

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192638** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.12.22

(22) Дата подачи заявки
2020.03.24

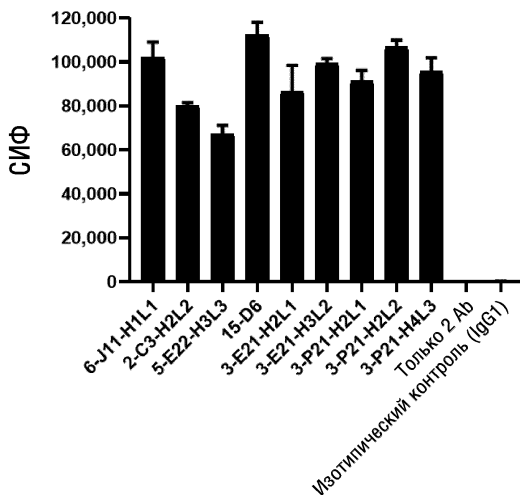
(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИ-КЛАУДИН 18.2 ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/825,955; 62/859,843; 62/896,758**
(32) **2019.03.29; 2019.06.11; 2019.09.06**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/024432**
(87) **WO 2020/205331 2020.10.08**
(71) Заявитель:
ФЕЙНЗ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ван Минхань, Цзоу Хой, Цзя Хайцюнь
(US)
(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Описаны химерные антигенные рецепторы (CAR), специфичные к CLDN 18.2, векторы, кодирующие CLDN 18.2 CAR, рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие CLDN 18.2 CAR (CAR-T или CAR-NK) и способы применения CAR-T или CAR-NK для лечения заболевания, ассоциированного с экспрессией CLDN 18.2.



A1

202192638

202192638

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-570539EA/050

ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИ-КЛАУДИН 18.2 ХИМЕРНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки США № 62/896,758, поданной 6 сентября 2019 г.; временной заявки США № 62/859,843, поданной 11 июня 2019 г.; и временной заявки США 62/825,955, поданной 29 марта 2019 года. Каждое раскрытие полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к гуманизированным анти-клаудин 18.2 (CLDN 18.2) химерным антигенным рецепторам (CAR), нуклеиновым кислотам и векторам экспрессии, кодирующим CAR, Т-клеткам, сконструированным для экспрессии CAR (CAR-T), и NK-клеткам, сконструированным для экспрессии CAR (CAR-NK). Изобретение также относится к способам получения CAR, способам получения CAR-T/CAR-NK и способам применения CAR-T/CAR-NK для лечения заболевания, ассоциированного с экспрессией CLDN 18.2, включая рак.

ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ ЭЛЕКТРОННЫМ ОБРАЗОМ

Эта заявка содержит список последовательностей, который представлен в электронном виде через EFS-Web в виде списка последовательностей в формате ASCII с именем файла «065799.19WO1 Sequence Listing» и датой создания 11 марта 2020 г. и размером 147 кб. Список последовательностей, представленный через EFS-Web, является частью спецификации и полностью включен в настоящее описание в качестве ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Стандартные противораковые лекарственные средства дают значительные преимущества. В последнее время наличие иммуно-онкологических лекарственных средств, таких как анти-PD-1 mAb, анти-PD-L1 mAb и анти-CD3 привлекающие Т-клетки биспецифические активаторы продвинуло концепцию привлечения и активации иммунной системы пациента к борьбе с различными типами рака. Тем не менее, слабый ответ, недостаточная эффективность и/или вопросы безопасности все еще являются проблемами. Клеточная терапия CAR-T (химерным антигенным рецептором-Т) включает генетическое конструирование собственных иммунных клеток пациента, таких как Т-клетки, и перенаправление их на подходящий поверхностный антиген раковых клеток (Mayor et al., Immunotherapy. 2016; 8: 491-494). Этот подход продемонстрировал успех у пациентов, страдающих хеморефрактерными В-клеточными злокачественными новообразованиями и другими видами рака (Pettitt et al., Mol Ther. 2018; 26:342-353). Т-клетки могут быть сконструированы так, чтобы обладать специфичностью к одной или более мишеням/антигенам поверхности раковых клеток для распознавания и уничтожения раковых клеток. Процесс включает трансдукцию Т-клеток с ДНК или другим генетическим

материалом, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR), который включает внеклеточный антигенспецифический связывающий домен, такой как один или более одноцепочечных вариабельных фрагментов (ScFv) моноклонального антитела, шарнирная и трансмембранная область и внутриклеточный сигнальный домен (включая один или более костимулирующих доменов и один или более активирующих доменов) (Kochenderfer et al., *Nat Rev Clin Oncol.* 2013; 10: 267-276). CAR-экспрессирующие иммунные клетки, такие как Т-клетки и NK-клетки, могут применяться для лечения различных заболеваний, включая гемобластозы и солидные опухоли. Успешные CAR-Т-клеточные терапии могут специфически распознавать и разрушать клетки-мишени и сохранять способность выживать и пролиферировать с течением времени.

Клаудин 18.2 (CLDN18.2), также известный как клаудин-18a2.1, является членом семейства трансмембранных белков клаудинов (CLDN) из, по меньшей мере, 27 изоформ у людей. Клаудины являются основными структурными компонентами тесной связи между эпителиальными клетками и функционированием в качестве ионных пор для регулирования трансклеточной проницаемости катионов и анионов (Sahin et al., *Physiol Rev.* 2013; 93:525-569). Экспрессия CLDN18 обычно ограничена в тканях легких и желудка. CLDN18 имеет два варианта сплайсинга. CLDN18.1 является специфичным для легких вариантом, в то время как CLDN18.2 является специфичным к желудку вариантом. Варианты сплайсинга различаются на их N-концевых 69 аминокислотных остатках из-за альтернативного сплайсинга первого экзона (Niimi et al., *Mol Cell Biol.* 2001; 21:7380-7390). Исследования на мышах с нокаутом CLDN18.2 позволяют предположить, что CLDN18.2 играет критическую роль в профилактике подтекания желудочной кислоты в просвет желудка (Hayash et al., *Gastroenterology* 2012; 142:292-304).

Дерегулированная экспрессия клаудинов определяется во многих видах рака и может играть роль в онкогенезе и инвазивности рака (Singh et al., *J Oncology* 2010; 2010: 541957). Экспрессия CLDN18.2 повышена при протоковых аденокарциномах поджелудочной железы (PDAC) (Tanaka et al., *J Histochem Cytochem.* 2011; 59:942-952), раках пищевода, немелкоклеточных раках легких (NSCLC), раках яичников (Sahin et al., *Clin Cancer Res.* 2008; 14:7624-7634), аденокарциномах желчных протоков (Keira et al., *Virchows Arch.* 2015; 466:265-277) и холангиокарциномах (Shinozaki et al., *Virchows Arch.* 2011; 459:73-80). CLDN18.2 является идеальной мишенью для CAR-Т-клеточных терапий для лечения и вылечивания CLDN18.2-положительных раков.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ.

В одном общем аспекте изобретение относится к конструкции химерного антигенного рецептора (CAR), которая индуцирует опосредованное Т-клетками уничтожение рака, где конструкция CAR содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, который специфически связывает клаудин 18.2 человека (CLDN 18.2), шарнирную область, трансмембранную область, и внутриклеточной сигнальный домен.

Изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, содержащим

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR). CAR может содержать (а) внеклеточный домен, содержащий, по меньшей мере, один антигенсвязывающий домен, который специфически связывает клаудин 18.2 (CLDN 18.2); (б) шарнирную область; (с) трансмембранную область; и (d) внутриклеточный сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 21, 22, 23, 51, 52 и 53, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 24, 25, 26, 54, 55 и 56, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 27, 28, 29, 57, 58 и 59, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 30, 31, 32, 60, 61 и 62, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 33, 34, 35, 63, 64 и 65, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 36, 37, 38, 66, 67 и 68, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 39, 40, 41, 69, 70 и 71, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 42, 43, 44, 72, 73 и 74, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 45, 46, 47, 75, 76 и 77, соответственно; и
- (10) SEQ ID NO: 48, 49, 50, 78, 79 и 80, соответственно;

где их антигенсвязывающий домен, специфически связывается с CLDN 18.2, предпочтительно CLDN 18.2 человека.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 81, 82, 83, 111, 112 и 113, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 84, 85, 86, 114, 115 и 116, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 87, 88, 89, 117, 118 и 119, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 90, 91, 92, 120, 121 и 122, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 93, 94, 95, 123, 124 и 125, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 96, 97, 98, 126, 127 и 128, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 99, 100, 101, 129, 130 и 131, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 102, 103, 104, 132, 133 и 134, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 105, 106, 107, 135, 136 и 137, соответственно; и
- (10) SEQ ID NO: 108, 109, 110, 138, 139 и 140, соответственно;

где их антигенсвязывающий домен специфически связывает CLDN 18.2, предпочтительно CLDN 18.2 человека.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере

98% или по меньшей мере, 99% идентичную SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 или 19, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен содержит:

(1) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2;

(2) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 4;

(3) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6;

(4) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8;

(5) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10;

(6) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12;

(7) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;

(8) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16;

(9) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18; или

(10) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен является гуманизированным и содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере на 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную

любой из SEQ ID NOs: 142, 143, 146, 147, 151, 152, 154, 155, 156, 159, 160, 161, 162, 166, 167, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 186, 187, 191, 192 или 193, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере на 99% идентичную любой из SEQ ID NOs: 144, 145, 148, 149, 150, 153, 157, 158, 163, 164, 165, 168, 169, 173, 174, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 189, 190, 194, 195, 196 или 197.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен является гуманизированным и содержит:

(1) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 142, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 144;

(2) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 142, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 145;

(3) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 143, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 144;

(4) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 143, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 245;

(5) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 146, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 148;

(6) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 146, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 149;

(7) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 146, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 150;

(8) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 147, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 148;

(9) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 147, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 149;

(10) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 147, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 150;

(11) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную

последовательность SEQ ID NO: 151, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 153;

(12) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 152, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 153;

(13) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 154, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 157;

(14) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 155, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 157;

(15) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 156, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 158;

(16) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 159, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 163;

(17) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 159, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 164;

(18) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 160, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 163;

(19) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 160, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 164;

(20) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 161, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 165; или

(21) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 162, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 165.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающим доменом является одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), который специфически связывает CLDN 18.2, предпочтительно CLDN 18.2 человека.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающим доменом является гуманизированный одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), который специфически связывает CLDN 18.2, предпочтительно CLDN 18.2 человека.

В некоторых вариантах осуществления, гуманизированный одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv) содержит полипептидную последовательность, по меньшей

мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 198-215.

В некоторых вариантах осуществления, химерный антигенный рецептор (CAR) содержит один или более антигенсвязывающих доменов.

В некоторых вариантах осуществления, внутриклеточный сигнальный домен содержит один или более костимулирующих доменов и один или более активирующих доменов.

Также изобретение относится к химерным антигенным рецепторам (CAR), кодируемым выделенными полинуклеотидами по изобретению.

Также изобретение относится к векторам, содержащим выделенные полинуклеотиды, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по изобретению.

Также изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим векторы по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления, клеткой-хозяином является Т-клетка, предпочтительно, Т-клетка человека. В некоторых вариантах осуществления, клеткой-хозяином является НК-клетка, предпочтительно, НК-клетка человека. Например, Т-клетка или НК-клетка могут быть сконструированы для экспрессии CAR по изобретению для лечения таких заболеваний, как рак.

Также изобретение относится к способам получения клетки-хозяина, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению. Способы включают трансдукцию Т-клетки или НК-клетки вектором, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по изобретению.

Также изобретение относится к способам получения CAR-Т клеток или CAR-NK клеток по изобретению. Способы включают культивирование Т-клеток или НК-клеток, содержащих выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению в условиях для получения CAR-Т клетки или CAR-NK клетки, и выделение CAR-Т клетки или CAR-NK клетки.

Также изобретение относится к способам создания популяции РНК-сконструированных клеток, содержащих химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению. Эти способы включают контакт клетки с выделенным полинуклеотидом, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению, где выделенный полинуклеотид *in vitro* транскрибируется РНК или синтетической РНК.

Также изобретение относится к способам лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающим введение субъекту CAR-Т-клеток и/или CAR-NK-клеток по изобретению. Раком может быть любой гемобластоз или солидный рак, например, он может быть выбран из, но не ограничиваться ими, рака легких, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака

яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

Также изобретение относится к способам лечения воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающим введение субъекту CAR-T-клеток и/или CAR-NK-клеток по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления, способы лечения рака или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, дополнительно включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, агента, который увеличивает эффективность клетки, экспрессирующей молекулу CAR.

В некоторых вариантах осуществления, способы лечения рака или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, дополнительно включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, агента, который ослабляет один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей молекулу CAR.

В некоторых вариантах осуществления, способы лечения рака или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, дополнительно включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, агента, который лечит заболевание, связанное с CLDN 18.2.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Приведенная выше сущность изобретения, а также следующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящей заявки будет лучше понято при чтении вместе с прилагаемыми чертежами. Однако следует понимать, что заявка не ограничивается точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

На фиг. 1A-1B показано связывание гуманизированных анти-CLDN 18.2 mAb с HEK293-CLDN18.2 и HEK293-CLDN18.1, которые стабильно экспрессируют полноразмерный CLDN18.2 человека. Эксперимент проводят FACS анализом.

На фиг. 2A- 2D показано связывание гуманизированных анти-CLDN 18.2 mAb с клетками HEK293-CLDN18.2, которые экспрессируют полноразмерный CLDN18.2 и CLDN18.1 человека, соответственно. Эксперимент проводят FACS анализом.

На фиг. 3A-3L показано связывание гуманизированных scFv с клетками HEK293-CLDN18.2, стабильно экспрессирующими полноразмерный CLDN 18.2 человека. Эксперимент проводят FACS анализом.

На фиг. 4 показана активность по уничтожению опухолевых клеток CAR T-клеток, собранных с анти-CLDN 18.2 scFv против клеток, экспрессирующих CLDN18.2 (HEK293-CLDN18.2); клетки, экспрессирующие CLDN18.1 (HEK293-CLDN18.1) используют в качестве контроля.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Различные публикации, статьи и патенты цитируются или описываются в разделе

«Известный уровень техники» и по всему описанию; каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей и подобных, которые были включены в настоящее описание, имеет целью предоставить контекст для изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что некоторые или все эти вопросы составляют часть известного уровня техники в отношении любых описанных или заявленных изобретений.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится это изобретение. В противном случае некоторые используемые здесь термины имеют значения, указанные в описании.

Следует отметить, что используемые здесь и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественные ссылки, если контекст явно не диктует иное.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные здесь, следует понимать как измененные во всех случаях термином «примерно». Таким образом, числовое значение обычно содержит $\pm 10\%$ от приведенного значения. Например, концентрация 1 мг/мл содержит от 0,9 до 1,1 мг/мл. Аналогично, диапазон концентраций от 1% до 10% (масс./об.) содержит от 0,9% (масс./об.) до 11% (масс./об.). В данном контексте использование числового диапазона явно включает в себя все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в этом диапазоне, включая целые числа в таких диапазонах и доли значений, если контекст явно не указывает иное.

Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в ряду. Специалисты в данной области техники поймут или смогут установить, используя не более чем рутинное экспериментирование, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в данном документе. Предполагается, что такие эквиваленты входят в объем настоящего изобретения.

Используемые здесь термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «имеет», «имеющий», «содержит» или «содержащий» или любые другие их варианты будут поняты как включающие указанное целое число или группы целых чисел, но не исключающие любое другое целое число или группы целых чисел, и предназначены для того, чтобы быть неисключительными или открытыми. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или аппарат, который содержит список элементов, не обязательно ограничивается только этими элементами, но может включать другие элементы, не указанные в явном виде или присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или аппарату. Кроме того, если прямо не указано иное, «или» относится к включающему или, а не к исключающему или. Например, условие А или В удовлетворяется одним из следующих условий: А истинно (или присутствует), а В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует) и В истинно (или присутствует), и оба А и В

истинны (или присутствуют).

Используемый здесь термин «и/или» между множеством перечисленных элементов понимается как охватывающий как индивидуальные, так и комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к применимости первого элемента без второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента без первого. Третий вариант относится к применимости первого и второго элементов вместе. Подразумевается, что любой из этих вариантов подпадают под значение и, следовательно, удовлетворяют требованию термина «и/или», как он используется в данном документе. Подразумевается, что одновременное применение более чем одного из вариантов подпадают под это значение и, следовательно, удовлетворяют требованию термина «и/или».

