоформам HLA-G, ассоциированным с $\beta 2M$, и окрасило линии клеток K562 HLA-G1Lv, Jurkat HLA-G1Lv и Jeg-3, как показано на Фиг. 2С.

Валидация конструкций CAR

10 Два различных химерных антигенных рецептора к HLA-G были созданы на основе паратопов моноклональных антител 15E7 и LFTT-1. Строение CAR соответствовало ранее описанным CAR 3-го поколения (Pulè et al. 2005 Molecular Therapy), состоящим из следующих элементов: сигнальный пептид, scFv антитела 15E7 или LFTT-1, спейсерный домен, который включает в себя или состоит из следующих частей: (i) шарнирный участок CD8a или CD28, (ii)
15 шарнирный домен IgG4 человека, (iii) шарнирный домен IgG4 человека и домен CH3 IgG4 человека, или (iv) мутированный домен CH2 IgG4 человека, шарнирный домен IgG4 человека, а также шарнирный домен CH3 IgG4 человека, трансмембранный участок CD28 и два коактивационных сегмента: 4-1BB и CD3 ζ . На Фиг. 3 показано обобщенное схематическое строение структур CAR на основе антител 15E7 и LFTT-1 с шарнирным доменом CD8a или
20 CD28, а на Фиг. 4 – обобщенное схематическое строение структур CAR на основе антител 15E7 и LFTT-1 с расщепляемым линкером P2A и усеченным hCD19 в качестве репортера.

Конструкции CAR пересаживали в различные эффекторные клетки-хозяева: клеточную линию Jurkat (человеческие CD4⁺ Т-клетки) и NKT1.2 (мышинные iNKT), и поверхностную экспрессию CAR оценивали методом проточной цитометрии и иммунофлуоресцентной
25 микроскопии. 87,6% клеток, трансдуцированных CAR Jurkat HLA-G-15E7 и 83,2% – HLA-G-LFTT-1 экспрессировали химерные рецепторы на своей поверхности, что обнаруживалось антителом к FLAG, демонстрируя, что эффекторные клетки интенсивно экспрессируют конструкции CAR (Фиг. 5А). Аналогичным образом, NKT 1.2 CAR HLA-G-15E7 и HLA-G-LFTT-1 интенсивно экспрессировали CAR к HLA-G на своей поверхности, поскольку 85,2% и
30 85,1% соответственно были окрашены антителом к FLAG. Экспрессию CAR на поверхности клеток также определяли методом иммунофлуоресцентной микроскопии, как показано на Фиг. 5В.

Активационный анализ: присоединение мембраны посредством взаимодействия CAR/HLA-G1

Ранее было продемонстрировано, что иммунные клетки захватывают участки мембран клеточной поверхности у клеток-мишеней, таких как собственно АПК (антиген-презентирующие клетки) или АПК опухолевых клеток. Захват мембран эффекторными клетками у клеток-мишеней (i) требует межклеточного контакта, (ii) происходит быстро и (iii) является активным процессом, зависящим от состояния активации клеток-захватчиков, которое (iv) отражает антиген-специфическая активация эффекторных клеток. Следовательно, перенос мембран связан с активацией функционально зрелых иммунных клеток.

На основе этих принципов был разработан тест для определения степени активации эффекторных клеток при их столкновении с субъектом-мишенью – молекулами HLA-G. Данный эксперимент был поставлен с использованием линии Т-клеток Jurkat в качестве эффекторных клеток и клеток-мишеней, что позволило нам избежать любых взаимодействий с минорными белками. Это означает, что межклеточный контакт будет опосредован только взаимодействием «CAR-антиген». Предполагается, что только клетки, трансфицированные CAR к HLA-G, будут активированы и вследствие этого продемонстрируют захват мембран при провоцировании клетками-мишенями, а у клеток контроля (Jurkat wt) будет очень низкий или нулевой перенос мембран, как показано на Фиг. 6А.

С целью дать характеристику изоформам, преимущественно экспрессируемым на трансдуцированных HLA-G клетках-мишенях клеточной линии Jurkat, экспрессию изоформ HLA-G определяли методом проточной цитометрии при помощи антитела MEM-G/09 к HLA-G, ассоциированному с $\beta 2M$, и антитела 15E7 к HLA-G- $\alpha 3$, не содержащему $\beta 2M$. На Фиг. 6В показано, что клетки-мишени Jurkat HLA-G1 экспрессируют только изоформы HLA-G1, ассоциированные с $\beta 2M$, и не наблюдается какого-либо окрашивания после окрашивания 15E7, что означает отсутствие экспрессии изоформ HLA-G- $\alpha 3$, не содержащих $\beta 2M$.

Затем оценивали уровень переноса мембран, иначе говоря, степень активации эффекторных клеток, спровоцированных их мишенями. Процент захвата мембран при столкновении с клетками контроля Jurkat wt составлял 5,91% и 5,38% у клеток CAR Jurkat HLA-G-15E7 и HLA-G-LFTT-1 соответственно. Однако, учитывая природу изоформ HLA-G, экспрессируемых на клетках-мишенях (HLA-G1, ассоциированные с $\beta 2M$), ожидается, что только CAR HLA-G-LFTT-1 будут специфически связывать и, следовательно, активировать эффекторные клетки. Действительно, процент захвата CAR Jurkat HLA-G-LFTT-1 увеличился

до 21,7%, тогда как активация CAR Jurkat HLA-G-15E7 осталась на уровне 5,6%. Данные результаты показаны на Фиг. 6С.

Далее степень активации клеток CAR HLA-G-15E7 и HLA-G-LFTT-1, спровоцированных специфическими клетками-мишенями, была изучена на основе соотношения «Индекс активации», устанавливающего базовый уровень для неспецифических клеток контроля – клеточная линия Jurkat wt. Как показано на Фиг. 6D, CAR Jurkat HLA-G-LFTT-1 активировались более 3 раз при провоцировании клетками Jurkat HLA-G1Lv. Однако степень активации не возрастала при провоцировании клетками контроля Jurkat, также и клетки CAR HLA-G-15E7 не активировались при провоцировании неспецифическими мишенями (Jurkat wt и Jurkat HLA-G1Lv).

В завершение, оценивали статус активации других субпопуляций иммунных клеток с целью подтвердить специфичность и биологическую активность конструкций CAR HLA-G-15E7 и CAR HLA-G-LFTT-1. Как показано на Фиг. 7A, CAR Jurkat HLA-G-15E7 CAR провоцировались конкретной мишенью – K562 HLA-G1p (которые экспрессируют в основном изоформы HLA-G, не содержащие $\beta 2M$) с использованием клеток K562wt в качестве контроля. И снова наблюдалось возрастание степени активации более чем в 3 раза. Также были протестированы клетки NKT 1.2 CAR HLA-G-15E7 и HLA-G-LFTT-1, спровоцированные Jeg-3 (клетки хориокарциномы человека, экспрессирующие изоформы HLA-G1, ассоциированные с $\beta 2M$). Только клетки CAR HLA-G-LFTT-1 были активированы в значительной степени по сравнению с клетками контроля NKT 1.2 HLA-G-15E7 или NKT 1.2, как показано на Фиг. 7B.

Цитолитическая функция Т-клеток CAR к HLA-G и секреция IFN- γ

Цитотоксическая функция эффекторных клеток, экспрессирующих CAR 15E7 и LFTT-1, оценивалась в отношении линий трансфицированных клеток JEG-3, K562 и K562-HLA-G1 (Фиг. 8 и 9). Для этого клетки-мишени были помечены CFSE (сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеина) перед совместным культивированием в течение 24 часов с Т-клетками при указанных соотношениях «Эффектор:Мишень» (Э:М). Через 24 часа после совместной инкубации, среду собирали для определения секреции IFN- γ (интерферона гамма) и выделяли клетки для исследования лизиса клеток-мишеней методом проточной цитометрии.

Вне зависимости от используемого шарнира линия клеток K562 не лизировалась анти-HLA-G Т-клетками CAR LFTT-1 и 15E7, поскольку клетки K562 не экспрессировали белок HLA-G на своей поверхности (Фиг. 8A). Клетки линии K562-HLA-G1P экспрессируют на своей поверхности как изоформы HLA-G1, ассоциированные с $\beta 2M$, так и изоформы, не содержащие $\beta 2M$ (Фиг. 2B и 2C соответственно) и почти полностью лизируются антителами Т-клетками

CAR LFTT-1 и 15E7 при соотношении Э:М, равном 10:1 по сравнению с активированными, но не трансдуцированными Т-клетками. Т-клетки CAR шарнира IgG4 +CH3 15E7 и LFTT-1 показали несколько более низкую эффективность по сравнению с их аналогами IgG4 или IgG4 + mCH2-CH3. Экспрессия CD107a определялась на эффекторных Т-клетках CAR в соответствии с их цитотоксической функцией (Фиг. 8B). Клетки линии JEG-3 экспрессировали только изоформу HLA-G1, ассоциированную с β 2M (Фиг. 2C), а Т-клетки CAR LFTT-1 были способны лизировать опухолевые клетки JEG-3 (Фиг. 8A). Экспрессия CD107a определялась только на Т-клетках CAR LFTT-1 (Фиг. 8B).

Как показано на Фиг. 9, на клеточной линии K562, не экспрессирующей HLA-G, у Т-клеток CAR LFTT-1 и 15E7 не была зафиксирована никакая-либо секреция IFN- γ , тогда как обе Т-клетки CAR интенсивно секретировали IFN- γ после инкубации с клеточной линией K562-HLA-G1P. На клеточной линии JEG-3 IFN- γ секретировали только клетки Т-клетки CAR LFTT-1, что согласуется с лизисом клеток JEG-3 и экспрессией CD107a на поверхности Т-клеток CAR LFTT-1 (Фиг. 8).

Эксперимент *in vivo* на мышах NGS

Для исследования функций Т-клеток CAR к HLA-G *in vivo*, опухолевые клетки K562-HLA-G1P, экспрессирующие люциферазу (K562-HLA-G1P-luc), имплантировали мышам NGS (секвенирование следующего поколения) с последующей инокуляцией Т-клеток CAR к HLA-G для мониторинга цитотоксичности Т-клеток CAR к HLA-G в отношении опухолевых клеток HLA-G (Фиг.10).