Используемый здесь термин «состоит из» или его варианты, такие как «состоит из» или «состоящий из», используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого перечисленного целого числа или группы целых чисел, но что никакое дополнительное целое число или группа целых чисел не может быть добавлено к указанному способу, структуре или композиции.

Используемый здесь термин «состоит по существу из» или варианты, такие как «состоит по существу из» или «состоящий по существу из», используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого перечисленного целого числа или группы целых чисел и необязательное включение любого перечисленного целого числа или группы целых чисел, которые по существу не изменяют основные или новые свойства указанного способа, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. § 2111.03.

Используемый здесь термин «субъект» означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно, человека. Термин «млекопитающее», используемый здесь, охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т.д., более предпочтительно, человека.

Слова «правый», «левый», «нижний» и «верхний» обозначают направления на чертежах, на которые делается ссылка.

Также следует понимать, что термины «примерно», «приблизительно», «в целом», «по существу» и подобные термины, используемые здесь при ссылке на размер или характеристику компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанный размер/характеристика не является строгой границей или параметром и не исключает незначительные отклонения от них, которые функционально являются одинаковыми или подобными, как было бы понятно специалисту в данной области техники. Как минимум, такие ссылки, которые включают числовой параметр, будут включать вариации, которые, используя математические и промышленные принципы, принятые в данной области техники (например, округление, измерение или другие систематические ошибки, производственные допуски и т. д.), не будут изменять наименее

значащую цифру..

Термины «идентичный» или доля «идентичности» в контексте двух или несколько нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, химерных антигенных рецепторов (CAR), содержащих антигенсвязывающие домены, специфичные для CLDN 18.2, и полинуклеотидов, кодирующих их, полипептидов CLDN 18.2 и полинуклеотидов CLDN 18.2, кодирующих их), относятся к двум или нескольким последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенную долю одинаковых аминокислотных остатков или нуклеотидов при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, как измерено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального осмотра.

Для сравнения последовательностей обычно одна последовательность действует как эталонная последовательность, с которой сравниваются тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемая и эталонная последовательности вводят в компьютер, при необходимости указывают координаты подпоследовательности и указывают параметры программы алгоритма последовательности. Затем алгоритм сравнения последовательностей вычисляет долю идентичности последовательностей для тестируемой последовательности(ей) относительно эталонной последовательности на основе указанных параметров программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), с помощью алгоритма выравнивания гомологии Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), поиском по способу сходства Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или путем визуального осмотра (см. о целом Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

Примерами алгоритмов, которые подходят для определения доли идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST публично доступно через National Center for Biotechnology Information. Этот алгоритм содержит в себя сначала идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP) через идентификацию коротких слов длины W в последовательности запроса, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторой положительной пороговой оценке T при выравнивании со словом такой же длины в последовательности базы данных. T называется порогом

показателя сходства слов (Altschul et al, supra). Эти начальные совпадения соседних слов действуют как заправка для инициирования поиска, чтобы найти более длинные HSP, содержащие их. Затем совпадения слов расширяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока может быть увеличена совокупная оценка выравнивания.

Совокупные оценки вычисляют с использованием, для нуклеотидных последовательностей, параметров M (поощрительных баллов для пары совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафных баллов за несовпадающие остатки; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей используют оценочную матрицу для вычисления совокупной оценки. Расширение совпадений слов в каждом направлении прекращается, когда: совокупная оценка выравнивания падает на величину X от ее максимального достигнутого значения; совокупная оценка становится равной нулю или ниже из-за накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательной оценкой; либо достигнут конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST, W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует по умолчанию длину слова (W), равную 11, математическое ожидание (E), равное 10, $M=5$, $N = -4$, и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей программа BLASTP использует по умолчанию длину слова (W), равную 3, математическое ожидание (E), равное 10, и оценочную матрицу BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

Помимо вычисления доли идентичности последовательностей, алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Одной из мер сходства, обеспечиваемой алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая обеспечивает указание вероятности того, что совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями может произойти случайно. Например, нуклеиновая кислота считается подобной эталонной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее примерно 0,1, более предпочтительно, менее примерно 0,01 и наиболее предпочтительно, менее примерно 0,001.

Еще одним признаком того, что две последовательности нуклеиновой кислоты или полипептиды, по существу, идентичны в том, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, является иммунологически перекрестно реактивным с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид обычно по существу идентичен второму полипептиду, например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим признаком того, что две последовательности нуклеиновых кислот по существу идентичны, является то, что две молекулы гибридизируются друг с другом в строгих условиях.

Используемый здесь термин «выделенный» означает биологический компонент

(такой как нуклеиновая кислота, пептид или белок), который был по существу отделен, продуцирован отдельно от или очищен от других биологических компонентов организма, в котором компонент встречается в природе, т.е. других хромосомных и внехромосомных ДНК и РНК, и белков. Таким образом, нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, которые были «выделены», включают нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными способами очистки. «Выделенные» нуклеиновые кислоты, пептиды и белки могут быть частью композиции и при этом быть выделенными, если композиция не является частью нативной среды нуклеиновой кислоты, пептида или белка. Термин также охватывает нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, полученные путем рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты.

Используемый здесь термин «полинуклеотид», синонимично обозначаемый как «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеотиды» или «нуклеиновые кислоты», относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может быть не модифицированной РНК или ДНК или модифицированной РНК или ДНК. «Полинуклеотиды» включают, без ограничения, одно- и двухцепочечную ДНК, ДНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечную РНК и РНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных областей, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, более типично, двухцепочечными, или смесью одноцепочечных и двухцепочечных областей. Кроме того, «полинуклеотид» относится к трехцепочечным областям, содержащим РНК или ДНК, или и РНК и ДНК. Термин полинуклеотид также включает ДНК или РНК, содержащие одно или несколько модифицированных оснований, и ДНК или РНК со скелетами, модифицированными для стабильности или по другим причинам. «Модифицированные» основания включают, например, тритилированные основания и необычные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК можно вносить различные модификации; таким образом, «полинуклеотид» охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, которые обычно встречаются в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. «Полинуклеотид» также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

Используемый здесь термин «вектор» означает репликон, в который может быть функционально вставлен другой сегмент нуклеиновой кислоты, чтобы вызвать репликацию или экспрессию сегмента.

Используемый здесь термин «клетка-хозяин» относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению. «Клетка-хозяин» может быть клеткой любого типа, например, первичной клеткой, клеткой в культуре или клеткой из клеточной линии. В одном варианте осуществления, «клетка-хозяин» представляет собой клетку, трансфицированную или трансдуцированную молекулой нуклеиновой кислоты по изобретению. В другом варианте осуществления, «клетка-хозяин» представляет собой потомство или потенциальное потомство такой трансфицированной или

трансдуцированной клетки. Потомство клетки может быть или не быть идентичным родительской клетке, например, из-за мутаций или влияний окружающей среды, которые могут происходить в последующих поколениях, или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

Термин «экспрессия», как используется здесь, относится к биосинтезу генного продукта. Термин охватывает транскрипцию гена в РНК. Термин также охватывает трансляцию РНК в один или более полипептидов и, кроме того, охватывает все существующие в природе посттранскрипционные и посттрансляционные модификации. Экспрессированный CAR может находиться в цитоплазме клетки-хозяина, во внеклеточной среде, такой как среда для роста клеточной культуры, или быть прикрепленным к клеточной мембране.

В настоящем описании, термин «иммунная клетка» или «иммунные эффекторныe клетки» относится к клетке, которая вовлечена в иммунный ответ, например, в способствование ответу иммунного эффектора. Примеры иммунных клеток включают Т-клетки, В-клетки, естественные киллеры (NK), тучные клетки и фагоциты миелоидного происхождения. Согласно конкретным вариантам осуществления, сконструированные иммунные клетки представляют собой Т-клетки и называются CAR-Т-клетками, поскольку они сконструированы для экспрессии CAR по изобретению.

Используемый здесь термин «сконструированная иммунная клетка» относится к иммунной клетке, также называемой иммунной эффекторной клеткой, которая была генетически модифицирована путем добавления дополнительного генетического материала в форме ДНК или РНК к общему генетическому материалу клетки. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, сконструированные иммунные клетки были генетически модифицированы для экспрессии конструкции CAR согласно изобретению.

Химерный антигенный рецептор (CAR)

Используемый здесь термин «химерный антигенный рецептор» (CAR) относится к рекомбинантному полипептиду, содержащему, по меньшей мере, внеклеточный домен, который специфически связывается с антигеном или мишенью, трансмембранный домен и внутриклеточный Т-клеточный рецептор-активирующий сигнальный домен. Взаимодействие внеклеточного домена CAR с антигеном-мишенью на поверхности клетки-мишени приводит к кластеризации CAR и доставляет стимул активации в CAR-содержащую клетку. CAR перенаправляют специфичность иммунных эффекторных клеток и запускают пролиферацию, продуцирование цитокинов, фагоцитоз и/или продуцирование молекул, которые могут опосредовать гибель антигенэкспрессирующих клеток-мишеней независимым от основного комплекса гистосовместимости (МНС) образом.

В одном из аспектов, CAR содержит антигенсвязывающий домен, шарнирную область, костимулирующий домен, активирующий домен и трансмембранную область. В одном аспекте, CAR содержит антигенсвязывающий домен, шарнирную область, два

костимулирующих домена, активирующий домен и трансмембранную область. В одном аспекте, CAR содержит два антигенсвязывающих домена, шарнирную область, костимулирующий домен, активирующий домен и трансмембранную область. В другом аспекте, CAR содержит два антигенсвязывающих домена, шарнирную область, два костимулирующих домена, активирующий домен и трансмембранную область.

Используемый здесь термин «сигнальный пептид» относится к лидерной последовательности на amino-конце (N-конце) растущего белка CAR, который ко-трансляционно или пост-трансляционно направляет растущий белок в эндоплазматический ретикулум и последующую поверхностную экспрессию.

Используемый здесь термин «внеклеточный антигенсвязывающий домен», «внеклеточный домен» или «внеклеточный лигандсвязывающий домен» относится к части CAR, которая расположена вне клеточной мембраны и способна связываться с антигеном, мишенью или лигандом.

Используемый здесь термин «шарнирная область» относится к части CAR, которая соединяет два соседних домена белка CAR, например внеклеточный домен и трансмембранный домен.

Используемый здесь термин «трансмембранный домен» относится к части CAR, которая проходит через клеточную мембрану и прикрепляет CAR к клеточной мембране.

Костимулирующие домены

В контексте настоящего описания химерные антигенные рецепторы могут включать костимулирующие (сигнальные) домены для повышения их эффективности. Костимулирующий (сигнальный) домен может быть получен из костимулирующей молекулы. Костимулирующими молекулами являются молекулы клеточной поверхности, отличные от антигенных рецепторов или их лигандов, которые необходимы для эффективного иммунного ответа. Костимулирующие домены могут быть получены из костимулирующих молекул, которые могут включать, но не ограничиваются ими, CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (альфа, бета, дельта, эпсилон, гамма, дзета), CD4, CD5, CD7, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD33, CD37, CD40, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, запрограммированную смерть-1 (PD-1), индуцируемый костимулятор Т-клетки (ICOS), антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов (LFA-1; CD11a и CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (член суперсемейства фактора некроза опухоли 14; TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP10, Fc гамма рецептор, молекулу MHC класса I, TNFR, интегрин, молекулу сигнальной активации лимфоцитов, BTLA, лиганда Toll-рецептора, ICAM-1, CDS, GITR, BAFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, ITGAE, CD103, ITGAL, CD 1 a, CD1b, CD1c, CD1d, ITGAM, ITGAX, ITGB1, CD29, ITGB2 (CD18), IT GB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Тактиль), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD 160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1,

CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, CD83 лиганд, рецептор цитокина, активирующие рецепторы NK-клеток, или их фрагменты или любые их комбинации.

Активирующие домены

В настоящем описании химерные антигенные рецепторы могут содержать активирующие домены. Активирующие домены могут включать, но не ограничиваются ими, CD3. CD3 является элементом Т-клеточного рецептора на нативных Т-клетках и, как было показано, является важным внутриклеточным активирующим элементом в CAR. В предпочтительном варианте осуществления, CD3 является CD3 дзета.

Шарнирная область

Как описано в настоящем документе, химерный антигенный рецептор может содержать шарнирную область. Это часть внеклеточного домена, который иногда называют как «спейсерной» областью. Множество шарниров может быть использовано в соответствии с изобретением, включая костимулирующие молекулы, как обсуждалось выше, иммуноглобулиновые (Ig) последовательности или другие подходящие молекулы для получения желаемого специального расстояния от клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления, вся внеклеточная область содержит шарнирную область.

Трансмембранная область

В настоящем описании химерные антигенные рецепторы (CAR) могут включать трансмембранную область/домен. CAR может быть сконструирован так, чтобы содержать трансмембранный домен, который слит с внеклеточным доменом CAR. Аналогичным образом он может быть слит с внутриклеточным доменом CAR. В одном варианте используется трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в CAR. В некоторых случаях, трансмембранный домен может быть выбран или модифицирован путем аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же или других поверхностных мембранных белков, чтобы минимизировать взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса. Трансмембранный домен может быть получен из природного или синтетического источника. Если источник является природным, домен может быть получен из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области, которые можно использовать в настоящем изобретении, могут быть получены из (т.е. содержат или сконструированы из), но не ограничиваются ими, CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (альфа, бета, дельта, эпсилон, гамма, дзета), CD4, CD5, CD7, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD33, CD37, CD40, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, запрограммированную смерть-1 (PD-1), индуцируемый костимулятор Т-клеток (ICOS), антиген-1, связанный с функцией лимфоцитов (LFA-1; CD11a и CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (член суперсемейства фактора некроза опухоли 14; TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP10, рецептор Fc гамма, молекулу MHC класса I, TNFR, интегрин, сигнальную молекулу активации лимфоцитов, BTLA, лиганд Toll-рецептора, ICAM-1, CDS, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7,

NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, IA4, CD49D, ITGA6, VLA -6, CD49f, ITGAD, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, ITGAM, ITGAX, ITGB1, CD29, ITGB2 (CD18), ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Тактиль), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD 160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганд CD83, рецептор цитокина, активирующие рецепторы NK-клеток, белок иммуноглобулина или их фрагменты или любую их комбинацию.

Иммунные клетки

Согласно конкретным аспектам, изобретение относится к клеткам, которые являются иммунными клетками, которые содержат выделенные полинуклеотиды, или векторы, содержащие выделенные полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR. Иммунные клетки, содержащие выделенные полинуклеотиды и/или векторы по изобретению, можно назвать «сконструированными иммунными клетками». Предпочтительно, сконструированные иммунные клетки получают от человека (имеют человеческое происхождение до того, как будут сделаны рекомбинантными).

Сконструированные иммунные клетки могут быть, например, клетками лимфоидной линии. Неограничивающие примеры клеток лимфоидной линии могут включать Т-клетки и естественные киллеры (NK). Т-клетки экспрессируют Т-клеточный рецептор (TCR), при этом большинство клеток экспрессирует α и β цепи и меньшая популяция экспрессирует γ и δ цепи. Т-клетки, используемые в качестве сконструированных иммунных клеток по изобретению, могут быть CD4⁺ или CD8⁺ и могут включать, но не ограничиваться ими, Т-хелперные клетки (CD4⁺), цитотоксические Т-клетки (также называемые цитотоксическими Т-лимфоцитами, CTL; CD8⁺ клетки) и Т-клетки памяти, включая центральные Т-клетки памяти, подобные стволовым Т-клетки памяти и эффекторные Т-клетки памяти, естественные киллеры Т-клетки, ассоциированные со слизистой инвариантные Т-клетки, и $\gamma\delta$ Т-клетки. Другие типовые иммунные клетки включают, но не ограничиваются ими, макрофаги, антигенпрезентирующие клетки (APC) или любую иммунную клетку, которая экспрессирует ингибитор клеточно-опосредованного иммунного ответа, например рецептор пути ингибитора иммунной контрольной точки (например, PD-1). Клетки-предшественники иммунных клеток, которые можно использовать по изобретению, включают гемопоэтические стволовые клетки и/или клетки-предшественники. Гемопоэтические стволовые клетки и/или клетки-предшественники могут быть получены из костного мозга, пуповинной крови, периферической крови взрослых после мобилизации цитокинов и подобных, способами, известными в данной области техники. Иммунные клетки сконструированы для рекомбинантной экспрессии CAR по изобретению.