Для этого были подготовлены активированные клетки контроля и Т-клетки, трансдуцированные CAR к HLA-G, как было описано выше. Говоря вкратце, человеческие Т-клетки были отсортированы, активированы, затем часть из них была трансдуцирована конструкциями CAR шарнира 15E7-IgG4 или CAR шарнира LFTT1-IgG4, и выдерживались в культуре до 9 дня после трансдукции для того, чтобы вернуть их в состояние покоя перед проведением экспериментов *in vivo*.

Затем 18 самок мышей NGS были подвергнуты облучению за 24 часа до внутривенной инокуляции клеток K562-HLA-G1P-luc.

Через 3 дня после инокуляции клеток K562-HLA-G1 были созданы 3 группы по 6 мышей, в которых: (i) 6 мышам была сделана инокуляция 1,106 активированных, но не трансдуцированных Т-клеток CD8 человека (контрольная группа), (ii) 6 мышам – инокуляция 1,106 Т-клеток CAR 15E7-IgG4, и (iii) 6 мышей – инокуляция 1,106 Т-клеток CAR LFTT1-IgG4.

Затем проводился мониторинг роста опухоли K562-HLA-G1P-luc для оценки цитотоксичности Т-клеток CAR к HLA-G в сравнении с Т-клетками контроля.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клеточные линии

5 Клеточная линия Jurkat представляет собой Т-клетки CD4⁺ человека, приобретенные в ATCC (Американская коллекция типовых культур TIB-152). Клетки линии Jurkat трансдуцировали лентивирусом CAR HLA-G1, HLA-G-LFTT-1 или HLA-G-15E7 соответственно. Трансдуцированные клеточные линии Jurkat wt и Jurkat культивировали на питательной среде RPMI 1640 (Invitrogen) с добавлением 2 mM L-глутамина, 1 мг/мл
10 пенициллина и стрептомицина (Gibco), а также 10% термоинактивированной FCS (фетальной телячьей сыворотки) (Invitrogen).

NKT1.2 – это линия гибридных клеток мышей, любезно предоставленная доктором Кроненбергом. Их также трансдуцировали лентивирусом CAR HLA-G-LFTT-1 или HLA-G-15E7 соответственно и культивировали в X-Vivo 10 (Lonza) с добавлением 1 мг/мл
15 пенициллина и стрептомицина (Gibco).

Клетки K562 представляют собой лейкозные клетки человека, приобретенные в ATCC (Американская коллекция типовых культур CCL-243). Клетки K562-HLA-G1p были получены нуклеофекцией клеток K562 wt вектором, кодирующим HLA-G1, а клетки K562-HLA-G1Lv – трансдукцией лентивируса, кодирующего HLA-G1. Данные клеточные линии культивировали
20 на питательной среде RPMI 1640 (Invitrogen) с добавлением 2 mM L-глутамина, 1 мг/мл пенициллина и стрептомицина (Gibco), а также 10% термоинактивированной FCS (Invitrogen).

Клеточная линия Jeg-3 представляет собой клетки хориокарциномы человека, приобретенные в ATCC (Американская коллекция типовых культур HTB-36). Их культивировали в MEM (X) с добавлением 1 мг/мл пенициллина и стрептомицина (X), а также
25 10% термоинактивированной FCS (Invitrogen).

Клетки CAR HLA-G Jurkat

Конструкции CAR HLA-G-LFTT-1 и HLA-G-15E7 были созданы в соответствии с изложенным в более ранних трудах [Pulè et al. 2005 Molecular Therapy]. Говоря вкратце, распознающий HLA-G домен представляет собой одноцепочечный варибельный фрагмент
30 (scFv), полученный из антитела LFTT-1, специфичного к HLA-G1, ассоциированному с β 2M, или из антитела 15E7, специфичного к HLA-G1, не содержащему β 2M. Короткий спейсер, полученный из шарнирной области IgG1, использовали для связывания данного scFv с трансмембранным доменом. Эндодомен CAR HLA-G был сконструирован слиянием молекул

активации CD28, OX40 и CD3 ζ . Конструкция CAR была клонирована в плазмидный вектор pTrip посредством дигерирования/лигирования после экстракции в ходе ПЦР (полимеразной цепной реакции) со специфическими праймерами при немедленно-раннем промоторе CMV (цитомегаловируса). Аминокислотные последовательности, кодирующие легкую и тяжелую цепи scFv моноклональных антител, подробно описаны под SEQ ID NO: 1 (VH), 2 (VL) и 31 (scFV) для LFTT-1 и под SEQ ID NO: 3 (VH), 4 (VL) и 30 (scFV) для 15E7. Последовательности CAR раскрыты под SEQ ID NO: 83 и 84 для CAR 15E7 (аминокислотная последовательность и последовательность, кодирующая нуклеиновую кислоту, соответственно) и под SEQ ID NO: 85 и 86 для аминокислотной последовательности CAR LFTT-1 и последовательности, кодирующей нуклеиновую кислоту, соответственно.

Клетки HLA-G Jurkat

Экспрессирующая HLA-G стабильная клеточная линия Jurkat была получена путем трансдукции, а лентивирусные частицы были получены следующим образом: специфические последовательности, соответствующие нативной кДНК HLA-G1 (NM_002127.5), модифицированной K334A и K335A согласно Zhao и др., были клонированы по отдельности в плазмидный вектор pTrip путем дигерирования/лигирования после экстракции в ходе ПЦР со специфическими праймерами при немедленно-раннем промоторе CMV.

Лентивирусные векторы

Частицы вектора, происходящего из ВИЧ-1, были получены путем котрансфекции фосфатом кальция клеток HEK-293T (ATCC) с рекомбинантной плазмидой pTRIP, плазмидой экспрессии оболочки, кодирующей гликопротеин из VSV (вируса везикулярного стоматита), гликопротеином серотипа Индиана и плазмидом инкапсидации p8.74. Чистые культуры вируса титровали с помощью ПЦР в реальном времени на клеточных лизатах из трансдуцированных клеток HEK-293T и выражали в единицах трансдукции (TU) на мл. Для получения клеток Jurkat HLA-G-LFTT-1, HLA-G-15E7 CAR и Jurkat HLA-G клетки Jurkat в количестве 1×10^5 высевали в 12-луночный планшет с 500 мкл среды cRPMI и 10^6 TU (293T) векторов Trip CMV-HLA-G-LFTT-1-CAR, Trip CMV-HLA-G-15E7-CAR или Trip CMV-HLA-G соответственно. Клетки инкубировали в течение 1 часа при 37°C, а затем центрифугировали в течение 1 часа при 37°C 1200 г. После этого добавили 1 мл среды cRPMI и инкубировали при 37°C. Две недели спустя позитивные клетки были отсортированы методом проточной цитометрии с использованием антител к HLA-G. Экспрессию HLA-G оценивали методом проточной цитометрии перед активационным анализом Jurkat HLA-G-CAR. Такая же процедура была выполнена для получения клеток CAR K562 HLA-G1Lv и NKT1.2 HLA-G-LFTT-1 или CAR HLA-G-15E7.

Проточная цитометрия

Конъюгированный с фикоэритрином мышиний IgG1 (клон Р.3.6.8.2.1.12-4714) от eBiosciences (Париж; Франция), конъюгированный с FITC (флуоресцеин изотиоцианатом) крысиный IgG2a от BD Biosciences (клон: R35-95 553929, Le Pont de Claix; Франция) и MEM-G/09 (Exbio, Прага). Проточную цитометрию проводили, инкубируя соответствующую клеточную линию с моноклональными антителами в течение 1 часа при комнатной температуре, дважды промывая и инкубируя в течение 30 минут при комнатной температуре с конъюгированными фикоэритрином козьими антителами к мышиному IgG (405307, Biolegend, США). Анализы проточной цитометрии выполняли с использованием LSR FORTESSA (Beckton Dickinson, Le Pont-de-Claix, Франция); анализ данных выполнялся с помощью программного обеспечения FlowJo X (Tree star, Ашленд, США). Популяции с интенсивностью окрашивания более высокой, чем у 99% изотипического контроля классифицировались как положительно меченые популяции.

Активационный анализ

Эффекторные клетки CAR Jurkat HLA-G и опухолевые клетки Jurkat или Jurkat HLA-G1 были соответственным образом помечены флуоресцентными красителями PKH26 и PKH67 (Sigma) в соответствии со спецификациями производителя.

Для проведения активационных анализов, основанных на принципе трогоцитоза, CAR Jurkat HLA-G-LFTT-1 или HLA-G-15E7 («акцепторные клетки») культивировали совместно с клетками Jurkat или Jurkat HLA-G1 («донорские клетки») в течение 1 часа при соотношении «эффектор-опухоль» 1:1, при общей концентрации 2×10^6 клеток/мл и при 37°C в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂, как было описано ранее [Caumartin J et al, (2007) Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells, EMBO J 26:1423-33]. По окончании совместной инкубации клетки помещали на лед, и все последующие этапы выполняли при температуре ниже 4°C. Захват мембраны опухолевых клеток эффекторными клетками CAR изучали методом проточной цитометрии.

Получение векторов

Векторные частицы, происходящие от ВИЧ-1, были получены путем транзientной котрансфекции Т-клеток НЕК 293 (АТСС) фосфатом кальция с векторной плазмидой pTRIP (кодирующей гликопротеин из VSV, серотип Индиана (IND)) и плазмидой инкапсидации p8.74 для получения интегративных лентивирусных векторных частиц (ИЛВ). Трансферную способность векторных генов определяли с помощью количественной ПЦР после трансдукции

клеток 293T, как было описано ранее (Coutant, F., et al., PLoS One, 2008. 3(12): p. e3973) и выражали в единицах трансдукции (TU)/мл вектора.