Иммунные клетки и их клетки-предшественники могут быть выделены способами, известными в данной области техники, включая коммерчески доступные способы (см., например, Rowland Jones et al., *Lymphocytes: A Practical Approach*, Oxford University Press, NY (1999)). Источники иммунных клеток или их предшественников включают, но не ограничиваются ими, периферическую кровь, пуповинную кровь, костный мозг или другие источники гемопоэтических клеток. Для разделения клеток с целью выделения или обогащения желаемых иммунных клеток можно использовать различные способы. Например, способы отрицательного селектирования могут использоваться для удаления клеток, которые не являются желаемыми иммунными клетками. Кроме того, для выделения или обогащения желаемых иммунных клеток или их предшественников можно использовать способы положительного селектирования, или можно использовать комбинацию способов положительного и отрицательного селектирования. Если необходимо выделить конкретный тип клеток, например конкретную Т-клетку, для разделения клеток можно использовать различные маркеры клеточной поверхности или комбинации маркеров (например, CD3, CD4, CD8, CD34).

Иммунные клетки или их клетки-предшественники могут быть аутологичными или не аутологичными по отношению к субъекту, которому они вводятся в способах лечения по изобретению. Аутологичные клетки выделяют у субъекта, которому должны быть введены сконструированные иммунные клетки, рекомбинантно экспрессирующие CAR. Необязательно, клетки можно получить с помощью лейкофереза, при котором лейкоциты выборочно удаляются из взятой крови, делаются рекомбинантными, а затем повторно трансфицируются донору. Альтернативно, можно использовать аллогенные клетки от не аутологичного донора, который не является субъектом. В случае не аутологичного донора, клетки типировать и сравнивают с человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA), для определения соответствующего уровня совместимости. Как для аутологичных, так и для не аутологичных клеток, клетки необязательно могут быть криоконсервированы до готовности к использованию.

Различные способы выделения иммунных клеток, которые можно использовать для рекомбинантной экспрессии CAR по изобретению, были описаны ранее и могут быть использованы, включая, но не ограничиваясь ими, использование периферических донорных лимфоцитов (Sadelain et al., *Nat. Rev. Cancer* 3:35-45 (2003); Morgan et al., *Science* 314:126-9 (2006)), использование культур лимфоцитов, полученных из лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL) в биопсиях опухоли (Panelli et al., *J. Immunol.* 164:495-504 (2000); Panelli et al., *J. Immunol.* 164:4382-92 (2000)) и использование селективно *in vitro* размноженных антигенспецифических лейкоцитов периферической крови, использование искусственных антигенпрезентирующих клеток (AAPC) или дендритных клеток (Dupont et al., *Cancer Res.* 65:5417-427 (2005); Papanicolaou et al., *Blood* 102:2498-505 (2003)). В случае использования стволовых клеток, клетки можно выделить способами, хорошо известными в данной области (см., например, Klug et al., *Hematopoietic Stem Cell Protocols*, Humana Press, NJ (2002); Freshney et al., *Culture of Human Stem Cells*,

John Wiley & Sons (2007)).

Согласно конкретным вариантам осуществления, способ создания сконструированных иммунных клеток включает трансфекцию или трансдукцию иммунных эффекторных клеток, выделенных от индивидуума, так, чтобы иммунные эффекторные клетки экспрессировали один или более CAR согласно вариантам осуществления изобретения. Способы получения иммунных клеток для иммунотерапии описаны, например, в WO2014/130635, WO2013/176916 и WO2013/176915, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки. Отдельные стадии, которые можно использовать для получения сконструированных иммунных клеток, описаны, например, в WO2014/039523, WO2014/184741, WO2014/191128, WO2014/184744 и WO2014/184143, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки.

В конкретном варианте осуществления, иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, генетически модифицированы CAR по изобретению (например, трансдуцированы вирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR), а затем активируются и размножаются *in vitro*. В различных вариантах осуществления, Т-клетки могут быть активированы и размножены до или после генетической модификации для экспрессии CAR с использованием способов, описанных, например, в US6352694, US6534055, US6905680, US6692964, US5858358, US6887466, US6905681, US7144575, US7067318, US7172869, US7232566, US7175843, US5883223, US6905874, US6797514, US6867041, US2006/121005, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки. Т-клетки можно размножать *in vitro* или *in vivo*. Как правило, Т-клетки по изобретению можно размножать через контакт с поверхностью, к которой прикреплен агент, который стимулирует сигнал, ассоциированный с комплексом CD3/TCR, и лиганд, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В качестве неограничивающих примеров, популяции Т-клеток могут быть стимулированы, как описано здесь, например, через контакт с анти-CD3 антителом, или его антигенсвязывающим фрагментом, или анти-CD-3 антителом, иммобилизованным на поверхности, или через контакт с активатором протеинкиназы C (например, бриостатином) в сочетании с ионофором кальция или через активацию самого CAR. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток используют лиганд, который связывает вспомогательную молекулу. Например, популяция Т-клеток может контактировать с анти-CD3 антителом и анти-CD28 антителом в условиях, подходящих для стимулирования пролиферации Т-клеток. Условия, подходящие для культивирования Т-клеток, включают, например, подходящую среду (например, Minimal Essential Media или RPMI Media 1640 или X-vivo 5 (Lonza)), которая может содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, фетальную бычью или человеческую сыворотку), цитокины, такие как IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21, инсулин, IFN-g, GM-CSF, TGFβ и/или какие-либо другие добавки для роста клетки, известные специалисту в данной области техники. В других вариантах осуществления, Т-клетки могут быть активированы и стимулированы для пролиферации

питающими клетками и подходящими антителами и цитокинами с использованием способов, таких как описаны в US6040177, US5827642 и WO2012129514, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Антигенсвязывающий домен

Используемый здесь термин «антигенсвязывающий домен» относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, Fab, Fab', F(ab')₂, фрагмент Fv, стабилизированный дисульфидом фрагмент Fv (dsFv), а (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), диатело, стабилизированное дисульфидом (ds диатело), молекула одноцепочечного антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), димер scFv (двухвалентное диатело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или несколько CDR, камелизированное однодоменное антитело, нанотело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полную структуру антитела. Антигенсвязывающий домен способен связываться с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело. Согласно конкретным вариантам осуществления, антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечную молекулу антитела (scFv).

Используемый здесь термин «антитело» используется в широком смысле и включает молекулы иммуноглобулина или антитела, включая человеческие, гуманизированные, композитные и химерные антитела и фрагменты антител, которые являются моноклональными или поликлональными. Как правило, антитела представляют собой белки или пептидные цепи, которые проявляют специфичность связывания с конкретным антигеном. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины можно отнести к пяти основным классам (т.е. IgA, IgD, IgE, IgG и IgM) в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG далее подразделяются на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела по изобретению могут относиться к любому из пяти основных классов или соответствующих подклассов. Предпочтительно, антитела по изобретению представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител позвоночных можно отнести к одному из двух четко различающихся типов, а именно к каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. Соответственно, антитела по изобретению могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитела по изобретению включают константные области тяжелой и/или легкой цепи из антител крысы или человека. В дополнение к константным доменам тяжелой и легкой цепи, антитела содержат антигенсвязывающую область, которая состоит из вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи, каждая из которых содержит три домена (т.е. определяющие комплементарность области 1-3; CDR1, CDR2 и CDR3). Домены вариабельной области легкой цепи альтернативно называют LCDR1, LCDR2, и LCDR3, и домены вариабельной области тяжелой цепи альтернативно называют HCDR1,

HCDR2, и HCDR3.

Используемый здесь термин «одноцепочечное антитело» относится к обычному одноцепочечному антителу в данной области, которое содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, соединенные коротким пептидом от примерно 5 до примерно 20 аминокислот. Используемый здесь термин «однодоменное антитело» относится к обычному однодоменному антителу в данной области, которое содержит переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи или которое содержит только переменную область тяжелой цепи.

Используемый здесь термин «антитело человека» относится к антителу, продуцируемому человеком, или антителу, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую антителу, продуцируемому человеком, полученному с использованием любого способа, известного в данной области. Это определение антитела человека содержит интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие, по меньшей мере один полипептид тяжелой и/или легкой цепи человека.

Используемый здесь термин «гуманизированный антигенсвязывающий домен» относится к не человеческому антигенсвязывающему домену, который модифицирован для увеличения гомологии последовательности последовательностью антитела человека, так что антигенсвязывающие свойства антигенсвязывающего домена сохраняются, но его антигенность в организме человека снижается.

В настоящем описании, термин «химерный антигенсвязывающий домен» относится к антигенсвязывающему домену, где последовательность аминокислот молекулы иммуноглобулина получают из двух или несколько видов. Переменная область как легкой, так и тяжелой цепей часто соответствует переменной области антигенсвязывающего домена, происходящего от одного вида млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и т. д.), имеющего желаемую специфичность, сродство, и способность, в то время как константные области соответствуют последовательностям антигенсвязывающего домена, происходящего от другого вида млекопитающего (например, человека), чтобы избежать возникновения иммунного ответа у этого вида.

Используемый здесь термин «CLDN18.2» относится к клаудину 18, варианту 2, клаудину-18.2 или клаудину-18a2.1, которые принадлежат к семейству трансмембранных белков клаудинов. CLDN18.2 специфично экспрессируется на поверхности клеток эпителия в желудке (Niimi et al., Mol Cell Biol. 2001; 21:7380-7390) и становится одним из основных структурных компонентов тесной связи между эпителиальными клетками (Sahin et al., Physiol Rev. 2013; 93:525-569). Термин «CLDN18.2 человека» относится к CLDN18.2, происходящему от человека. Типовая аминокислотная последовательность CLDN18.2 человека представлена в GenBank с № доступа AAL15637.1 (SEQ ID NO:141).

В настоящем описании антигенсвязывающий домен, который «специфически связывается с CLDN 18.2», относится к антигенсвязывающему домену, который связывается с CLDN 18.2, предпочтительно с CLDN 18.2 человека, с $KD 1 \times 10^{-7}$ М или

менее, предпочтительно, 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно, 5×10^{-9} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 5×10^{-10} М или менее, или 1×10^{-10} М или менее. Термин «KD» относится к константе диссоциации, которая получается из отношения Kd к Ka (т.е. Kd/Ka) и выражается в виде молярной концентрации (М). Значения KD для антигенсвязывающего домена можно определить с использованием способов, известных в данной области техники, с учетом настоящего описания. Например, KD антитела и/или антигенсвязывающего домена можно определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением биосенсорной системы, например, системы Biacore®, или с применением технологии биослойной интерферометрии, такой как система Octet RED96.

Чем меньше значение KD антигенсвязывающего домена, тем выше аффинность, с которой антигенсвязывающий домен связывается с антигеном-мишенью.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 21, 22, 23, 51, 52 и 53, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 24, 25, 26, 54, 55 и 56, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 27, 28, 29, 57, 58 и 59, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 30, 31, 32, 60, 61 и 62, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 33, 34, 35, 63, 64 и 65, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 36, 37, 38, 66, 67 и 68, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 39, 40, 41, 69, 70 и 71, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 42, 43, 44, 72, 73 и 74, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 45, 46, 47, 75, 76 и 77, соответственно; и
- (10) SEQ ID NO: 48, 49, 50, 78, 79 и 80, соответственно;

где их антигенсвязывающий домен, специфически связывается с CLDN 18.2, предпочтительно CLDN 18.2 человека.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 81, 82, 83, 111, 112 и 113, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 84, 85, 86, 114, 115 и 116, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 87, 88, 89, 117, 118 и 119, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 90, 91, 92, 120, 121 и 122, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 93, 94, 95, 123, 124 и 125, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 96, 97, 98, 126, 127 и 128, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 99, 100, 101, 129, 130 и 131, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 102, 103, 104, 132, 133 и 134, соответственно;

(9) SEQ ID NO: 105, 106, 107, 135, 136 и 137, соответственно; и

(10) SEQ ID NO: 108, 109, 110, 138, 139 и 140, соответственно;

где их антигенсвязывающий домен специфически связывает CLDN 18.2, предпочтительно CLDN 18.2 человека.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или, по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 или 19, или переменную область легкой цепи, имеющей полипептидную последовательность на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере на 98%, или, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен содержит:

(1) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2;

(2) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 4;

(3) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6;

(4) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8;

(5) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10;

(6) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12;

(7) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;

(8) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16;

(9) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18; или

(10) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен является гуманизированным и содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере на 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или, по меньшей мере на 99% идентичную любой из SEQ ID NOs: 142, 143, 146, 147, 151, 152, 154, 155, 156, 159, 160, 161, 162, 166, 167, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 186, 187, 191, 192 или 193, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или, по меньшей мере на 99% идентичную любой из SEQ ID NOs: 144, 145, 148, 149, 150, 153, 157, 158, 163, 164, 165, 168, 169, 173, 174, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 189, 190, 194, 195, 196 или 197.

В некоторых вариантах осуществления, антигенсвязывающий домен является гуманизированным и содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 142, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 144;

(2) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 142, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 145;

(3) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 143, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 144;

(4) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 143, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 245;

(5) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 146, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 148;

(6) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 146, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 149;

(7) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 146, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 150;

(8) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 147, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 148;

одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфически связывает CLDN 18.2, предпочтительно CLDN 18.2 человека.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающим доменом является гуманизированный одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфически связывает CLDN 18.2, предпочтительно CLDN 18.2 человека. В некоторых вариантах осуществления, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) содержит полипептидную последовательность на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или, по меньшей мере 99%, идентичную любой из SEQ ID NOs: 198-215. В некоторых вариантах осуществления, гуманизированный одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) содержит полипептидную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 198-215.

В соответствии с другим конкретным аспектом, химерный антигенный рецептор содержит один или более антигенсвязывающих доменов.

Согласно другому конкретному аспекту, внутриклеточный сигнальный домен содержит один или более костимулирующих доменов и один или более активирующих доменов.

В другом общем аспекте, изобретение относится к изолированному полинуклеотиду, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит его антигенсвязывающий домен по изобретению. Специалистам в данной области техники будет понятно, что кодирующая последовательность белка может быть изменена (например, заменена, удалена, вставлена и т.д.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалистам в данной области будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие их антигенсвязывающие домены по изобретению, могут быть изменены без изменения аминокислотных последовательностей белков.

В другом общем аспекте, изобретение относится к вектору, содержащему выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, где CAR содержит его антигенсвязывающий домен, по изобретению. Может быть использован любой вектор, известный специалистам в данной области техники, с учетом настоящего раскрытия, такой как плазмида, космида, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный вектор экспрессии, такой как плазмида. Вектор может включать в себя любой элемент для установления обычной функции вектора экспрессии, например промотор, элемент связывания рибосомы, терминатор, энхансер, маркер селектирования и точку начала репликации. Промотор может быть конститутивным, индуцируемым или репрессируемым промотором. Множество векторов экспрессии, способных доставлять нуклеиновые кислоты в клетку, известно в данной области техники и может быть использовано здесь для продуцирования их антигенсвязывающего домена в клетке. Обычные методы клонирования или синтез искусственного гена могут быть использованы

для создания рекомбинантного вектора экспрессии согласно вариантам осуществления изобретения.

В другом общем аспекте, изобретение относится к клетке, трансдуцированной вектором, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по изобретению. Термин «трансдуцированный» или «трансдукция» относится к процессу, в котором экзогенная нуклеиновая кислота переносится или вводится в клетку-хозяин. «Трансдуцированной» клеткой является такая, которая была трансдуцирована экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка содержит первичную клетку субъекта и ее потомство. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой CAR-T-клетку человека, где Т-клетка сконструирована, чтобы экспрессировать CAR по изобретению для лечения заболеваний, таких как рак. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой CAR-NK-клетку человека, где NK-клетка, сконструированная для экспрессии CAR по изобретению, используется для лечения таких заболеваний, как рак.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу создания CAR-T-клетки через трансдукцию Т-клетки вектором, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по изобретению.