Выделение и активация Т-клеток

МКПК (моноклеарные клетки периферической крови) были экстрагированы из образцов крови 3 различных здоровых доноров (EFS, Rungis) после выделения фикола. Т-клетки сортировали методом очистки в колонной установке (Miltenyi), активировали микрогранулами, покрытыми CD3+ CD28+ (Miltenyi), и затем культивировали в течение 48 часов при 37°C, 5% CO₂ на питательной среде RPMI 1640 Glutamax (Gibco) с добавлением 10% FCS, 1% пенициллин-стрептомицина (Gibco), 50 мкМ бета-меркаптоэтанола (Gibco), заменимой аминокислоты, 10 мМ HEPES (Gibco) и 1 мМ пирувата натрия (Gibco). Затем клетки промывали и трансдуцировали лентивирусными векторами при MOI (множественности заражения) 20 в 200 мкл при концентрации 1 М/мл в течение 4 часов при медленном встряхивании. Далее клетки переносили на 96-луночный планшет с U-образным дном. Через 24 часа количество клеток доводили до 1,10⁶ клеток/мл и добавляли 50 ед./мл IL2 человека (Preprotech). Каждые 2-3 дня клетки подсчитывали и доводили до 1,10⁶ клеток/мл в полной среде с IL2. Через 8 дней клетки использовали для функциональных анализов.

Анализ цитотоксичности и профиль активации

Анализ цитотоксичности проводили на клетках-мишенях JEG-3, K562 и K562-HLA-G1.

Говоря вкратце, за 24 часа до анализа 3,10⁵ клеток JEG-3 были помечены CFSE (сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеина) (CellTrace, Thermofisher) с разбавлением 1/10 000; 3,10⁵ клеток K562 или 3,10⁵ клеток K562-HLA-G1 были помечены CFSE с разбавлением 1/20 000. Затем клетки-мишени были высеваны на 96-луночный планшет с U-образным дном. Т-клетки CAR промывали ФСБ (фосфатно-солевым буфером) 1х (Gibco) перед совместным культивированием с клетками-мишенями при указанных соотношениях «эффе́ктор:мишень» (Э:М).

После 24 часов совместной инкубации среду собирали и клетки выделяли (у JEG-3 – отделяли) в 0,1% буфере ФСБ-EDTA. После промывки клетки метили антителами к: CD4 (клон SK3 Percp, BD Pharmingen), CD8 (клон SK1 PE-Cy7, Biolegend), CD19 (клон LT19 FITC или PE, Miltenyi), CD25 (клон M-A251 BV421, BD Horizon), CD69 (клон FN50 BV711, BD Horizon), PD-1 (клон EH12.2H7 APC, Biolegend) и красителем живых/мертвых клеток (eFluor 780, Thermofisher) в соответствии с рекомендациями производителя. Сбор данных производили с помощью цитометра Attune (Thermofisher), а результаты анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo.

Анализ секреции IFN γ

Количественное определение IFN γ производили непосредственно на среде для совместного культивирования при помощи набора CBA (BD Biosciences), следуя инструкциям производителя.

Анализ дегрануляции

Совместно культивируемые клетки подготавливали в соответствии с описанным ранее (соотношение Э:М равно 10), а антитела к CD107a (клон H4A3 PE, Biolegend) добавляли непосредственно к совместной культуре. Через 1 час после совместной инкубации добавляли монензин (GolgiStop, BD Bioscience). Через 5 часов после эксперимента по совместной инкубации клетки извлекали и метили антителами CD4, CD8, CD19 и красителем живых/мертвых клеток. Сбор данных производили с помощью цитометра Attune, а результаты анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo.

Эксперимент *in vivo*

Мышей с иммунодефицитом NOD/SCID/IL2R γ c (NSG) (возраст 6-8 недель, Лаборатория Джексона, Сакраменто, Калифорния, США) подвергали облучению (2,5 Гр) и вводили им внутривенно соответствующее количество люциферазы, экспрессирующей опухолевые клетки K562-HLA-G1P (1,106/мышь). Т-клетки (нетрансдуцированные и трансдуцированные) вводили в хвостовую вену на 3 день для модели K562-HLA-G1P-Luc. Приживление отслеживали каждые 3-4 дня до 17 дня после имплантации, а затем – еженедельно посредством измерений по технологии BLI (биослойная интерферометрия): мыши получали внутривенно 3 мг люциферина (VivoGlo Luciferin, # P1043, Promega, Висконсин, США) в течение 10 минут перед визуализацией (IVIS Lumina Серия III, Perkin Elmer, Массачусетс, США).

Статистический анализ

Данные представлены в качестве средних величин $\pm$ стандартное отклонение (SD). Применялся t-критерий Стьюдента, и значение P менее 0,05 считалось статистически значимым. На иллюстрациях, демонстрирующих репрезентативные эксперименты, планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение для трех повторений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Принимая во внимание то, что основными критериями для разработки иммунотерапии с применением CAR являются: выявление подходящего Опухолеассоциированного Антигена, наличие трансгенных эффекторных клеток и реверсивность иммуносупрессивного

микроокружения опухоли, представляется очевидным, что HLA-G (человеческий лейкоцитарный антиген G) является очень интересным кандидатом для этой цели. HLA-G считается ИКТ (иммунной контрольной точкой) в связи с его ключевой ролью в иммуномодуляции. Также было подробно изложено, что эта молекула экспрессируется в многочисленных опухолевых выделениях различного происхождения, и отсутствуют какие-либо сведения о клеточном или гуморальном ответе на него. Кроме того, HLA-G представляет собой довольно своеобразную молекулу, функция которой была хорошо изучена, но белковая структура которой оказалась очень сложной и неоднородной. Таким образом, для ингибирования функции HLA-G одного способа было бы недостаточно.

В настоящей заявке предлагается создание двух CAR, направленных против HLA-G, с использованием scFv моноклональных антител (Mab) к HLA-G, направленных на различные эпитопы молекулы, которые ориентированы на большинство изоформ HLA-G: классические изоформы HLA и изоформы меньшего размера, не содержащие $\beta 2M$. Исходя из вышесказанного, предполагается, что таким образом удастся добиться уничтожения большинства клеток, экспрессирующих иммуносупрессивные изоформы HLA-G. Были получены эффекторные клетки, трансдуцированные конструкцией нуклеиновой кислоты по изобретению, и данные молекулы CAR интенсивно экспрессируются на поверхности клеток и являются биологически функциональными. Также были получены NKT-клетки CAR, направленные против HLA-G. Ранее сообщалось, что в качестве иммуноцитов для терапии, основанной на CAR, NKT-клетки были лучше, чем аналоги из числа T- или NK-клеток. Кроме того, было продемонстрировано, что NKT-клетки CAR инфильтрируют солидную опухоль с более высокой эффективностью. Поскольку клетки солидных опухолей интенсивно экспрессируют HLA-G (Paul et al. 1999 Cancer Research, Rouas-Freiss et al. 2007 Semin Cancer Biol, Yaghi et al. 2016 Oncotarget), использование NKT-клеток CAR, направленных против HLA-G, может стать инновационным способом для преодоления иммуносупрессивной среды, связанной с HLA-G.

Обобщая вышесказанное, можно сказать, что в настоящей заявке продемонстрировано, что CAR по изобретению, имеющие рекомбинантную конструкцию 3-го поколения, (i) должным образом экспрессируются на поверхности трансдуцированных клеток, (ii) каждый CAR: CAR HLA-G-15E7 и CAR HLA-G-LFTT-1 является специфичным для иммуносупрессивных изоформ HLA-G, не содержащих $\beta 2M$, или ассоциированных с $\beta 2M$, соответственно, и (iii) что экспрессирующие CAR эффекторные клетки, направленные против HLA-G, активируются должным образом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антигенсвязывающий домен антитела к HLA-G, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, отличающийся тем, что указанный CAR специфически связывает от одной до шести изоформ HLA-G, в предпочтительном варианте реализации – от двух до пяти изоформ HLA-G.

2. CAR по п. 1, отличающийся тем, что указанный CAR специфически связывает изоформы HLA-G, не содержащие $\beta 2M$, или изоформы HLA-G, ассоциированные с $\beta 2M$.

3. CAR по любому из пп. 1-2, отличающийся тем, что указанный CAR не связывает домен альфа1 HLA-G.

4. CAR по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что указанный CAR специфически связывает изоформу HLA-G, выбранную из группы, состоящей из HLA-G1, HLA-G2, HLA-G5 и HLA-G6; или тем, что указанный CAR специфически связывает изоформы HLA-G1 и HLA-G5, или HLA-G2 и HLA-G6, и/или изоформы HLA-G1 и HLA-G5, содержащие или не содержащие $\beta 2M$.

5. CAR по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что антигенсвязывающий домен представляет собой scFv, который специфически связывает HLA-G, ассоциированным с $\beta 2M$; предпочтительно с HLA-G1 и HLA-G5, где scFv содержит:

(a) (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 1 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 1; и (ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 2 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 2; или

(b) (i) CDR (определяющую комплементарность область) 1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательность SEQ ID NO: 1; и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательность с SEQ ID NO: 2;

или где антигенсвязывающий домен представляет собой scFv, который специфически связывает HLA-G, не содержащие $\beta 2M$, предпочтительно обе изоформы HLA-G2 и HLA-G6 и/или HLA-G1, не содержащую $\beta 2M$ и HLA-G5, не содержащую $\beta 2M$, причем данный scFv содержит:

(c) (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 3 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 3; и (ii)

вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность с SEQ ID NO: 4 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 4; или

5 (d) (i) CDR (определяющую комплементарность область) 1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательность с SEQ ID NO: 3; и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательность с SEQ ID NO: 4.

6. CAR по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что антитело к HLA-G представляет собой scFv против HLA-G, который содержит:

10 (a) (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 1 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 1; и (ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность с SEQ ID NO: 2 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 2; или

15 (b) (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 3 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 3; и (ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 4 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 4.

20 7. CAR по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что внутриклеточный домен содержит сигнальный домен CD3-дзетта и опционально по меньшей мере один костимулирующий домен(ы), выбранный из костимулирующих доменов CD28, 41BB, CD28, CD134, ICOS, OX40, CD149, DAP10, CD30, IL2-R, IL7 α 6, IL21-R, NKp30, NKp44, CD27, CD137 и DNAM-1, в предпочтительно, два костимулирующих домена: 41BB и CD28.

8. CAR по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что трансмембранный домен выбран из трансмембранных доменов CD28, CD3 и CD8, предпочтительно, трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD28.

30 9. CAR по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что CAR последовательно содержит от N до C-конца: последовательность сигнального пептида, антитело к HLA-G или его антигенсвязывающий фрагмент, спейсерный домен, трансмембранный домен, внутриклеточный домен, расщепляемый линкер и усеченный домен CD19 человека.

10. CAR по п. 9, дополнительно содержащий шарнирную область, соединяющую антигенсвязывающий домен с трансмембранным доменом, в предпочтительном варианте реализации выбранную из группы, состоящей: (i) шарнирного домена IgG4 человека, (ii) шарнирного домена IgG4 человека и домена CH3 IgG4 человека, (iii) мутированного домена CH2 IgG4 человека, шарнирного домена IgG4 человека и шарнирного домена CH3 IgG4 человека, (iv) шарнирного домена CD28 и (v) шарнирного домена CD8a.

11. CAR по п. 10, отличающийся тем, что шарнирный домен содержит или состоит из последовательности, представленной в: (i) SEQ ID NO: 25, (ii) SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 27, (iii) SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27, (iv) SEQ ID NO: 18 или (v) SEQ ID NO: 19 или гомологичной последовательности, демонстрирующей более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с ними.

12. CAR по любому из пп. 9-11, отличающийся тем, что сигнальный пептид выбран из группы, состоящей из сигнального пептида CD8a, сигнального пептида Ig каппа мыши, сигнального пептида IgG4 человека, сигнального пептида IL2, сигнального пептида IgG2 человека и сигнального пептида люциферазы Gaussia.

13. CAR по любому из пп. 9-12, отличающийся тем, что расщепляемый линкер выбран из группы, состоящей из P2A, T2A, E2A, B2A и F2A.

14. CAR по любому из пп. 9-13, отличающийся тем, что усеченный домен CD19 человека состоит из последовательности, представленной SEQ ID NO: 29.

15. Мультиспецифическая конструкция CAR, которая содержит по меньшей мере два разных антигенсвязывающих домена, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, отличающаяся тем, что по меньшей мере один из антигенсвязывающих доменов специфически связывает изоформы HLA-G, ассоциированные с доменом β 2M HLA-G; и по меньшей мере еще один другой из антигенсвязывающих доменов специфически связывает изоформы HLA-G, не ассоциированные с доменом β 2M HLA-G, причем в предпочтительном варианте реализации мультиспецифическая конструкция CAR представляет собой биспецифическую конструкцию CAR, которая содержит: (i) домен, содержащий CDR 1, 2 и 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащие последовательность SEQ ID NO: 11, 12 и 13 соответственно, (ii) домен, содержащий CDR 1, 2 и 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащие последовательность SEQ ID NO: 14, 15 и 16 соответственно, (iii) домен, содержащий CDR 1, 2 и 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3), содержащие последовательность SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и (iv) домен, содержащий CDR 1, 2 и 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3), содержащие последовательность SEQ ID

NO: 8, 9 и 10 соответственно, причем каждая CDR может опционально содержать 1, 2, 3 или 4 аминокислотные замены, делеции или вставки.

16. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR по любому из пп. 1-15.

17. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 16.

5 18. Клетка, содержащая CAR по любому из пп. 1-15, или молекулу нуклеиновой кислоты по п. 16, или вектор экспрессии по п. 17, причем предпочтительно указанная клетка выбрана из группы, состоящей: Т-клетки, Т-клетки CD4⁺, Т-клетки CD8⁺, В-клетки, NK-клетки, NKT-клетки, моноцита и дендритной клетки. В предпочтительном варианте реализации клетка представляет собой Т-клетку, В-клетку или NK-клетку.

10 19. Фармацевтическая композиция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 16, вектор экспрессии по п. 17 или клетку по п. 18 и опционально – фармацевтически приемлемый носитель.

20. Фармацевтическая композиция по п. 19, содержащая (i) клетку, содержащую CAR, специфически связывающий HLA-G, ассоциированный с β 2M; предпочтительно, оба HLA-G1 и HLA-G5, предпочтительно по п. 5, и клетку, содержащую CAR, специфически связывающий HLA-G, не содержащий β 2M, предпочтительно HLA-G2 и HLA-G6 и/или обе изоформы HLA-G1, не содержащую β 2M, и HLA-G5, не содержащую β 2M, предпочтительно по п. 5; или (ii) клетку, содержащую CAR, специфически связывающий оба HLA-G1 и HLA-G5, или изоформы HLA-G, не содержащие β 2M, предпочтительно по п. 5, и CAR, специфически связывающий HLA-G2 и HLA-G6 или изоформы HLA-G, ассоциированные с β 2M, предпочтительно по п. 5.

21. Клетка по п. 18 или фармацевтическая композиция по любому из пп. 19-20 для применения в лечении рака или для применения в лечении вирусной инфекции, причем предпочтительно указанная клетка или композиция предназначены для введения в комбинации с терапевтическим средством на основе CAR, не нацеленным на HLA-G.

25 22. Антитело к HLA-G, которое специфически связывает изоформы HLA-G, ассоциированные с β 2M, предпочтительно HLA-G1 и HLA-G5, причем указанное антитело предпочтительно содержит:

(a) (i) переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательность SEQ ID NO: 1 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 1; и (ii) переменную область легкой цепи, содержащую последовательность с SEQ ID NO: 2 или гомологичную последовательность, демонстрирующую более 80%, предпочтительно – более 90%, еще более предпочтительно – более 95% идентичности с SEQ ID NO: 2; или

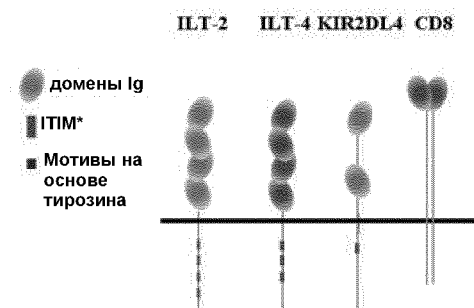
(b) (i) CDR (определяющую комплементарность область) 1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащей последовательность с SEQ ID NO: 1; и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащей последовательность с SEQ ID NO: 2.

23. CAR по любому из пп. 1-15 или антитело к HLA-G по п. 22, отличающееся тем, что
5 данное антитело к HLA-G или его антигенсвязывающий фрагмент, в предпочтительном варианте реализации – scFv, избирательно связывает изоформы HLA-G, не содержащего $\beta 2M$, или HLA-G, ассоциированного с $\beta 2M$, но не связывают все изоформы HLA-G.

домены Ig

A

Рецепторы к HLA-G



Экспрессия

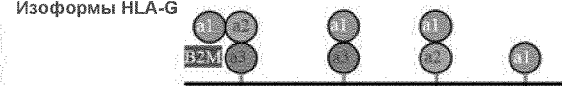
NK (естеств. киллеры)	-	+	некоторые
T-клетки CD8+	-	некоторые	+
T-клетки CD4+	-	-	-
B-клетки	-	-	-
Моноциты/Монофаги	+	-	-
ДК (дендритные клетки)	+	-	-