В другом общем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения CAR-T-клетки по изобретению, включающему культивирование Т-клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению в условиях получения CAR-T-клетки и восстановления CAR-T-клетки.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу получения CAR-NK-клетки трансдукцией NK-клетки вектором, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по изобретению.

В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения CAR-NK-клетки по изобретению, включающему культивирование NK-клеток, содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие химерный антигенный рецептор (CAR), в условиях получения CAR-NK-клетки и восстановления CAR-NK-клетки.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу создания популяции РНК-сконструированных клеток, содержащих химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению. Способы включают контакт популяции клеток с выделенными полинуклеотидами, содержащими нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR по изобретению, где выделенные полинуклеотиды представляют собой *in vitro* транскрибированную РНК или синтетическую РНК.

Фармацевтические композиции

В другом общем аспекте, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенный полинуклеотид по изобретению, выделенный полипептид по изобретению, клетку-хозяин по изобретению и/или сконструированную иммунную клетку по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Термин «фармацевтическая композиция», используемый здесь, означает продукт, содержащий выделенный полинуклеотид по изобретению, выделенный полипептид по

изобретению, клетку-хозяин по изобретению и/или сконструированную иммунную клетку по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Полинуклеотиды, полипептиды, клетки-хозяева и/или сконструированные иммунные клетки по изобретению и композиции, содержащие их, также могут быть использованы в производстве лекарственного средства для терапевтического применения, упомянутого в настоящем документе.

Используемый здесь термин «носитель» относится к любому эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферу, стабилизатору, солубилизатору, маслу, жиру, жиросодержащей везикуле, микросфере, липосомной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники, для использования в фармацевтических составах. Следует понимать, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от пути введения для конкретного применения. Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному материалу, который не влияет на эффективность композиции по изобретению или биологическую активность композиции по изобретению. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, с учетом настоящего описания, в изобретении можно использовать любой фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для использования в фармацевтической композиции полинуклеотида, полипептида, клетки-хозяина и/или сконструированной иммунной клетки.

Составы фармацевтически активных ингредиентов с фармацевтически приемлемыми носителями известны в данной области техники, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, 21-е издание (2005) и любые более поздние издания). Неограничивающие примеры дополнительных ингредиентов включают: буферы, разбавители, растворители, регуляторы тоничности, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие агенты. Один или более фармацевтически приемлемых носителей могут применяться при составлении фармацевтических композиций по изобретению.

Способы применения

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту CAR-T-клеток и/или CAR-NK-клеток по изобретению. Рак может быть например, выбран из, но не ограничиваться ими, рака легких, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

В другом общем аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение

субъекту CAR-T-клеток и/или CAR-NK клеток по изобретению.

Согласно вариантам осуществления изобретения, CAR-T-клетка или CAR-NK-клетка содержит терапевтически эффективное количество экспрессированных CAR по изобретению. Используемый здесь термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает желаемый биологический или лекарственный ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным способом в соответствии с заявленной целью.

Как используется в настоящем документе со ссылкой на CAR, терапевтически эффективное количество означает количество молекулы CAR, экспрессируемой в трансдуцированной Т-клетке или NK-клетке, которое модулирует иммунный ответ у субъекта, нуждающегося в этом. Кроме того, как используется в настоящем описании со ссылкой на CAR, терапевтически эффективное количество означает количество CAR молекулы, экспрессированной в трансдуцированной Т-клетке или NK-клетке, которое приводит к лечению заболевания, нарушения или состояния; предотвращает или замедляет прогрессирование заболевания, нарушения или состояния; или уменьшает или полностью облегчает симптомы, связанные с заболеванием, нарушением или состоянием.

Как используется в настоящем описании со ссылкой на CAR-T-клетку или CAR-NK-клетку, терапевтически эффективное количество означает количество CAR-T-клеток или CAR-NK-клеток, которое модулирует иммунный ответ у субъекта, нуждающегося в этом. Кроме того, как используется в настоящем описании со ссылкой на CAR-T клетки или CAR-NK клетки, терапевтически эффективное количество означает количество CAR-T-клеток или CAR-NK клеток, которые вызывает лечение заболевания, нарушения или состояние; предотвращает или замедляет прогрессирование заболевания, расстройства или состояния; или уменьшает или полностью облегчает симптомы, связанные с заболеванием, нарушением или состоянием.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, заболеванием, нарушением или состоянием, подлежащем лечению, является рак, предпочтительно, рак, выбранный из группы, состоящей из рака легких, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CMML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов. Согласно другим конкретным вариантам осуществления, заболеванием, нарушением или состоянием, подлежащим лечению, является воспалительное заболевание.

Согласно конкретным вариантам осуществления, терапевтически эффективное

количество относится к количеству терапии, которое достаточно для достижения одного, двух, трех, четырех или несколько из следующих эффектов: (i) уменьшение или облегчение тяжести заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ii) сокращение продолжительности заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним; (iii) профилактика прогрессирования заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним; (iv) регресс заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним; (v) профилактика развития или начала заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним; (vi) профилактика рецидива заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним; (vii) сокращения госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (viii) сокращение продолжительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (ix) увеличение выживаемости субъекта с заболеванием, нарушением или состоянием, подлежащим лечению, или симптомом, связанным с ним; (xi) подавление или уменьшение заболевание, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним, у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического или терапевтического эффекта другой терапии.

Терапевтически эффективное количество или дозировка может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, способы введения, мишень, физиологическое состояние субъекта (включая, например, возраст, массу тела, состояние здоровья), является ли субъект человеком или животным, другие вводимые лекарства и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Лечебные дозировки оптимально подобраны для оптимизации безопасности и эффективности.

Согласно конкретным вариантам осуществления, описанные здесь композиции составлены таким образом, чтобы они подходили для предполагаемого пути введения субъекту. Например, описанные здесь композиции могут быть составлены таким образом, чтобы они подходили для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

Клетки по изобретению могут быть введены любым удобным способом, известным специалистам в данной области техники. Например, клетки по изобретению можно вводить субъекту путем аэрозольной ингаляции, инъекции, приема внутрь, переливания, имплантации и/или трансплантации. Композиции, содержащие клетки по изобретению, могут быть введены трансартериально, подкожно, внутрикожно, внутрь опухоли, внутрь узла, интрамедуллярно, внутримышечно, интраплеврально, внутривенной (ВВ) инъекцией или внутривентрикулярно. В некоторых вариантах осуществления клетки по изобретению могут быть введены субъекту вместе с противоопухолевой терапией или без нее.

Фармацевтические композиции, содержащие клетки по изобретению,

экспрессирующие CAR по изобретению, могут быть представлены в виде стерильных жидких препаратов, обычно изотонических водных растворов с суспензиями клеток или, необязательно, в виде эмульсий, дисперсий и т.п., которые обычно забуферены до выбранного pH. Композиции могут содержать носители, например воду, физиологический раствор, физиологический раствор с фосфатным буфером и подобные, подходящие для целостности и жизнеспособности клеток, а также для введения клеточной композиции.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем введения клеток по изобретению в подходящем количестве подходящего растворителя с различными другими ингредиентами по желанию. Такие композиции могут включать фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент, такой как стерильная вода, физиологический раствор, глюкоза, декстроза и подобные, которые подходят для использования с клеточной композицией и для введения субъекту, такому как человек. Подходящие буферы для получения клеточной композиции хорошо известны в данной области техники. Любой используемый носитель, разбавитель или добавка совместим с сохранением целостности и жизнеспособности клеток по изобретению.

Клетки по изобретению можно вводить в любом физиологически приемлемом носителе. Популяция клеток, содержащая клетки по изобретению, может включать очищенную популяцию клеток. Специалисты в данной области техники могут легко определить клетки в популяции клеток, используя различные хорошо известные способы. Диапазон чистоты клеточных популяций, содержащих генетически модифицированные клетки по изобретению, может составлять от примерно 50% до примерно 55%, от примерно 55% до примерно 60%, от примерно 60% до примерно 65%, от примерно 65% до примерно 70%, от примерно 70% до примерно 75%, от примерно 75% до примерно 80%, от примерно 80% до примерно 85%, от примерно 85% до примерно 90%, от примерно 90% до примерно 95% или от примерно 95% до примерно 100%. Дозировки могут быть легко скорректированы специалистами в данной области техники, например, снижение чистоты может потребовать увеличения дозировки.

Клетки по изобретению обычно вводят в дозе на основе количества клеток на килограмм (клеток/кг) массы тела субъекта, которому вводят клетки. Обычно дозы клеток находятся в диапазоне от примерно 10^4 до примерно 10^{10} клеток/кг массы тела, например, от примерно 10^5 до примерно 10^9 , от примерно 10^5 до примерно 10^8 , от примерно 10^5 до примерно 10^7 или от примерно 10^5 до примерно 10^6 , в зависимости от способа и места введения. Обычно в случае системного введения используют более высокую дозу, чем при местном введении, когда иммунные клетки по изобретению вводят в область опухоли и/или рака. Типовые диапазоны доз включают, но не ограничиваются ими, от 1×10^4 до 1×10^8 , от 2×10^4 до 1×10^8 , от 3×10^4 до 1×10^8 , от 4×10^4 до 1×10^8 , от 5×10^4 до 6×10^8 , от 7×10^4 до 1×10^8 , от 8×10^4 до 1×10^8 , от 9×10^4 до 1×10^8 , от 1×10^5 до 1×10^8 , от 1×10^5 до 9×10^7 , от 1×10^5 до 8×10^7 , от 1×10^5 до 7×10^7 , от 1×10^5 до 6×10^7 , от 1×10^5 до 5×10^7 , от 1×10^5 до 4×10^7 , от 1×10^5 до 4×10^7 , от 1×10^5 до 3×10^7 , от 1×10^5 до 2×10^7 , от 1×10^5 до 1×10^7 , от 1×10^5 до 9×10^6 , от 1×10^5 до 8×10^6 , от 1×10^5 до 7×10^6 , от 1×10^5 до 6×10^6 , от

1×10⁵ до 5×10⁶, от 1×10⁵ до 4×10⁶, от 1×10⁵ до 4×10⁶, от 1×10⁵ до 3×10⁶, от 1×10⁵ до 2×10⁶, от 1×10⁵ до 1×10⁶, от 2×10⁵ до 9×10⁷, от 2×10⁵ до 8×10⁷, от 2×10⁵ до 7×10⁷, от 2×10⁵ до 6×10⁷, от 2×10⁵ до 5×10⁷, от 2×10⁵ до 4×10⁷, от 2×10⁵ до 4×10⁷, от 2×10⁵ до 3×10⁷, от 2×10⁵ до 2×10⁷, от 2×10⁵ до 1×10⁷, от 2×10⁵ до 9×10⁶, от 2×10⁵ до 8×10⁶, от 2×10⁵ до 7×10⁶, от 2×10⁵ до 6×10⁶, от 2×10⁵ до 5×10⁶, от 2×10⁵ до 4×10⁶, от 2×10⁵ до 4×10⁶, от 2×10⁵ до 3×10⁶, от 2×10⁵ до 2×10⁶, от 2×10⁵ до 1×10⁶, от 3×10⁵ до 3×10⁶ клеток/кг и подобные. Кроме того, доза может быть скорректирована с учетом того, вводят ли однократную дозу или вводят несколько доз. Точное определение того, какая доза будет считаться эффективной, может быть основано на факторах, индивидуальных для каждого субъекта.

Используемые здесь термины «лечить», «лечение» и «лечение» предназначены для обозначения облегчения или отмены, по меньшей мере одного измеримого физического параметра, связанного с раком и/или воспалительным заболеванием, нарушением или состоянием, которое не обязательно проявляется у субъекта, но может проявляться у субъекта. Термины «лечить», «лечение» и «лечение» также могут относиться к регрессу, профилактике прогрессирования или, по меньшей мере замедлению прогрессирования заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, «лечить», «лечить» и «лечение» относятся к облегчению, профилактике развития или начала или сокращению продолжительности одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием, нарушением или состоянием, например в виде опухоли или, более предпочтительно, рака. В конкретном варианте осуществления, «лечить», «лечить» и «лечение» относятся к профилактике рецидива заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, «лечить», «лечить» и «лечение» относятся к увеличению выживаемости субъекта, страдающего заболеванием, нарушением или состоянием. В конкретном варианте осуществления, «лечить», «лечить» и «лечение» относятся к устранению заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

Согласно конкретным вариантам осуществления представлены композиции, используемые для лечения рака и/или воспалительного заболевания, нарушения или состояния. Для лечения рака предлагаемые композиции можно использовать в сочетании с другим лечением, включая, но не ограничиваясь ими, химиотерапию, анти-CD20 mAb, анти-TIM-3 mAb, анти-LAG-3 mAb, анти-EGFR mAb, анти-HER-2 mAb, анти-CD19 mAb, анти-CD33 mAb, анти-CD47 mAb, анти-CD73 mAb, анти-DLL-3 mAb, анти-апелиновое mAb, анти-TIP-1 mAb, анти-FOLR1 mAb, анти-CTLA-4 mAb, анти-PD-L1 mAb, анти-PD-1 mAb, другие иммуноонкологические препараты, антиангиогенный агент, радиационную терапию, конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), таргетную терапию или другие противоопухолевые препараты.

Согласно конкретным вариантам осуществления, способы лечения рака и/или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включают введение субъекту CAR-T-клеток и/или CAR-NK-клеток по изобретению в комбинации с агентом, который увеличивает эффективность клеток, экспрессирующих молекулу CAR. Такие

агенты включают, но не ограничиваются ими, фрагмент антитела, который связывается с CD73, CD39, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3 или LAG-3, или антагонист рецептора аденозина A2a.

Согласно конкретным вариантам осуществления, способы лечения рака и/или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включают введение субъекту CAR-T-клеток и/или CAR-NK-клеток по изобретению в комбинации с агентом, который улучшает одну или несколько побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей молекулу CAR. Такие агенты включают, но не ограничиваются ими, стероид, ингибитор TNF α или ингибитор IL-6.

Согласно конкретным вариантам осуществления, способы лечения рака и/или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включают введение субъекту CAR-T-клеток и/или CAR-NK-клеток по изобретению в комбинации с агентом, который лечит заболевание, связанное с клаудином 18.2. Такие агенты включают, но не ограничиваются ими, анти-клаудин 18.2 моноклональное антитело или биспецифическое антитело.

Используемый здесь термин «в комбинации» в контексте введения субъекту двух или нескольких терапий относится к применению более чем одной терапии. Использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок, в котором терапия вводится субъекту. Например, первая терапия (например, композиция, описанная здесь) может вводиться до (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов), часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделя, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), одновременно или после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделя, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения субъекту второй терапии.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Изобретение представляет также следующие неограничивающие варианты осуществления.

Вариантом осуществления 1 является выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит: (a) внеклеточный домен, содержащий, по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, который специфически связывает клаудин 18.2 (CLDN 18.2); (b) шарнирную область; (c) трансмембранную область; и (d) внутриклеточный сигнальный домен.

Вариантом осуществления 2 является выделенный полинуклеотид по варианту осуществления 1, в котором антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

(1) SEQ ID NO: 21, 22, 23, 51, 52 и 53, соответственно;

- (2) SEQ ID NO: 24, 25, 26, 54, 55 и 56, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 27, 28, 29, 57, 58 и 59, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 30, 31, 32, 60, 61 и 62, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 33, 34, 35, 63, 64 и 65, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 36, 37, 38, 66, 67 и 68, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 39, 40, 41, 69, 70 и 71, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 42, 43, 44, 72, 73 и 74, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 45, 46, 47, 75, 76 и 77, соответственно; и
- (10) SEQ ID NO: 48, 49, 50, 78, 79 и 80, соответственно;

где их антигенсвязывающий домен специфически связывает CLDN 18.2, предпочтительно CLDN 18.2 человека.