B

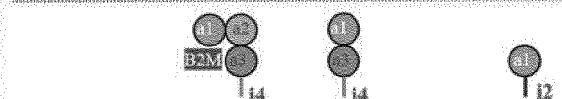
Первичный транскрипт HLA-G



Изоформы HLA-G



Мембранно-связанные HLA-G1 HLA-G2 HLA-G4 HLA-G3

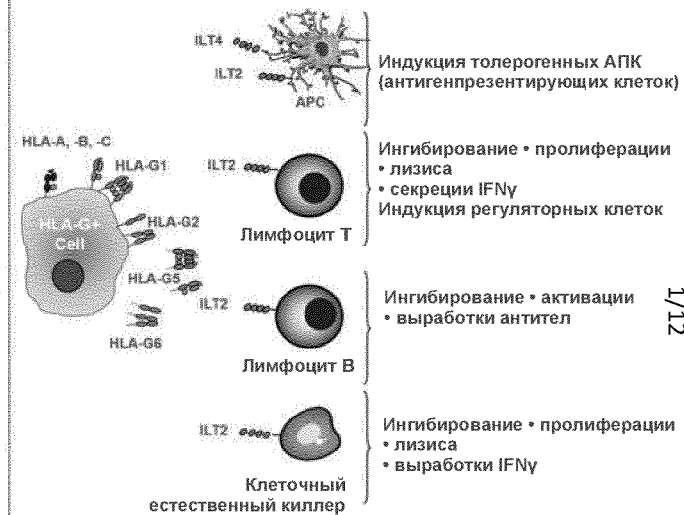


Секретированные HLA-G5 HLA-G6 HLA-G7



Мультимерные

C

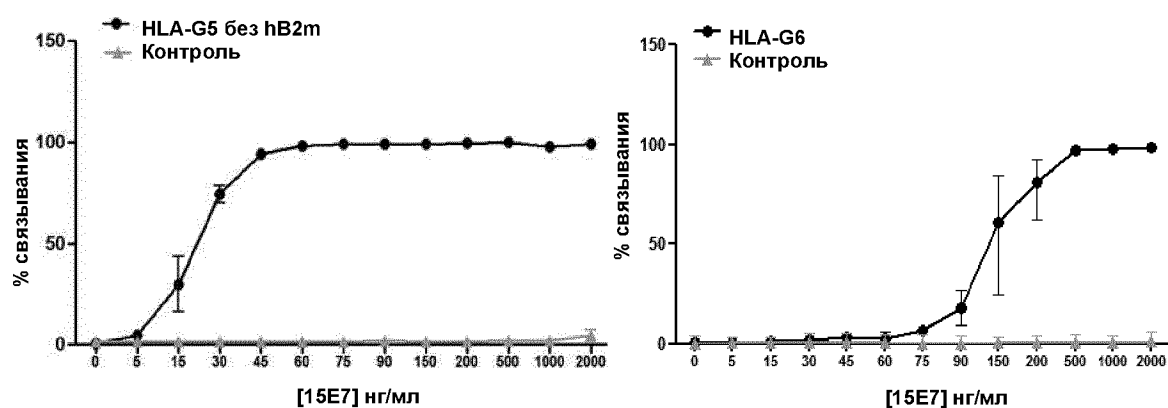


1/12

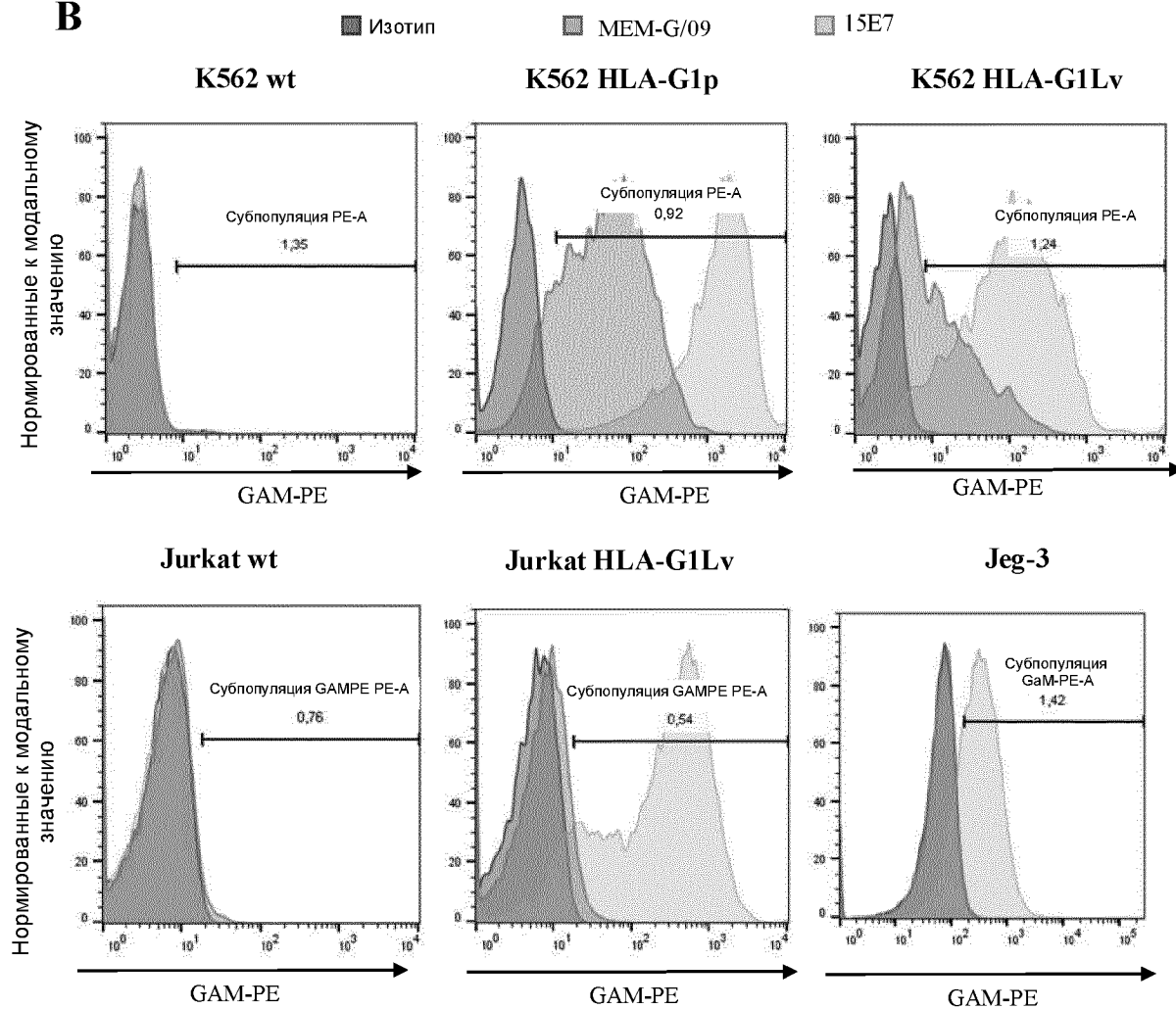
Фигура 1

ITIM* - (иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив)

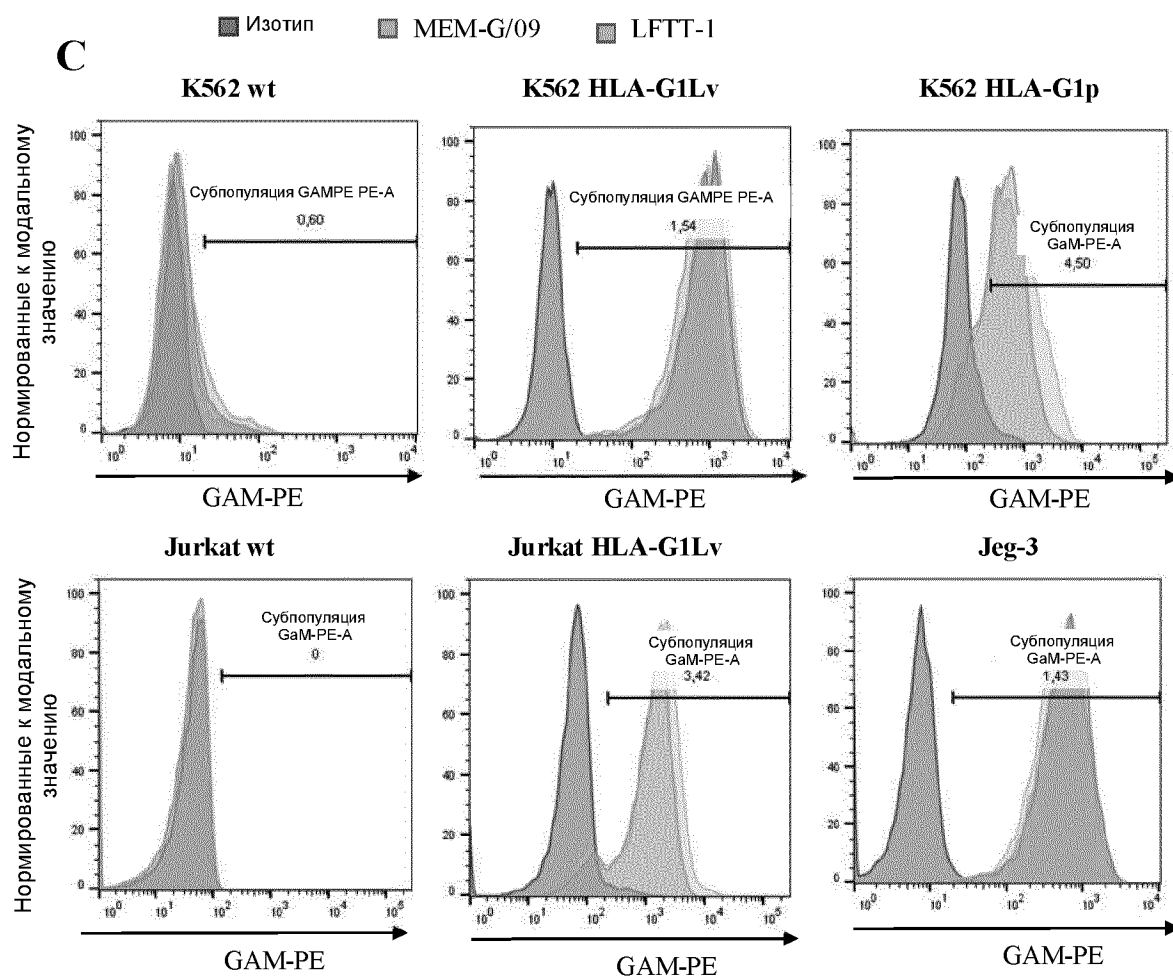
A



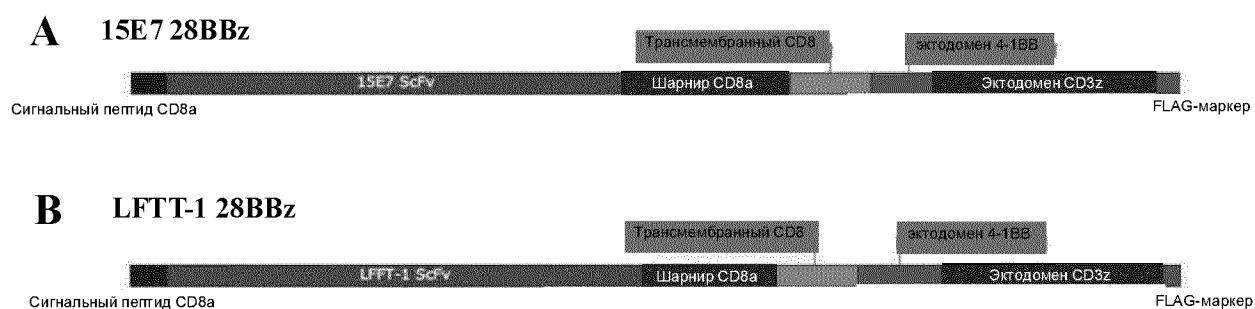
B



Фигура 2



Фигура 2 (Продолж.)

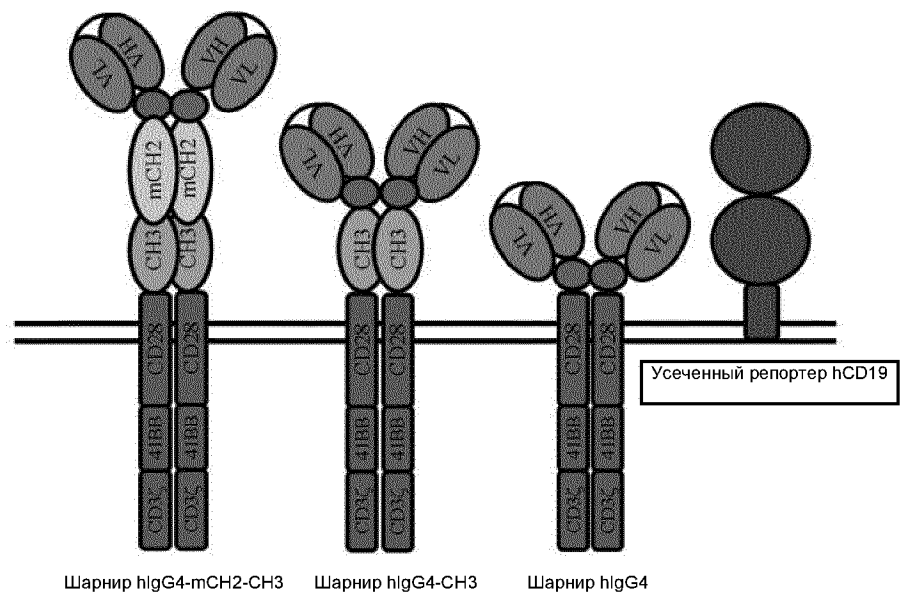


Фигура 3

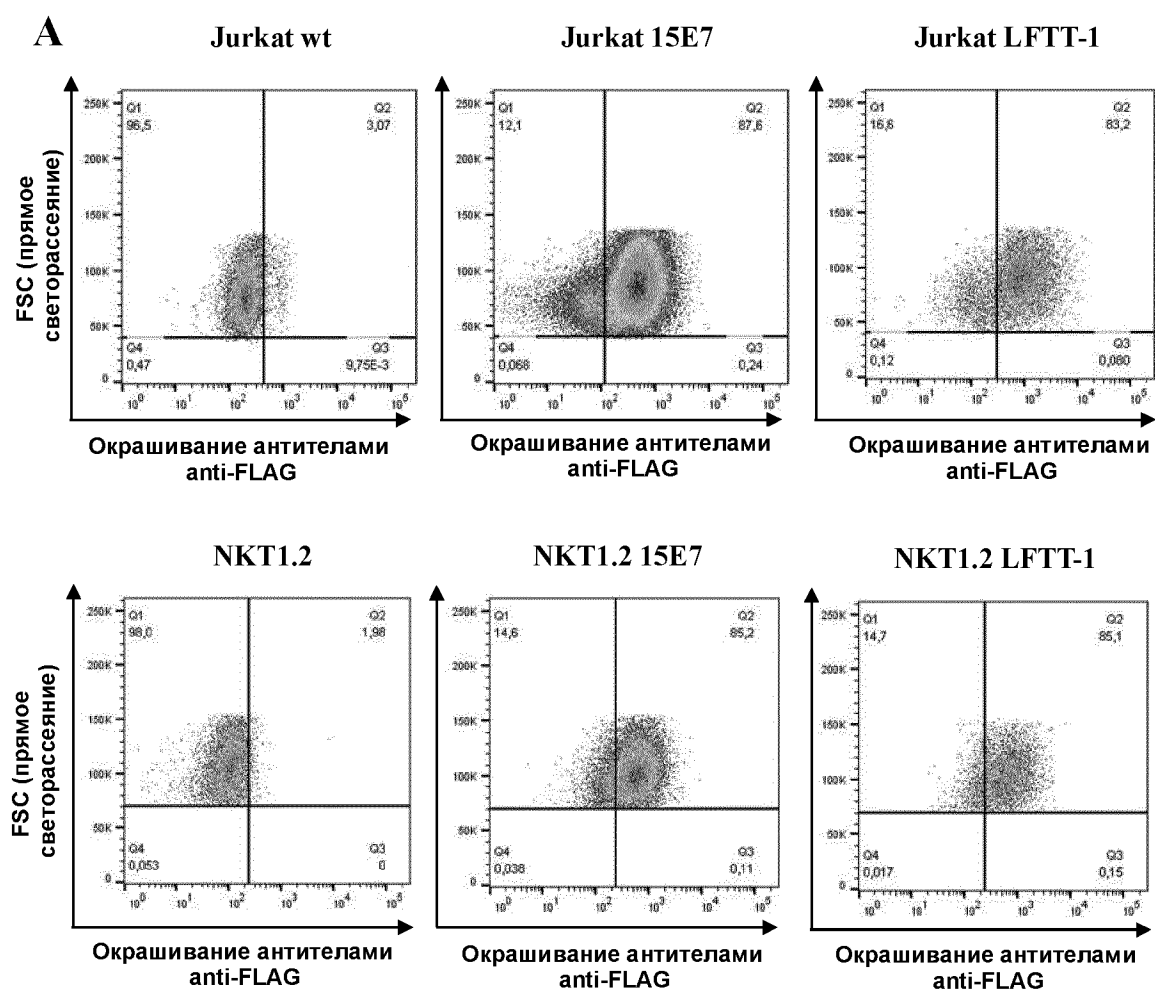
A Шарнир hlgG4+

Сигнальный пептид	ScFv (VL-VH)	Шарнир hlgG4	Мутировавший CH2 hlgG4	CH3 hIgG4	28BBζ	P2A	Усеченный hCD19
Шарнир hlgG4+							
Сигнальный пептид	ScFv (VL-VH)	Шарнир hlgG4	CH3 hIgG4	28BBζ	P2A	Усеченный hCD19	
Шарнир							
Сигнальный пептид	ScFv (VL-VH)	Шарнир hlgG4	28BBζ	P2A	Усеченный hCD19		

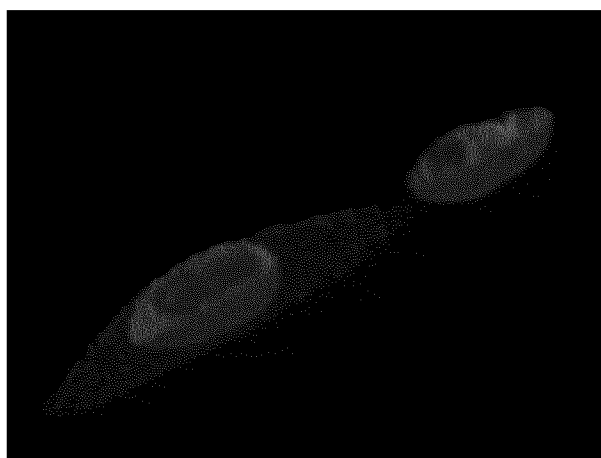
B



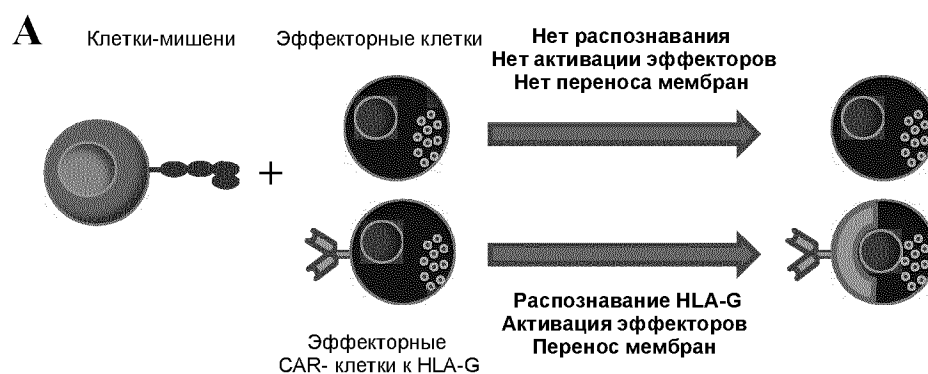
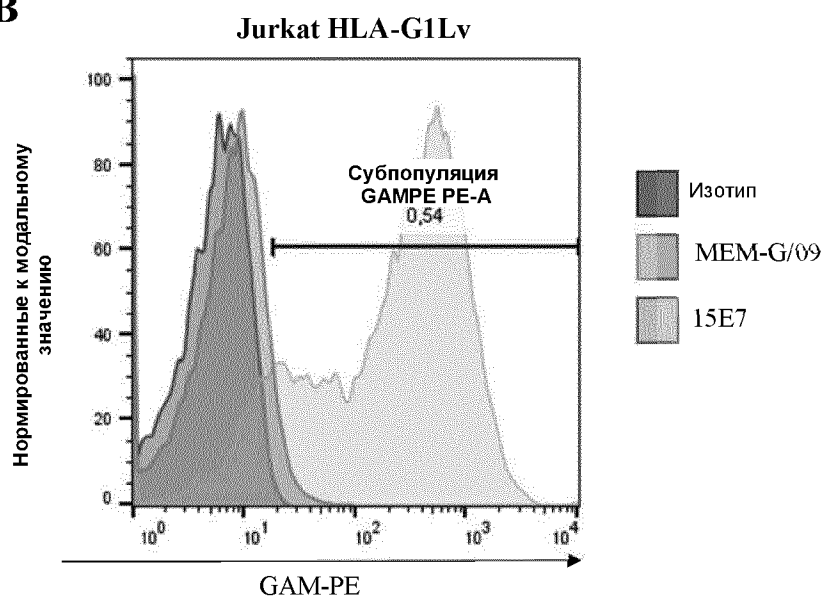
Фигура 4