Вариантом осуществления 3 является выделенный полинуклеотид по варианту осуществления 1, в котором антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 81, 82, 83, 111, 112 и 113, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 84, 85, 86, 114, 115 и 116, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 87, 88, 89, 117, 118 и 119, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 90, 91, 92, 120, 121 и 122, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 93, 94, 95, 123, 124 и 125, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 96, 97, 98, 126, 127 и 128, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 99, 100, 101, 129, 130 и 131, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 102, 103, 104, 132, 133 и 134, соответственно;
- (9) SEQ ID NO: 105, 106, 107, 135, 136 и 137, соответственно; и
- (10) SEQ ID NO: 108, 109, 110, 138, 139 и 140, соответственно;

где их антигенсвязывающий домен специфически связывает CLDN 18.2, предпочтительно CLDN 18.2 человека.

Вариантом осуществления 4 является выделенный полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 1-3, в котором антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности SEQ ID. NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 или 19, или переменную область легкой цепи, имеющей полипептидную последовательность на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере на 98%, или, по меньшей мере на 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20.

Вариантом осуществления 5 является выделенный полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 1-4, где антигенсвязывающий домен содержит:

- (1) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную

последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2;

(2) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 4;

(3) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6;

(4) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8;

(5) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10;

(6) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12;

(7) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;

(8) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16;

(9) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18; или

(10) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20.

Вариантом осуществления 6 является выделенный полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 1-3, в котором антигенсвязывающий домен является гуманизированным и содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере на 98% или, по меньшей мере на 99% идентичную любой из SEQ ID NOs: 142, 143, 146, 147, 151, 152, 154, 155, 156, 159, 160, 161, 162, 166, 167, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 186, 187, 191, 192 или 193, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или, по меньшей мере на 99% идентичную любой из SEQ ID NOs: 144, 145, 148, 149, 150, 153, 157, 158, 163, 164, 165, 168, 169, 173, 174, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 189, 190, 194,

195, 196 или 197.

Вариантом осуществления 7 является выделенный полинуклеотид по варианту осуществления 6, в котором антигенсвязывающий домен является гуманизированным и содержит:

(1) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 142, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 144;

(2) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 142, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 145;

(3) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 143, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 144;

(4) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 143, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 245;

(5) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 146, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 148;

(6) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 146, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 149;

(7) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 146, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 150;

(8) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 147, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 148;

(9) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 147, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 149;

(10) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 147, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 150;

(11) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 151, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 153;

(12) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 152, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 153;

(13) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 154, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 157;

(14) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 155, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 157;

(15) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 156, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 158;

(16) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 159, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 163;

(17) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 159, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 164;

(18) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 160, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 163;

(19) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 160, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 164;

(20) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 161, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 165; или

(21) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 162, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 165.

Вариантом осуществления 8 является выделенный полинуклеотид по любому из вариантов 1-7, где антигенсвязывающим доменом является одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), который специфически связывает CLDN 18.2 человека, предпочтительно CLDN 18.2 человека.

Вариантом осуществления 9 является выделенный полинуклеотид по варианту осуществления 8, в котором одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv) является гуманизированным и содержит полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 198-215.

Вариантом осуществления 10 является выделенный полинуклеотид по любому одному из вариантов осуществления 1-9, где химерный антигенный рецептор (CAR) содержит один или более антигенсвязывающих доменов.

Вариантом осуществления 11 является выделенный полинуклеотид по любому одному из вариантов осуществления 1-10, в котором внутриклеточный сигнальный домен

CAR содержит один или более костимулирующих доменов и один или более активирующих доменов.

Вариантом осуществления 12 является химерный антигенный рецептор (CAR), кодируемый выделенным полинуклеотидом по любому из вариантов осуществления 1-11.

Вариантом осуществления 13 является вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по любому из вариантов осуществления 1-11.

Вариантом осуществления 14 является клетка-хозяин, содержащая вектор из варианта осуществления 13.

Вариантом осуществления 15 является клетка-хозяин по варианту осуществления 14, где клеткой является CAR-T-клетка, предпочтительно CAR-T-клетка человека.

Вариантом осуществления 16 является клетка-хозяин по варианту осуществления 14, где клеткой является клетка CAR-NK, предпочтительно клетка CAR-NK человека.

Вариантом осуществления 17 является способ получения клетки-хозяина, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), где способ включает трансдукцию Т-клетки с вектором по варианту осуществления 13.

Вариантом осуществления 18 является способ получения химерного антигенного рецептора (CAR)-Т клетки, где указанный способ содержит культивирование Т-клетки, содержащей выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по любому из вариантов осуществления 1-11 в условиях получения CAR-T-клетки и выделения CAR-T-клетки.

Вариантом осуществления 19 является способ изготовления клетки-хозяина, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), где способ включает стадии трансдукции клетки NK с вектором по варианту осуществления 13.

Вариантом осуществления 20 является способ получения химерного антигенного рецептора (CAR)-NK клеток, где указанный способ включает культивирование NK-клетки, содержащие выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по любому одному из вариантов осуществления 1-11 в условиях получения CAR-NK клетки и восстановления CAR-NK клетки.

Вариантом осуществления 21 является способ получения клетки, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), где способ включает контакт клетки с изолированным полинуклеотидом, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по любому из вариантов осуществления 1-11, где выделенным полинуклеотидом является *in vitro* транскрибированная РНК или синтетическая РНК.

Вариантом осуществления 22 является способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает введение субъекту клетки-хозяина по любому из вариантов осуществления 14-16.

Вариантом осуществления 23 является способ по варианту осуществления 22, в котором рак выбран из рака легких, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков,

холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

Вариантом осуществления 24 является способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает введение субъекта клетки-хозяина по любому из вариантов осуществления 14-16.

Вариантом осуществления 25 является способ по любому из вариантов осуществления 22-24, дополнительно включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, агента, который увеличивает эффективность клетки, экспрессирующей молекулу CAR.

Вариантом осуществления 26 является способ по любому из вариантов осуществления 22-24, дополнительно включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, агента, который ослабляет один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей молекулу CAR.

Вариантом осуществления 27 является способ по любому из вариантов осуществления 22-24, дополнительно включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, агента, который лечит заболевание, связанное с Клаудином 18.2.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Идентификация антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CLDN 18.2

Антигенсвязывающие домены, которые специфически связывают CLDN 18.2, являющиеся анти-CLDN 18.2 mAb, выделяют и секвенируют, как описано в PCT/US19/020872, поданной 6 марта, 2019, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки во всей своей полноте.

Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CLDN 18.2 представлены в таблицах 1 и 2, и CDR области для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CLDN 18.2 представлены в таблицах 3-6.

Таблица 1: Последовательности переменных областей тяжелой цепи для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CLDN 18.2

Наименование	VH	SEQ ID NO:
2-C3	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPD KRLEWVATISGGGSYTYLDSVKGRFTISRDIKNTLYLQMSS LKSEDTAMYFCARQSRGNAMDYWGQGTSVTVSS	1

2-P8	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYSTGYNMHWVKQS HGKSLEWIGYIDPYNGVTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYVQ LNSLTSEDSAVYYCARWGGNYVDYWGQGTTTLKVSS	3
3-E21	EVQLVESGGALVKPGGSLKLSCAASGFTFSKYAMSWVRQTPE KRLEWVAFISNGGSYTYCLDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMS SLRSEDALYYCARHDKGNALDYWGQGNSTVTVSS	5
3-P21	EIQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYSTGYNMKWVKQSHG KSLEWIGNINPYFGSTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLN SLTSEDSAVYYCARGAYYGNAMDYWGQGTSVTVSS	7
5-E22	KVQLQQSGPDLVEPGASVKISCKASGYTITDNYMHWVKQKP GQGLEWIGEIYPGSGNTYYNERFKGKATLTADKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYFCARGFPYYAMDYWGPGTSVTVSS	9
6-J11	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFIFSSFGMHWVRQAPE KGLEWVAYISSGRSTMYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMT SLRSEDAMYYCARGGFYGNSLDYWGQGTSVTVSS	11
8-G12	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSDYWMNWVKQRP GKGLEWIGQIYPGYGDTKYNENFKGTATLTADKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYFCARWGYYGNAMDYWGQGTSVTVSS	13
10-J10	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTRYRMNWVKQRP GQGLEWIGNIDPSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVFYCARLNYGNCFDYWGQGTTTLTVSS	15
10-K2	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYAFTSYVMHWVKQK PGQGLEWIGYINPYSDGTRYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYME LSSLTSEDSAVYYCTRIYYGNAMDYWGQGTSVTVSS	17
15-D6	QVQLQQPGADLVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRP GQGLEWIGNIYPGRSSTNYNEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLS SLASDDSAVYYCSRLSRGNAMDYWGQGTSVTVSS	19

VH: переменная область тяжелой цепи

Таблица 2: Последовательности переменных областей легкой цепи для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CLDN 18.2

Наименование	VL	SEQ ID NO:
2-C3	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVPRFTGSGSGTDFTLTISVQAE DLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLELK	2

2-P8	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINRYLSWFQQKPGKSP KTLLIYRANRLVDGVPSRFSGSFSGQDYSLTISSEYEDMGIYYCL QYDEFPLTFGAGTKLELK	4
3-E21	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAE DLSVYYCQNDYFYPLTFGAGTKLELK	6
3-P21	DIVMTQSPSSLTVTAGGKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWY QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQA EDLAVYYCQNDYFYPLTFGAGTKLELK	8
5-E22	DIQMNQSPSSLSASLGDITITCHARQNINWLSWYQQKSGNIP KLLIYKASNLTGVPSPRFSGSFSGTRFTLTISLQPEDMATYYC QQGQNYPLTFGGGKLEIK	10
6-J11	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSMQAE DLAVYSCQNAYSYPLTFGAGTKLELK	12
8-G12	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQTED LAIYYCQNAIYIPLTFGAGTKLELK	14
10-J10	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQTLLNSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAE DLAVFYCQNDYFYPPFTFGSGTKLEIK	16
10-K2	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAE DLAVYYCQNDYSYPFTFGSGTKLEIK	18
15-D6	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCRSSQSLLNSGNQKSYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAE DLAVYYCQNDYYYPFTFGSGTKLEIK	20

VL: переменная область легкой цепи

Таблица 3: CDR области 1-3 тяжелой цепи для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CLDN 18.2

Наименование	HC CDR1	NO	HC CDR2	NO	HC CDR3	NO
2-C3	GFTFSSYG	21	ISGGGSYT	22	ARQSRGNAMDY	23
2-P8	GYSFTGYN	24	IDPYNGVT	25	ARWGGNYVDY	26
3-E21	GFTFSKYA	27	ISNGGSYT	28	ARHDKGNALDY	29

3-P21	GYSFTGYN	30	INPYFGST	31	ARGAYYGNAMDY	32
5-E22	GYTITDNY	33	IYPGSGNT	34	ARGFPYYAMDY	35
6-J11	GFIFSSFG	36	ISSGRSTM	37	ARGGFYGNSLDY	38
8-G12	GYAFSDYW	39	IYPGYGDT	40	ARWGYYGAMDY	41
10-J10	GYTFTRYR	42	IDPSDSET	43	ARLNYGNCFDY	44
10-K2	GYAFTSYV	45	INPYSDGT	46	TRIYYGNAMDY	47
15-D6	GYTFTSYW	48	IYPGRSST	49	SRLSRGNAMDY	50

HC: тяжелая цепь; CDR: определяющая комплементарность область; NO: SEQ ID NO

CDR HC для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CLDN 18.2, определяют с использованием способа IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

Таблица 4: CDR-области 1-3 легкой цепи для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CLDN 18.2

Наименование	LC CDR1	NO	LC CDR2	NO	LC CDR3	NO
2-C3	QSLNLSGNQKNY	51	WAS	52	QNDYSYPLT	53
2-P8	QDINRY	54	RAN	55	LQYDEFPLT	56
3-E21	QSLNLSGNQKNY	57	WAS	58	QNDYFYPLT	59
3-P21	QSLNLSGNQKNY	60	WAS	61	QNDYFYPLT	62
5-E22	QNINWV	63	KAS	64	QQGQNYPLT	65
6-J11	LSLLNSGNQKNY	66	WAS	67	QNAYSYPPLT	68
8-G12	QSLNLSGNQKNY	69	WAS	70	QNAYIYPLT	71
10-J10	QTLNLSGNQKNY	72	WAS	73	QNDYFYPFT	74
10-K2	QSLNLSGNQKNY	75	WAS	76	QNDYSYPFT	77
15-D6	QSLNLSGNQKSY	78	WAS	79	QNDYYPFT	80

LC: легкая цепь; CDR: определяющая комплементарность область; NO: SEQ ID NO

LC CDR для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CLDN 18.2, определяют с использованием способа IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

Таблица 5: CDR-участки 1-3 тяжелой цепи для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CLDN 18.2

Наименование	HC CDR1	NO	HC CDR2	NO	HC CDR3	NO
2-C3	GFTFSSYGMS	81	TISGGGSYTYLDSV	82	ARQSRGNAMD	83

			KG		Y	
2-P8	GYSFTGYNMH	84	YIDPYNGVTNYNQKF KG	85	ARWGGNYVDY	86
3-E21	GFTFSKYAMS	87	FISNGGSYTYCLDSV KG	88	ARHDKGNALD Y	89
3-P21	GYSFTGYNMK	90	NINPYFGSTNYNQKF KG	91	ARGAYYGNAM DY	92
5-E22	GYTITDNYMH	93	EIYPGSGNTYYNERF KG	94	ARGFPYYAMD Y	95
6-J11	GFIFSSFGMH	96	YISSGRSTMYADTV KG	97	ARGGFYGNSLD Y	98
8-G12	GYAFSDYWMN	99	QIYPGYGDTKYNEF KG	100	ARWGYYGNA MDY	101
10-J10	GYTFTRYRMN	102	NIDPSDSETHYNQKF KD	103	ARLNYGNCFD Y	104
10-K2	GYAFTSYVMH	105	YINPYSDGTRYNEKF KG	106	TRIYYGNAMD Y	107
15-D6	GYTFTSYWIN	108	NIYPGRSSTNYNEKF KS	109	SRLSRGNAMD Y	110

HC: тяжелая цепь; CDR: определяющая комплементарность область; NO: SEQ ID NO

HC CDR для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CLDN 18.2 определяют с использованием комбинации способов IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212) и Kabat (Elvin A. Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. (1991)).

Таблица 6: CDR-участки 1-3 легкой цепи для антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CLDN 18.2

Наименование	LC CDR1	NO	LC CDR2	NO	LC CDR3	NO
2-C3	KSSQSLLNSGNQKNYL T	111	WASTRES	112	QNDYSYPLT	113
2-P8	KASQDINRYLS	114	RANRLVD	115	LQYDEFPLT	116
3-E21	KSSQSLLNSGNQKNYL T	117	WASTRES	118	QNDYFYPLT	119
3-P21	KSSQSLLNSGNQKNYL	120	WASTRES	121	QNDYFYPLT	122

	T					
5-E22	HARQNINWLS	123	KASNLHT	124	QQGQNYPLT	125
6-J11	KSSLNLSNGNQKNYL T	126	WASTRES	127	QNAYSYPPLT	128
8-G12	KSSQSLLNSGNQKNYL T	129	WASTRES	130	QNAIYIPLT	131
10-J10	KSSQTLLNSGNQKNYL T	132	WASTRES	133	QNDYFYPFT	134
10-K2	KSSQSLLNSGNQKNYL T	135	WASTRES	136	QNDYSYPFT	137
15-D6	RSSQSLLNSGNQKSYLT	138	WASTRES	139	QNDYYYPFT	140

LC: легкая цепь; CDR: определяющая комплементарность область; NO: SEQ ID NO

LC CDR, для антигенсвязывающие домены, которые специфически связывают CLDN 18.2 определяют с использованием комбинации способов IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212) и Kabat (Elvin A. Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. (1991)).

Пример 2: Гуманизация анти-CLDN 18.2 mAb мыши

Анти-CLDN 18.2 mAb мыши гуманизируют для снижения потенциала иммуногенности при использовании у людей, как описано в PCT/US19/020872, поданной 6 марта 2019 г., которая включена в настоящее описание в качестве ссылки полностью. Последовательности гуманизированных VH и VL областей приведены в таблице 7.

Таблица 7: Последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи гуманизированных антигенсвязывающих доменов, которые специфично связывают CLDN 18.2

VH/VL	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:
2-C3-H1	QVTLRSGPALVKPTQTLTLCTASGFTFSSYGMSWVRQPPGKA LEWVATISGGGSYTYYNPSLKDRFTISRDISANQLVLKVTNMDP ADTATYFCARQSRGNAMDYWGQGT TVTVSS	142
2-C3-H2	QVTLRSGPALVKPTQTLTLCTFSGFTFSSYGMSWIRQPPGKAL EWLATISGGGSYTYLDLSLKDRFTISRDISKQVVLTVTNMDPA DTATYFCARQSRGNAMDYWGQGT TVTVSS	143
2-C3-L1	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQ KPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPDFA TYYCQNDYSYPLTFGGG TKVEIK	144
2-C3-L2	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQ	145

	KPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFA TYYCQNDYSYPLTFGGGTKVEIK	
5-E22- H1	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTITDNYMHWVRQAPG QGLEWIGEIYPGSGNTYFNEKFKNRATLTADKSTTTAYMELKSL QFDDTAVYFCARGFPYYAMDYWGQGTTVTVSS	146
5-E22- H3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTITDNYMHWVRQAPG QGLEWIGEIYPGSGNTYYAEKFKNRATLTADKSISTAYMELSRL RSDDTAVYFCARGFPYYAMDYWGQGTLLVTVSS	147
5-E22- L1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCHARQNINWLSWYQQKPGQAP RLLIYKASNLHTGVPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQ QGQNYPLTFGGGTKVEIK	148
5-E22- L2	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHARQNINWLSWYQQKPGQAP RLLIYKASNLHTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQ GQNYPLTFGGGTKVEIK	149
5-E22- L3	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCHARQNINWLSWYLQKPGQSPQ LLIYKASNLHTGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQ QGQNYPLTFGQGTKVEIK	150
6-J11-H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSFGMHWVRQAPGKG LEWVAYISSGRSTMYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLTA EDTAVYYCARGGFYGNSLDYWGQGTLVTVSS	151
6-J11-H2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSFGMHWVRQAPGKG LEWVAYISSGRSTMYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRS EDTAVYYCARGGFYGNSLDYWGQGTLVTVSS	152
6-J11-L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSLSLLNSGNQKNYLTWYQQ KPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYSCQNAYSYPLTFGQGTKVEIK	153
3-E21- H1	QVQLQESGPGLV RPSQTLSTCTASGFTFSKYAMNWVRQPPGRG LEWVAFISNGGSYTEYNPSVKGRFTILRDNSKNQLSLRLSSVTAA DTAVYYCARHDKGNALDYWGQGSLLVTVSS	154
3-E21- H2	QVQLQESGPGLV RPSQTLSTCTASGFTFSKYAMSWVRQPPGRG LEWVAFISNGGSYTEYNPSVKGRFTILRDNSKNQLSLKLSSVTAA DTAVYYCARHDKGNALDYWGQGSLLVTVSS	155
3-E21- H3	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMSWVRQAPGK GLEWVA AISNGGSYTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR	156

	AEDTAVYYCARHDKGNALDYWGQGLTVTVSS	
3-E21-L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQ KPGKAPKLLIYWASNLQTVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIA TYYCQNDYFYPLTFGQGTKVEIK	157
3-E21-L2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQNDYFYPLTFGQGTRLEIK	158
3-P21-H1	EIQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYNHWRQAPGKG LEWIGYINPYFGSTDYADSVKGRATLSVDKSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARGAYYGNAMDYWGQGLTVTVSS	159
3-P21-H2	EIQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYNMKWVRQAPGK GLEWIGNINPYFGSTNYADSVKGRATLSVDKSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCARGAYYGNAMDYWGQGLTVTVSS	160
3-P21-H3	EIQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFTGYNIGWVRQMPGKG LEWIGIINPYFGSTRYSPSFQGGATLSVDKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARGAYYGNAMDYWGQGLTVTVSS	161
3-P21-H4	EIQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFTGYNMKWVRQMPGK GLEWIGIINPYFGSTNYSPSFQGGATLSVDKSISTAYLQWSSLKAS DTAMYYCARGAYYGNAMDYWGQGLTVTVSS	162
3-P21-L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSQSLNSGNQKNYVTWYQQ KPGKAPKLLIYWASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQNDYFYPLTFGQGTKVEIK	163
3-P21-L2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSQSLNSGNQKNYVTWYQQ KPGKAPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQNDYFYPLTFGQGTKVEIK	164
3-P21-L3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQNDYFYPLTFGQGTKVEIK	165
8-G12-H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYAFSDYWMNWVRQAPG KGLEWIGQIYPGYGDTKHNQRFMDRATLSADKSTSTAYMQMNS LRAEDTAVYFCARWGYGYNAMDYWGQGLTVTVSS	166
8-G12-H2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYAFSDYWMNWVRQAP GQGLEWIGQIYPGYGDTKYAQKFQGRATLTADKSISTAYMELSR LRSDDTAVYFCARWGYGYNAMDYWGQGLTVTVSS	167

8-G12-L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQ KPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQNAYIYPLTFGQGGTKVEIK	168
8-G12-L2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYCQNAYIYPLTFGGGGTKVEIK	169
10-K2-H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYAFTSYVMHWVRQAPGK GLEWIGYINPYSDGTRHNQRFMDRATLSSDKSTSTAYMQMNSL RAEDTAVYYCTRIYYGNAMDYWGQGTLLTVSS	170
10-K2-H2	QVQLVQSGAEVRKPGASVTVSCKASGYAFTSYVMHWVRQAPG QGLEWIGYINPYSDGTRFAQKFKGRATLTSDKSTSTAFMELSSLR SDDTAIYYCTRIYYGNAMDYWGQGTLLTVSS	171
10-K2-H3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYAFTSYVMHWVRQAPG QGLEWIGYINPYSDGTRFAQKFKGRVTLTSDKSTSTAYMELSSL RSDDTAVYYCTRIYYGNAMDYWGQGTLLTVSS	172
10-K2-L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQ KPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQNDYSYPFTFGQGGTKVEIK	173
10-K2-L2	DIVMTQSPLSLPVTTPGEAASISCKSSQSLNSGNQKNYLTWYLQK PGQSPQLLIYWASTRESGVPHRFSGSGSGTEFTLKISRVEAEDVG VYYCQNDYSYPFTFGQGGTKVEIK	174
15-D6-H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWINWVRQAPGK GLEWIGDIYPGRSSTNYNQNFKDRATLSVDTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRLSRGNAMDYWGQGTLLTVSS	175
15-D6-H2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWINWVRQAPGK GLEWIGDIYPGRSSTNYNQNFKGRATLSVDTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRLSRGNAMDYWGQGTLLTVSS	176
15-D6-H3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWINWVRQAPGK GLEWIGNIYPGRSSTNYNQNFKGRATLSVDTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRLSRGNAMDYWGQGTLLTVSS	177
15-D6-H4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWIHWVRQAPGK GLEWIGYIYPGRSSTNYNEKFKGRATLSVDTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRLSRGNAMDYWGQGTLLTVSS	178
15-D6-	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWINWVRQAPGK	179

H5	GLEWIGYIYPGRSSTNYNEKFKGRATLSVDTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRLSRGNAMDYWGQGTLVTVSS	
15-D6- H6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWINWVRQAPGK GLEWIGNIYPGRSSTNYNEKFKGRATLSVDTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRLSRGNAMDYWGQGTLVTVSS	180
15-D6- L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSQSLNSGNQKSYMTWYQQ KPGKAPKLLIYWASNHASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQNDYYYPFTFGQGTKVEIK	181
15-D6- L2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSQSLNSGNQKSYMTWYQQ KPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQNDYYYPFTFGQGTKVEIK	182
15-D6- L3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSQSLNSGNQKSYLTWYQQ KPGKAPKLLIYWASNHASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQNDYYYPFTFGQGTKVEIK	183
15-D6- L4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSQSLNSGNQKSYVTWYQQ KPGKAPKLLIYWASHRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQNDYYYPFTFGQGTKVEIK	184
15-D6- L5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSQSLNSGNQKSYVTWYQQ KPGKAPKLLIYWASHRYTGVPSPRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFA TYYCQNDYYYPFTFGQGTKVEIK	185
10-J10- H1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGYTFTRYRISWVRQAPGQ GLEWIGGIDPSDSETNYAQKFQGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARLNYGNCFDYWGQGTLVTVSS	186
10-J10- H2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGYTFTRYRISWVRQAPGQ GLEWIGGIDPSDSETNYAQKFQGRATLTADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARLNYGNCFDYWGQGTLVTVSS	187
10-J10- L1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTLLNSGNQKNYLTWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDV AVYYCQNDYFYPFTFGQGTRLEIK	188
10-J10- L2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTLLNSGNQKNYLAWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDV AVYYCQNDYFYPFTFGQGTKVEIK	189
10-J10- L3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTLLNSGNQKNYLTWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDV	190

	AVYYCQNDYFYPFTFGQGTKVEIK	
2-P8-H1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYSFTGYNLHWVRQAPG QGLEWIGWIDPYNGVTQYNEKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARWGGNYVDYWGQGTTVTVSS	191
2-P8-H2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTGYNLHWVRQAPG QGLEWIGWIDPYNGVTQYNEKFKGRVTITVDKSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARWGGNYVDYWGQGTTVTVSS	192
2-P8-H3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYSFTGYNINWVRQAPGQ GLEWIGWIDPYNGVTQYNEKFKGRATLTVDKSTNTAYMELSSL RSEDTAFYYCARWGGNYVDYWGQGTTLTVTVSS	193
2-P8-L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINRYVSWFQQKPGKAP KTLIYRANYRYSQVPSRFSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCL QYDEFPLTFGQGTKVEIK	194
2-P8-L2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYVSWFQQKPGKAP KTLIYRANYRYSQVPSRFSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCL QYDEFPLTFGQGTKVEIK	195
2-P8-L3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINRYVSWFQQKPGKAP KSIIYRANYRYSQVPSRFSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCL QYDEFPLTFGQGTKVEIK	196
2-P8-L4	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQDINRYLSWFQQKPGKAPK TLIYRANNLASGVPSRFSGSGQEYTLTISSLQPDDEFATYYCLQY DEFPLTFGQGTKVEIK	197

Гуманизированные VH и VL области сливают с константными областями тяжелой цепи и легкой цепи каппа IgG1 человека, соответственно. Гуманизированные mAb называют следующим образом: 2-C3-H1L1 относится к mAb с 2-C3-H1 вариабельной областью тяжелой цепи и 2-C3-L1 вариабельной областью легкой цепи; все другие гуманизированные mAb принимают то же правило наименования.

Несколько гуманизированных mAb тестируют на их способность связывать CLDN18.2 и CLDN18.1. Химерные mAb 15-D6 также применяют в анализе. Стабильные клеточные линии (HEK293-CLDN18.2 и HEK293-CLDN18.1), экспрессирующие CLDN18.2 и CLDN18.1 человека, соответственно, применяют в экспериментах FACS с определением на основе Alexa Fluor® 488, как описано в PCT/US19/020872. mAbs тестируют при 10 мкг/мл. Результат показаны на фиг. 1А-1В. «СИФ» означает «среднюю интенсивность флуоресценции».

Дополнительные гуманизированные mAb тестируют на их способность связывать CLDN18.2 с применением HEK293-CLDN18.2 стабильной клеточной линии и того же

протокола FACS, с модификацией, заключающейся в том, что йодид пропидия (PI) инкубируют вместе с вторичным антителом для мечения мертвых клеток. Результаты показаны на фиг. 2A-2D.

Пример 3: Превращение гуманизированных mAb в scFv

Гуманизированные mAb превращают в scFv, каждый из которых состоит из одной VH и одной VL с $(G_4S)_n$ линкером между ними (где «n» равно числу G_4S повторов). Либо VH, либо VL область помещают на N-конце слитого белка, чтобы определить наиболее эффективные дизайны scFv. Последовательности сконструированных scFv показаны в таблице 8. scFv были названы следующим образом: 2-C3-H2(G_4S)₃L2 относится к scFv с 2-C3-H1 вариабельной областью тяжелой цепи, $(G_4S)_3$ линкером и 2-C3-L2 вариабельную областью легкой цепи; все остальные scFv используют то же правило наименования.

Таблица 8: Последовательности гуманизированных scFv, которые специфически связывают CLDN 18.2

Наименование	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:
2-C3-H2(G_4S) ₃ L2	QVTLRSGPALVKPTQTLTLTCTFSGFTFSSYGMSWIRQPPGK ALEWLATISGGGSYTYYLDSLKDRFTISRDISKNQVVLTVTN MDPADTATYFCARQSRGNAMDYWGQGTTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKSSQSLLNSG NQKNYLTWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSG TEFTLTISLQPDDEFATYYCQNDYSYPLTFGGGKVEIK	198
2-C3-H2(G_4S) ₄ L2	QVTLRSGPALVKPTQTLTLTCTFSGFTFSSYGMSWIRQPPGK ALEWLATISGGGSYTYYLDSLKDRFTISRDISKNQVVLTVTN MDPADTATYFCARQSRGNAMDYWGQGTTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKSSQS LLNSGNQKNYLTWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFS GSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQNDYSYPLTFGGGKVEIK	199
2-C3-L2(G_4S) ₃ H2	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKSSQSLLNSGNQKNYLTWY QQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPD DEFATYYCQNDYSYPLTFGGGKVEIKGGGGSGGGGSGGGG SQVTLRSGPALVKPTQTLTLTCTFSGFTFSSYGMSWIRQPPG KALEWLATISGGGSYTYYLDSLKDRFTISRDISKNQVVLTVT NMDPADTATYFCARQSRGNAMDYWGQGTTVTVSS	200
6-J11-H1(G_4S) ₃ L1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSFGMHVVRQAPG KGLEWVAYISSGRSTMYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM	201

	NSLTAEDTAVYYCARGGFYGNSLDYWGQGTTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSLNLS GNQKNYLTWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYSCQNAYSYPPLTFGQGTKVEIK	
6-J11- H1(G4S)4L1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSFGMHWVRQAPG KGLEWVAYISSGRSTMYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLTAEDTAVYYCARGGFYGNSLDYWGQGTTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSS LSSLNSGNQKNYLTWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYSCQNAYSYPPLTFGQGTKV EIK	202
6-J11- L1(G4S)3H1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKSSLNLSGNQKNYLTWY QQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYSCQNAYSYPPLTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFISSFGMHWVRQA PGKLEWVAYISSGRSTMYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLTAEDTAVYYCARGGFYGNSLDYWGQGTTLVTVSS	203
5-E22- H3(G4S)3L3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTITDNYMHWVRQA PGQGLEWIGEIPGSGNTYYAEKFKNRATLTADKSISTAYME LSRLRSDDTAVYFCARGFPYYAMDYWGQGTTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSDIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCHARQNINV WLSWYLQKPGQSPQLLIYKASNLHTGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCQQGQNYPLTFGQGTKVEIK	204
5-E22- H3(G4S)4L3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTITDNYMHWVRQA PGQGLEWIGEIPGSGNTYYAEKFKNRATLTADKSISTAYME LSRLRSDDTAVYFCARGFPYYAMDYWGQGTTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCHAR QNINWLSWYLQKPGQSPQLLIYKASNLHTGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQGQNYPLTFGQGTKVEIK	205
5-E22- L3(G4S)3H3	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCHARQNINWLSWYLQKPGQ SPQLLIYKASNLHTGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCQQGQNYPLTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQ LVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTITDNYMHWVRQAPGQ GLEWIGEIPGSGNTYYAEKFKNRATLTADKSISTAYMELSR LRSDDTAVYFCARGFPYYAMDYWGQGTTLVTVSS	206

3-E21- H3(G4S)3L2	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMSWVRQAP GKGLEWVAAISNGGSYTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHDKGNALDYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLL NSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGS GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYFYPLTFGQGTRLEIK	207
3-E21- H3(G4S)4L2	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMSWVRQAP GKGLEWVAAISNGGSYTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARHDKGNALDYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKS SQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYFYPLTFGQGT RLEIK	208
3-E21- L2(G4S)3H3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLTWY QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYCQNDYFYPLTFGQGTRLEIKGGGGSGGGGSGGG GSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMSWVRQ APGKGLEWVAAISNGGSYTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARHDKGNALDYWGQGTLVTVSS	209
3-P21- H2(G4S)3L1	EIQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTGYNMKWVRQAP GKGLEWIGNINPYFGSTNYADSVKGRATLSVDKSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGA YYGNAMDYWGQGTLVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRSSQSLL NSGNQKNYVTWYQQKPGKAPKLLIYWASFLYSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNDYFYPLTFGQGTKVEIK	210
3-P21- H2(G4S)4L1	EIQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTGYNMKWVRQAP GKGLEWIGNINPYFGSTNYADSVKGRATLSVDKSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGA YYGNAMDYWGQGTLVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCR SSQSLLNSGNQKNYVTWYQQKPGKAPKLLIYWASFLYSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQNDYFYPLTFGQGT KVEIK	211
3-P21- L1(G4S)3H2	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRSSQSLLNSGNQKNYVTWY QQKPGKAPKLLIYWASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQNDYFYPLTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGG	212

	GSEIQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYNMKWVRQ APGKGLEWIGNINPYFGSTNYADSVKGRATLSVDKSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCARGAYYGNAMDYWGQGTLVTVSS	
15-D6- H5(G4S)3L4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWINWVRQAP GKGLEWIGYIYPGRSSTNYNEKFKGRATLSVDTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCSRLSRGNAMDYWGQGTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLLNS GNQKSYVTWYQQKPGKAPKLLIWASHRYTGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQNDYYYPFTFGQGTKVEIK	213
15-D6- H5(G4S)4L4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWINWVRQAP GKGLEWIGYIYPGRSSTNYNEKFKGRATLSVDTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCSRLSRGNAMDYWGQGTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSS QSLLNSGNQKSYVTWYQQKPGKAPKLLIWASHRYTGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQNDYYYPFTFGQGTKV EIK	214
15-D6- L4(G4S)3H5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLLNSGNQKSYVTWY QQKPGKAPKLLIWASHRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQNDYYYPFTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWINWVRQ APGKGLEWIGYIYPGRSSTNYNEKFKGRATLSVDTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRLSRGNAMDYWGQGTLVTVSS	215

Слитые белки scFvs, конденсированные с одним (G₄S) линкером и Fc IgG4 человека (в порядке scFv, G₄S линкер и Fc от N-конца до С-конца) тестируют на их способность связывать CLDN18.2. Стабильную клеточную линию (HEK293-CLDN18.2), экспрессирующую CLDN18.2 человека, применяют в FACS экспериментах с определением на основе Alexa Fluor® 488, как описано в PCT/US19/020872. Йодид пропидия инкубируют вместе со вторичным антителом для мечения мертвых клеток. Результаты связывания показаны на фиг. 3А-3L.