B



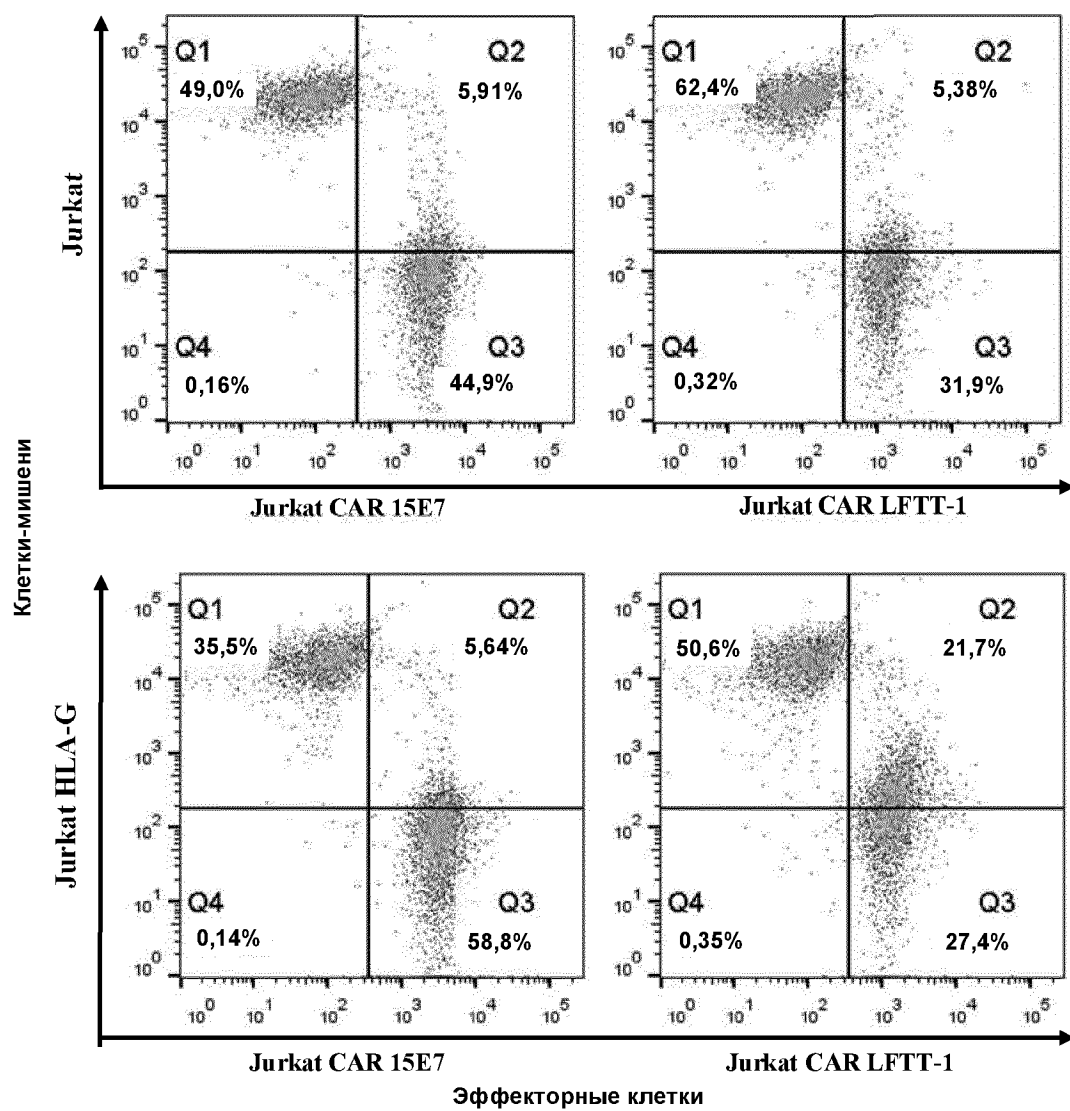
Фигура 5

**B**

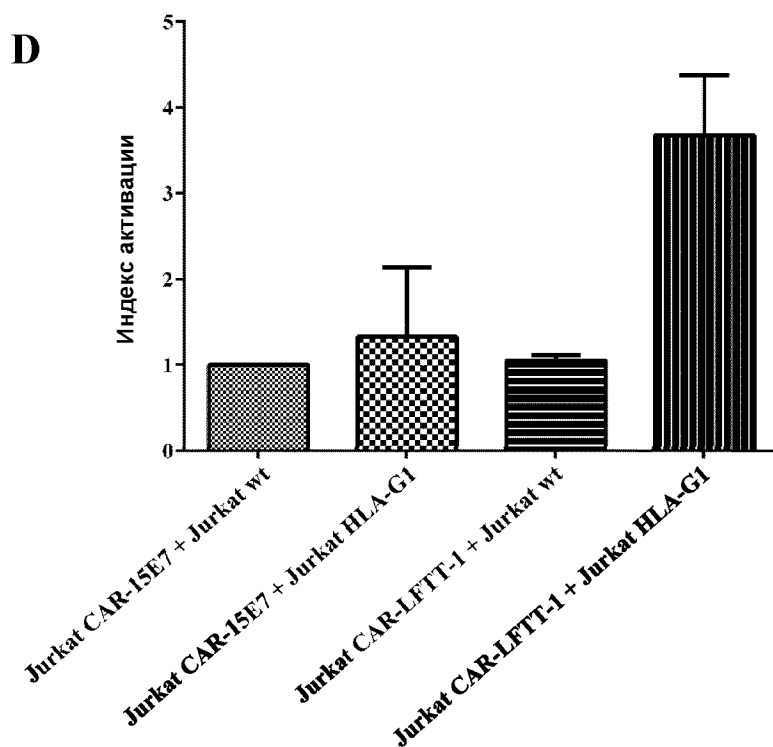
Фигура 6

С

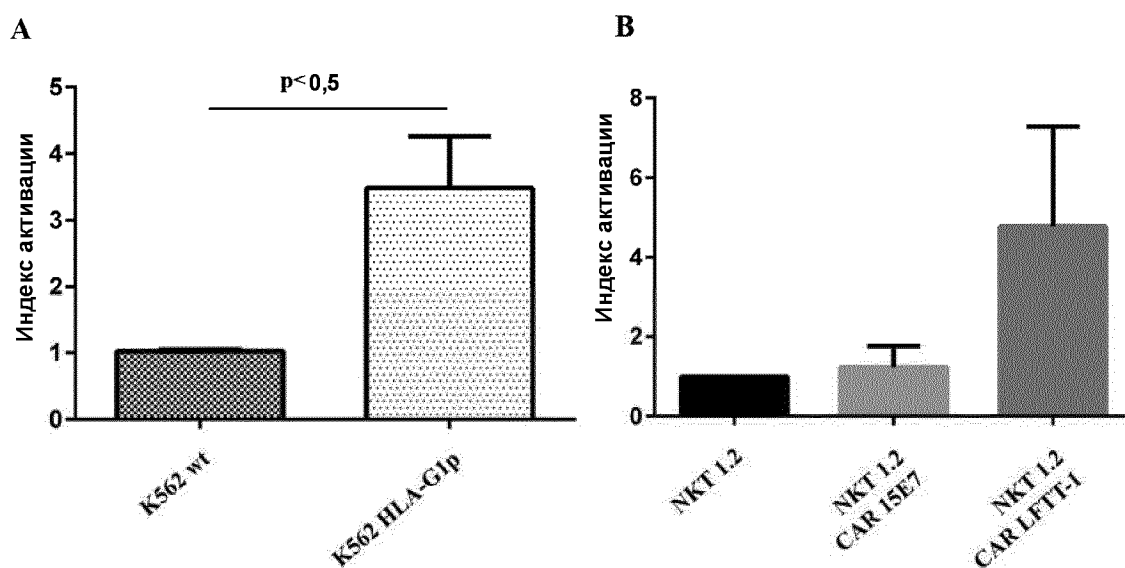
Совместная инкубация в течение 1 часа



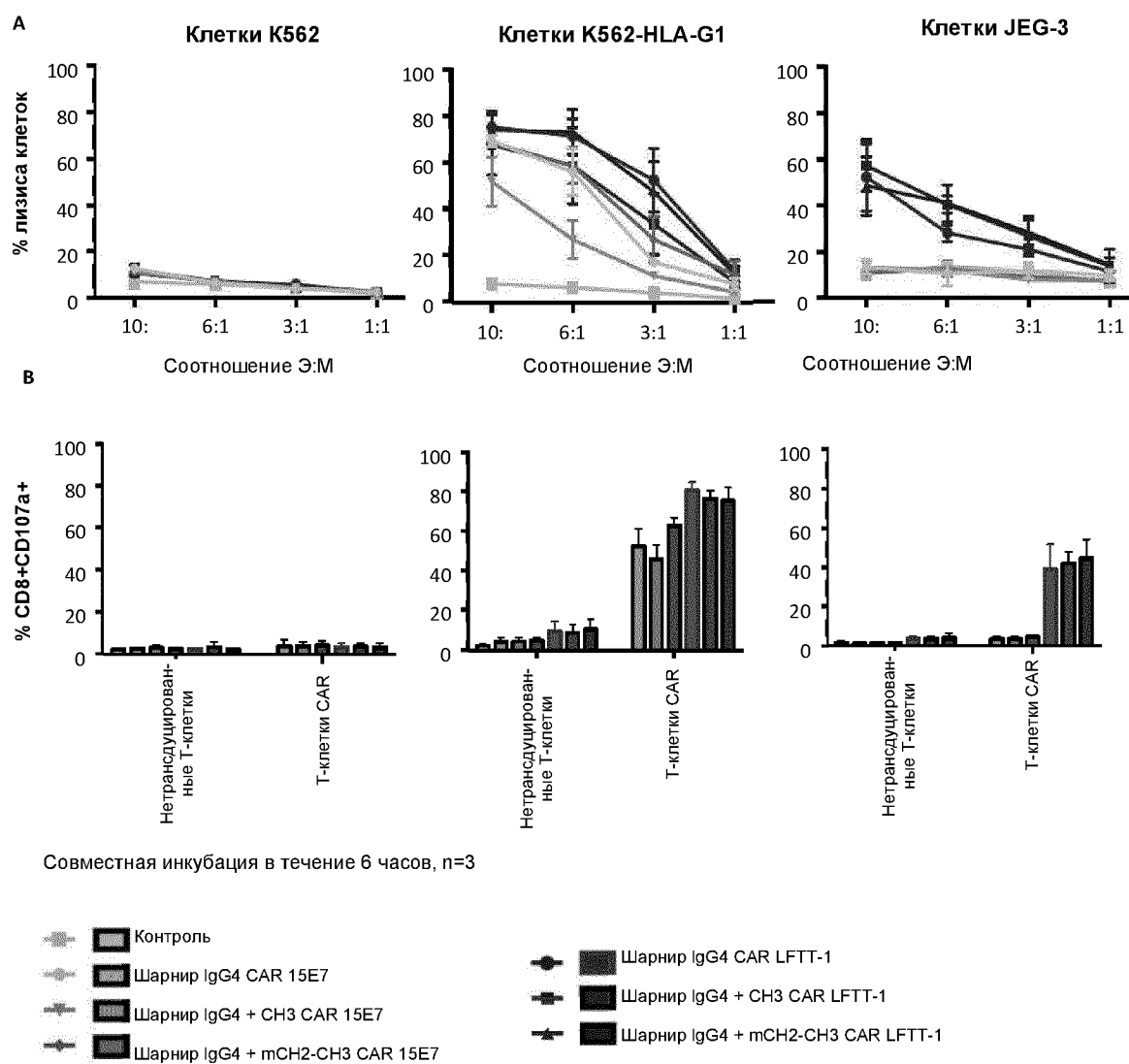
Фигура 6 (Продолж.)