Пример 4: Конструирование конструкций химерного антигенного рецептора, содержащего анти-CLDN 18.2 антигенсвязывающие домены.

Для конструирования CAR, mAb превращают в scFv с использованием VH, VL и (G₄S)_n линкера, и scFv сливают с N-концом шарнира и трансмембранных доменов, полученных из CD8α человека (ак 114-188, Boursier JP et al., J Biol Chem. 1993; 268(3): 2013-20). С-концевой внутриклеточный сигнальный домен CAR конструируют слиянием с внутриклеточным костимулирующим доменом CD28 (ак 162-202, Aruffo A and Seed B, Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84(23):8573-7), затем с активационным доменом CD3 дзета-

цепи (ак 52-162, Letourneur F and Klausner RD, Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88(20):8905-9). Последовательность ДНК, кодирующую CAR, собирают и клонируют в вектор экспрессии (либо ретровирусный, лентивирусный, экстрахромосомный или интегрированный) для создания конструкции CAR с использованием стандартных методов клонирования молекулярной биологии.

Пример 5: Анализ уничтожения опухолевых клеток для оценки активности CAR T-клеток.

CD4⁺/CD8⁺ Т-клетки выделяют с использованием набора для выделения Pan T (Miltenyi Biotech, Cat#: 130-096-535), и активируют в течение 3 дней с применением Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 (ThermoFisher, Cat#: 11131D) в среде AIM V (ThermoFisher, Cat#: 12055083), содержащей 10% FBS, в соответствии с инструкциями производителя. Затем активные Т-клетки непрерывно культивируют в течение менее недели в среде AIM V, содержащей 10% FBS и 300 МЕ/мл IL2 (R&D systems, Cat#: 202-IL-050) и временно трансфицируют плазмидой 5E22-H3(G4S)₃L3 CAR экспрессии через электропорацию с получением CAR Т-клеток. После 48-часового периода восстановления, CAR Т-клетки и активные Т-клетки используют в качестве эффекторных клеток. Клетки-мишени HEK293-CLDN 18.2 и HEK293-CLDN 18.1 окрашивают CFSE (ThermoFisher, Cat#: C34554) и культивируют совместно с CAR Т-клетками в течение 24 часов при соотношении Е/Т (эффектор/мишень) 2,5:1. Затем клетки окрашивают PI (ThermoFisher, Cat#: P3566) и аннексином V (Biolegend, Cat#: 640924) и анализируют проточной цитометрией (Attune NxT). Подсчитывают только CFSE-положительные клетки. Долю лизиса опухолевых клеток рассчитывают как долю PI и/или аннексин V-положительных клеток, и показывают на фиг.4.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что изменения могут быть внесены в варианты осуществления, описанные выше, без отступления от их широкой изобретательской концепции. Поэтому понятно, что это изобретение не ограничивается конкретными описанными вариантами осуществления, но предназначено для охвата модификаций в пределах сути и объема настоящего изобретения, как определено в настоящем описании.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит:

(a) внеклеточный домен, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, который специфически связывает клаудин 18.2 (CLDN 18.2);

(b) шарнирную область;

(c) трансмембранную область; и

(d) внутриклеточный сигнальный домен.

2. Выделенный полинуклеотид по п.1, в котором антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

(1) SEQ ID NO: 21, 22, 23, 51, 52 и 53, соответственно;

(2) SEQ ID NO: 24, 25, 26, 54, 55 и 56, соответственно;

(3) SEQ ID NO: 27, 28, 29, 57, 58 и 59, соответственно;

(4) SEQ ID NO: 30, 31, 32, 60, 61 и 62, соответственно;

(5) SEQ ID NO: 33, 34, 35, 63, 64 и 65, соответственно;

(6) SEQ ID NO: 36, 37, 38, 66, 67 и 68, соответственно;

(7) SEQ ID NO: 39, 40, 41, 69, 70 и 71, соответственно;

(8) SEQ ID NO: 42, 43, 44, 72, 73 и 74, соответственно;

(9) SEQ ID NO: 45, 46, 47, 75, 76 и 77, соответственно; и

(10) SEQ ID NO: 48, 49, 50, 78, 79 и 80, соответственно;

где их антигенсвязывающий домен специфически связывает CLDN 18.2, предпочтительно CLDN 18.2 человека.

3. Выделенный полинуклеотид по п.1, в котором антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

(1) SEQ ID NO: 81, 82, 83, 111, 112 и 113, соответственно;

(2) SEQ ID NO: 84, 85, 86, 114, 115 и 116, соответственно;

(3) SEQ ID NO: 87, 88, 89, 117, 118 и 119, соответственно;

(4) SEQ ID NO: 90, 91, 92, 120, 121 и 122, соответственно;

(5) SEQ ID NO: 93, 94, 95, 123, 124 и 125, соответственно;

(6) SEQ ID NO: 96, 97, 98, 126, 127 и 128, соответственно;

(7) SEQ ID NO: 99, 100, 101, 129, 130 и 131, соответственно;

(8) SEQ ID NO: 102, 103, 104, 132, 133 и 134, соответственно;

(9) SEQ ID NO: 105, 106, 107, 135, 136 и 137, соответственно; и

(10) SEQ ID NO: 108, 109, 110, 138, 139 и 140, соответственно;

где их антигенсвязывающий домен специфически связывает CLDN 18.2, предпочтительно CLDN 18.2 человека.

4. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1-3, в котором антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 или 19, или вариабельную область легкой цепи, имеющей полипептидную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20.

5. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1-4, где антигенсвязывающий домен содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2;

(2) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 4;

(3) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6;

(4) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 8;

(5) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 10;

(6) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 12;

(7) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 14;

(8) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 16;

(9) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 18; или

(10) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 20.

6. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1-3, в котором антигенсвязывающий домен является гуманизированным и содержит вариабельную

область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 142, 143, 146, 147, 151, 152, 154, 155, 156, 159, 160, 161, 162, 166, 167, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 186, 187, 191, 192 или 193, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 144, 145, 148, 149, 150, 153, 157, 158, 163, 164, 165, 168, 169, 173, 174, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 189, 190, 194, 195, 196 или 197.

7. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1-3 и 6, в котором антигенсвязывающий домен является гуманизированным и содержит:

(1) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 142, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 144;

(2) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 142, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 145;

(3) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 143, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 144;

(4) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 143, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 245;

(5) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 146, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 148;

(6) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 146, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 149;

(7) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 146, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 150;

(8) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 147, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 148;

(9) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 147, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 149;

(10) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 147, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 150;

(11) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную

последовательность SEQ ID NO: 151, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 153;

(12) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 152, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 153;

(13) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 154, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 157;

(14) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 155, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 157;

(15) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 156, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 158;

(16) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 159, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 163;

(17) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 159, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 164;

(18) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 160, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 163;

(19) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 160, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 164;

(20) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 161, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 165; или

(21) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 162, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 165.

8. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1-7, где антигенсвязывающим доменом является одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), который специфически связывает CLDN 18.2 человека, предпочтительно CLDN 18.2 человека.

9. Выделенный полинуклеотид по п.8, в котором одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) является гуманизированным и содержит полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из SEQ ID NO: 198-215.

10. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1-9, где химерный антигенный рецептор (CAR) содержит один или более антигенсвязывающих доменов.

11. Выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1-10, в котором внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит один или более костимулирующих доменов и один или более активирующих доменов.

12. Химерный антигенный рецептор (CAR), кодируемый выделенным полинуклеотидом по любому из пп. 1-11.

13. Вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по любому из пп. 1-11.

14. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.13.

15. Клетка-хозяин по п.14, где клеткой является CAR-T-клетка, предпочтительно CAR-T-клетка человека.

16. Клетка-хозяин по п.14, где клеткой является клетка CAR-NK, предпочтительно клетка CAR-NK человека.

17. Способ получения клетки-хозяина, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий трансдукцию Т-клетки вектором по п.13.

18. Способ получения химерного антигенного рецептора (CAR)-Т клетки, включающий культивирование Т-клетки, содержащей выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по любому из пп. 1-11 в условиях получения CAR-T-клетки и выделения CAR-T-клетки.

19. Способ получения клетки-хозяина, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий стадии трансдукции клетки NK вектором по п.13.

20. Способ получения химерного антигенного рецептора (CAR)-NK клеток, включающий культивирование NK-клеток, содержащих выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по любому из пп. 1-11 в условиях получения CAR-NK клетки и восстановления CAR-NK клетки.

21. Способ получения клетки, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), включающий контакт клетки с выделенным полинуклеотидом, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по любому из пп. 1-11, где выделенным полинуклеотидом является *in vitro* транскрибированная РНК или синтетическая РНК.

22. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту клетки-хозяина по любому из пп. 14-16.

23. Способ по п.22, в котором рак выбран из рака легких, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других гемобластозов.

24. Способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту клетки-хозяина по любому из пп. 14-16.

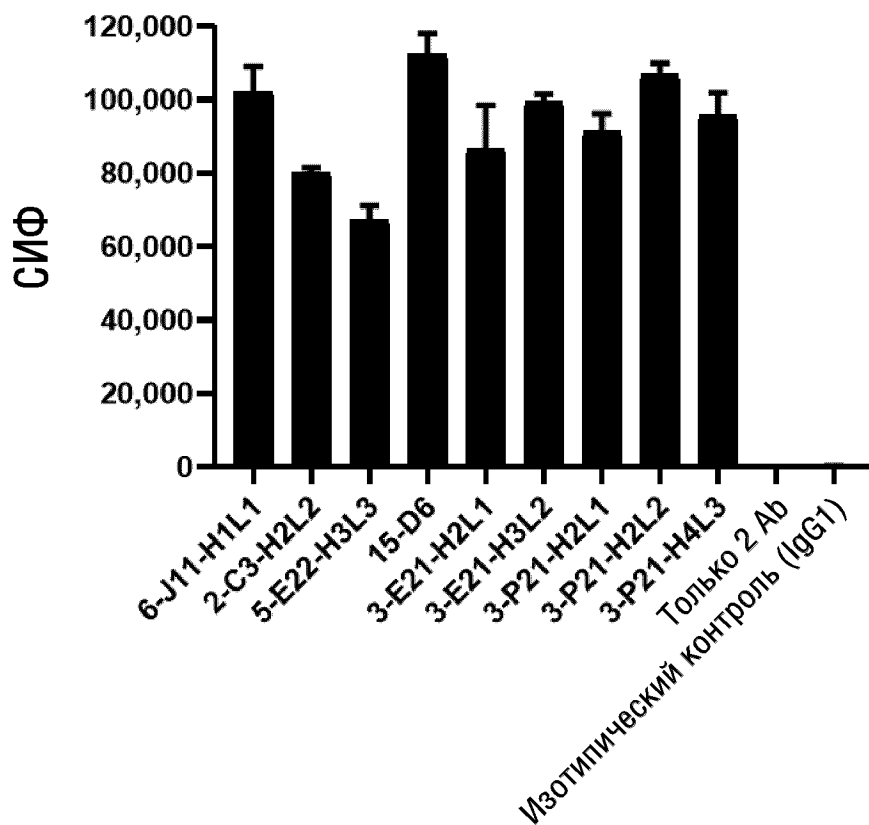
25. Способ по любому из пп. 22-24, дополнительно включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, агента, который увеличивает эффективность клетки, экспрессирующей молекулу CAR.

26. Способ по любому из пп. 22-24, дополнительно включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, агента, который ослабляет один или более побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей молекулу CAR.

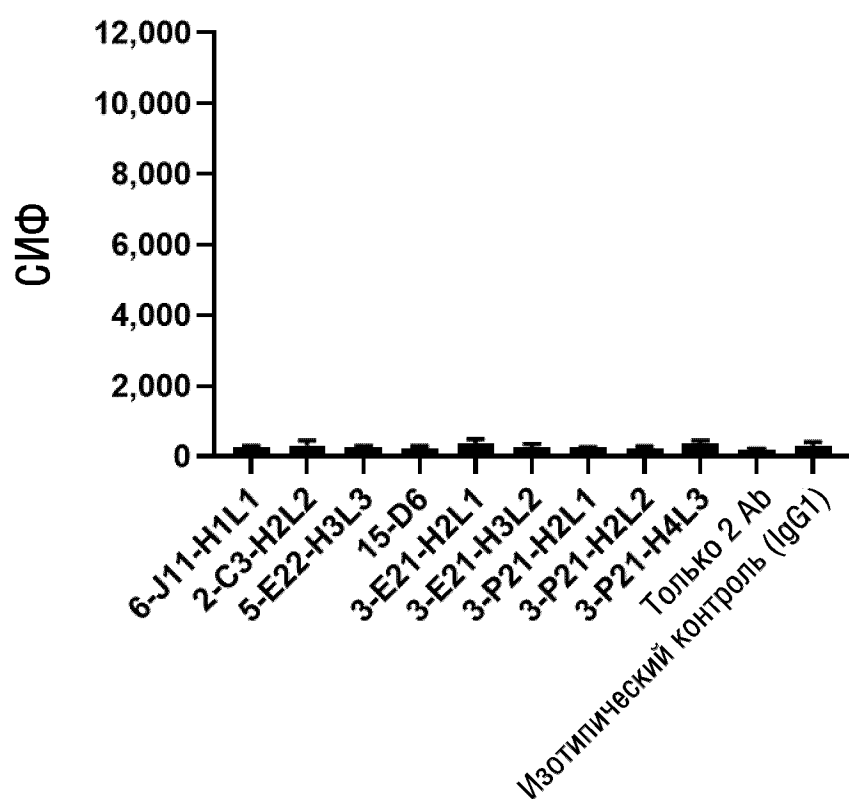
27. Способ по любому из пп. 22-24, дополнительно включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, агента, который лечит заболевание, связанное с Клаудином 18.2.