Фигура 6 (Продолж.)

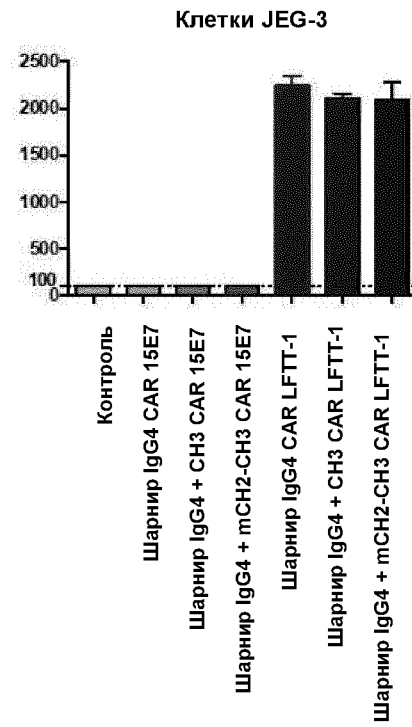
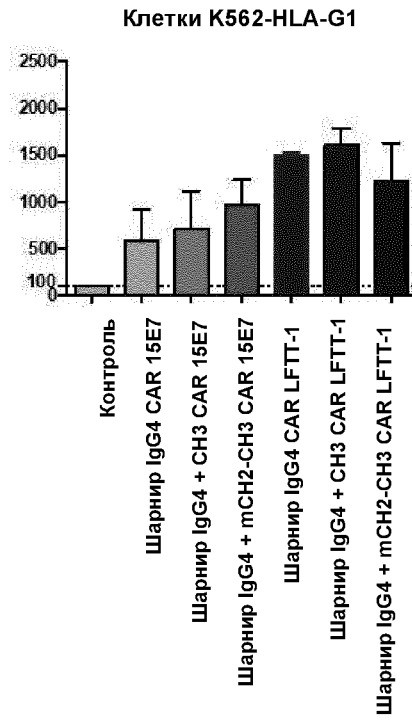
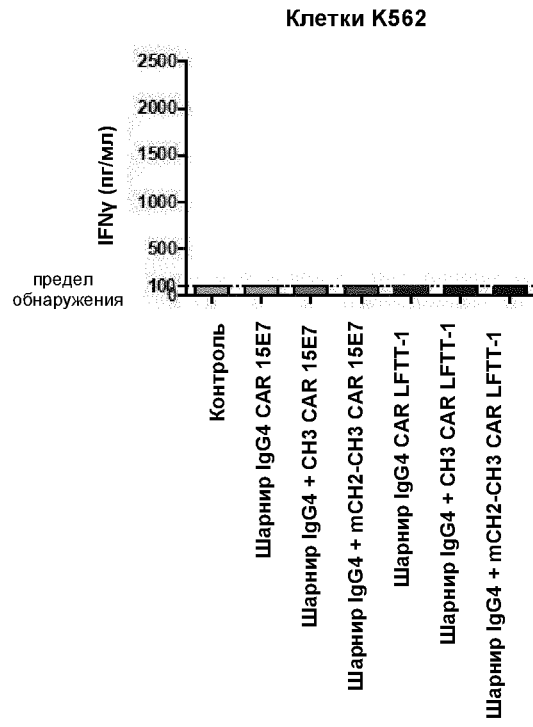


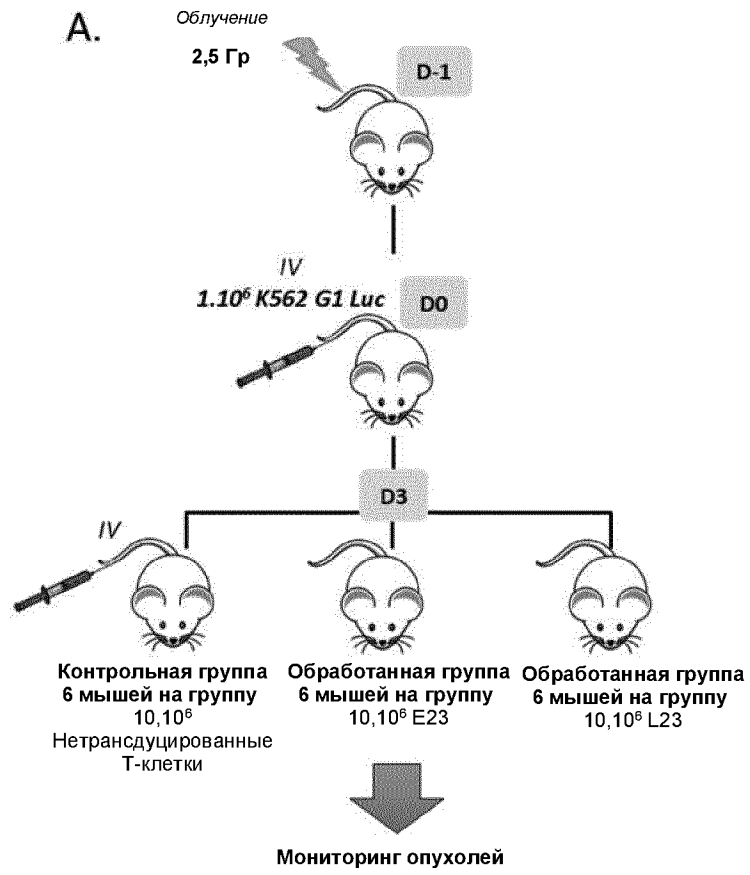
Фигура 7



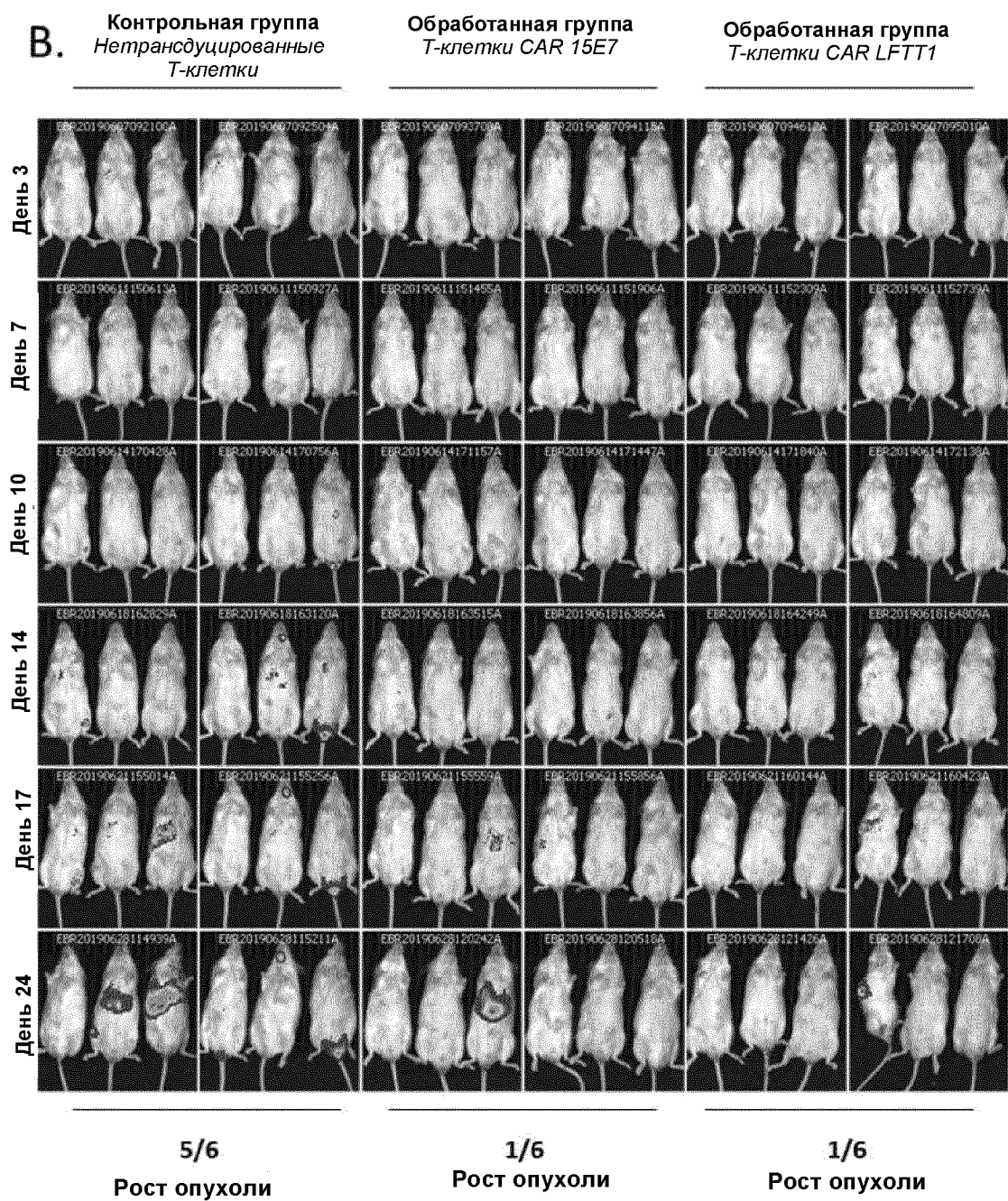
Фигура 8

6 а.г.г.г.г.г.





Фигура 10



Фигура 10 (Продолж.)