1/10

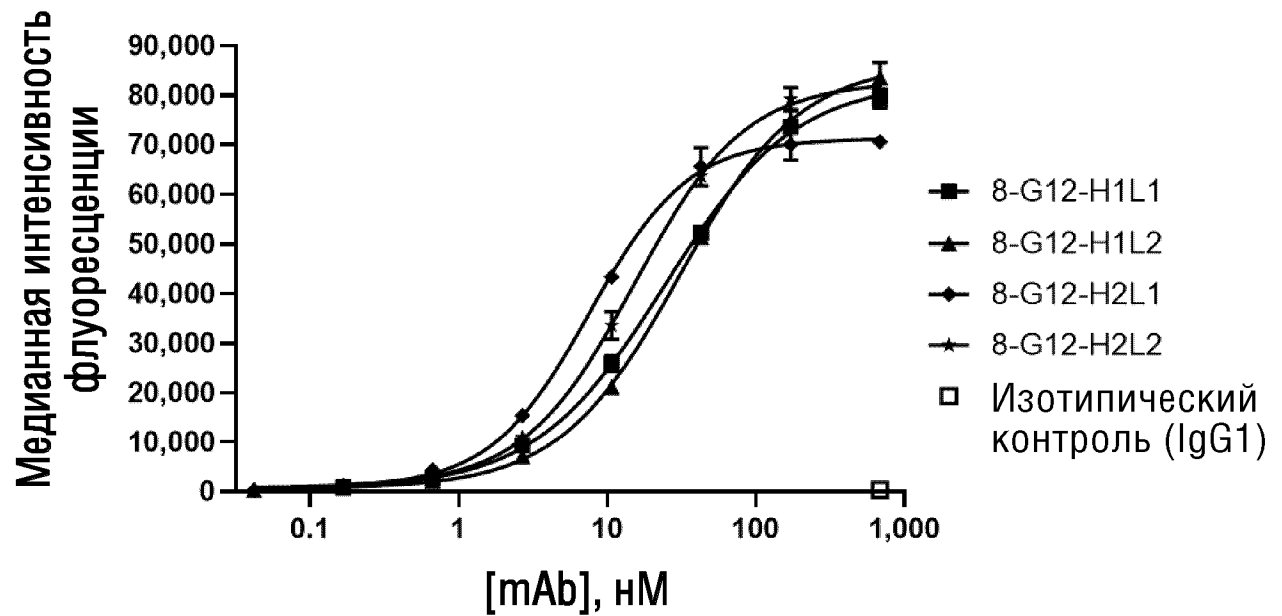
ФИГ.1А



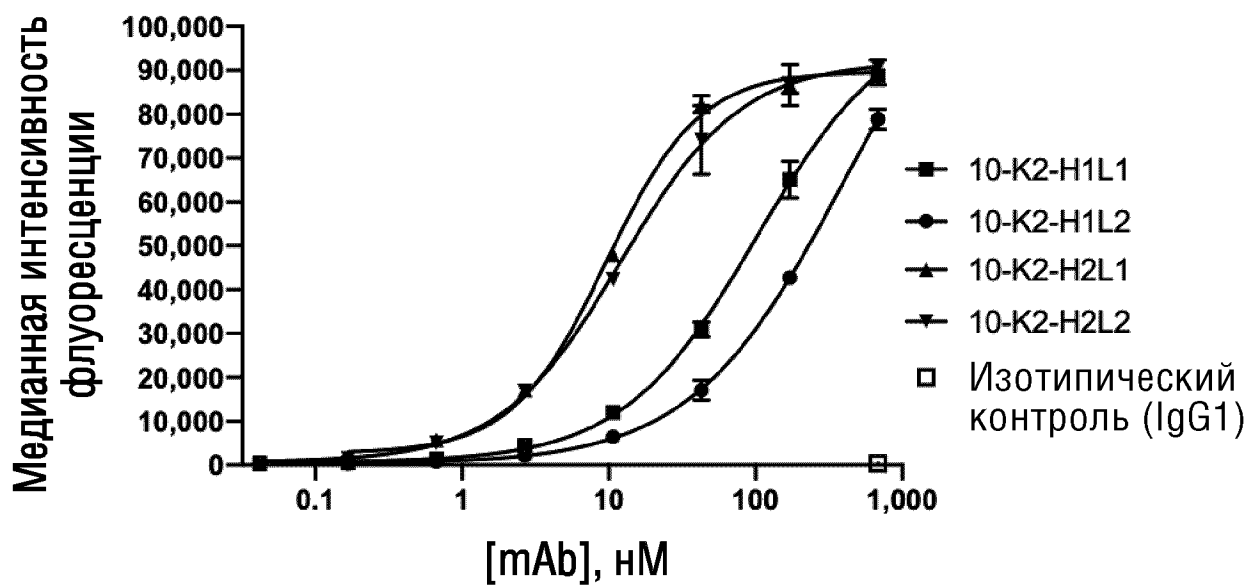
ФИГ.1В



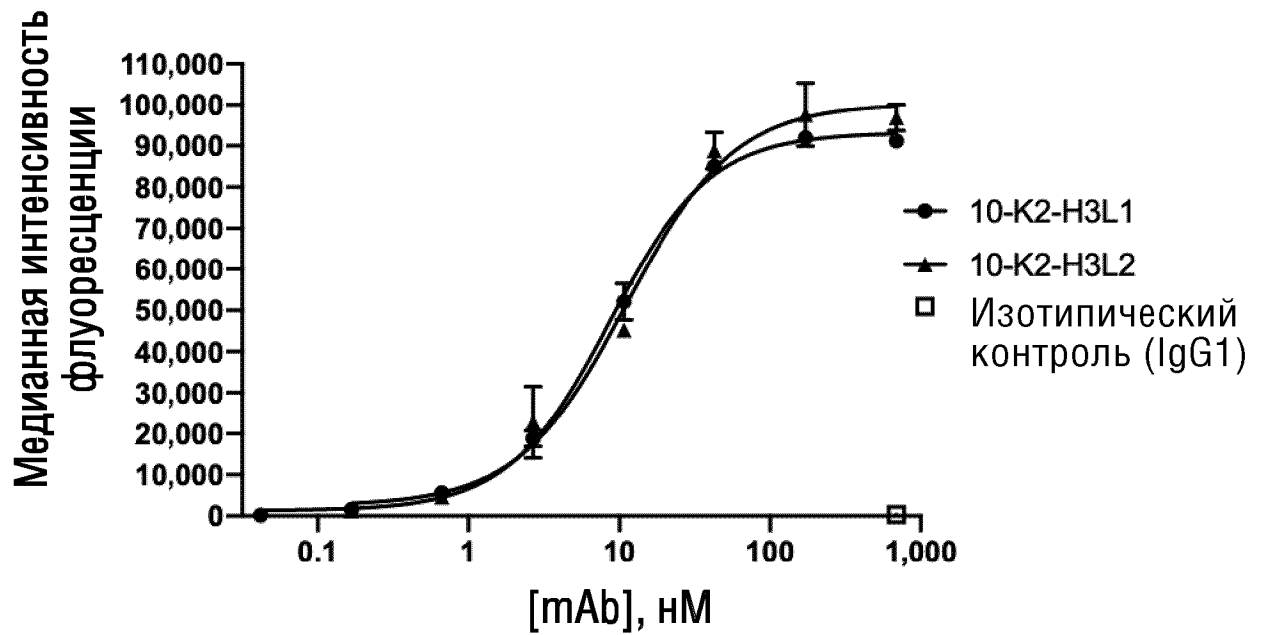
ФИГ.2А



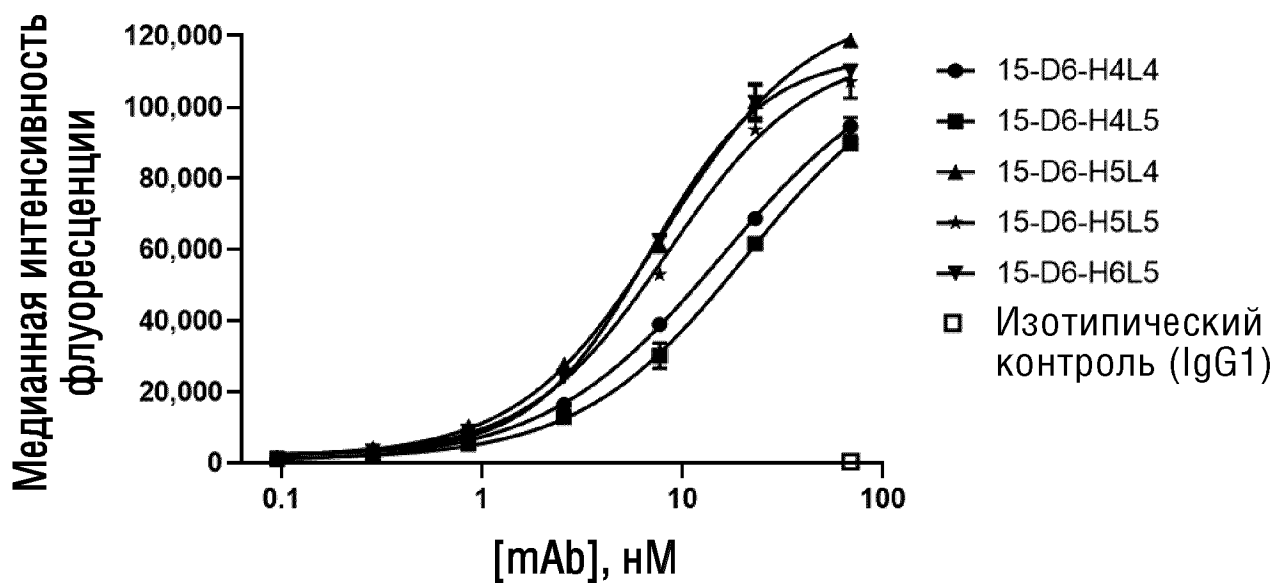
ФИГ.2В



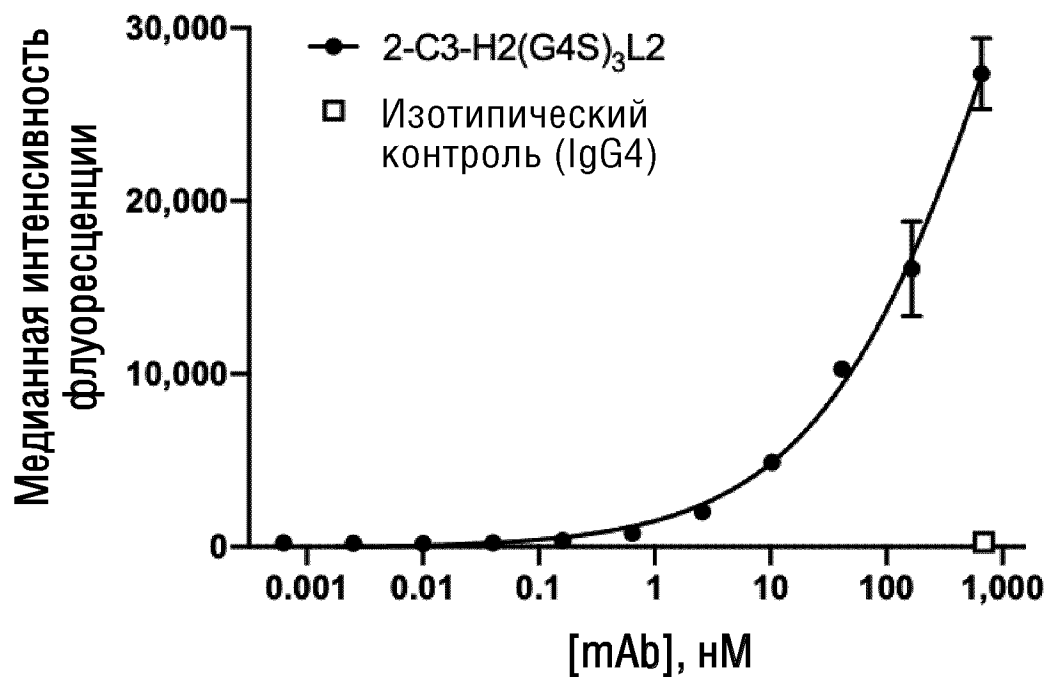
ФИГ.2С



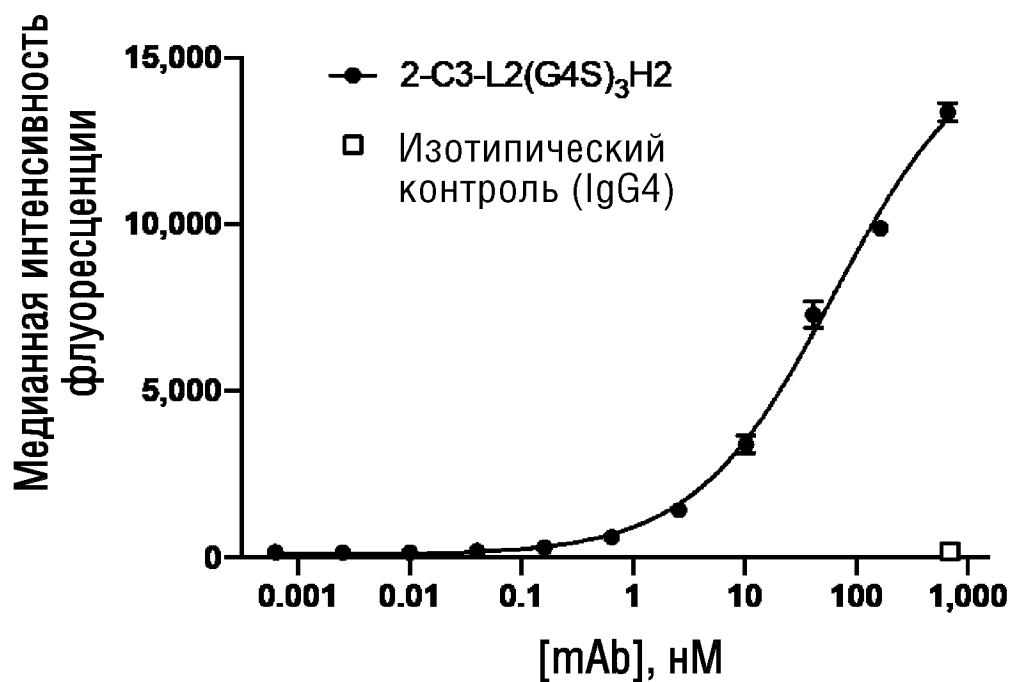
ФИГ.2D



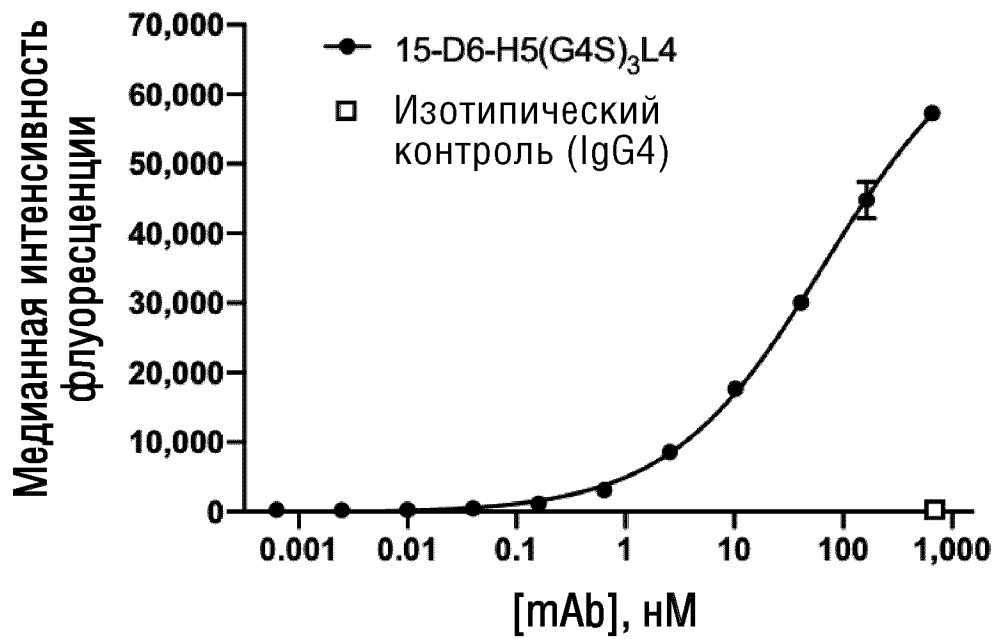
ФИГ.3А



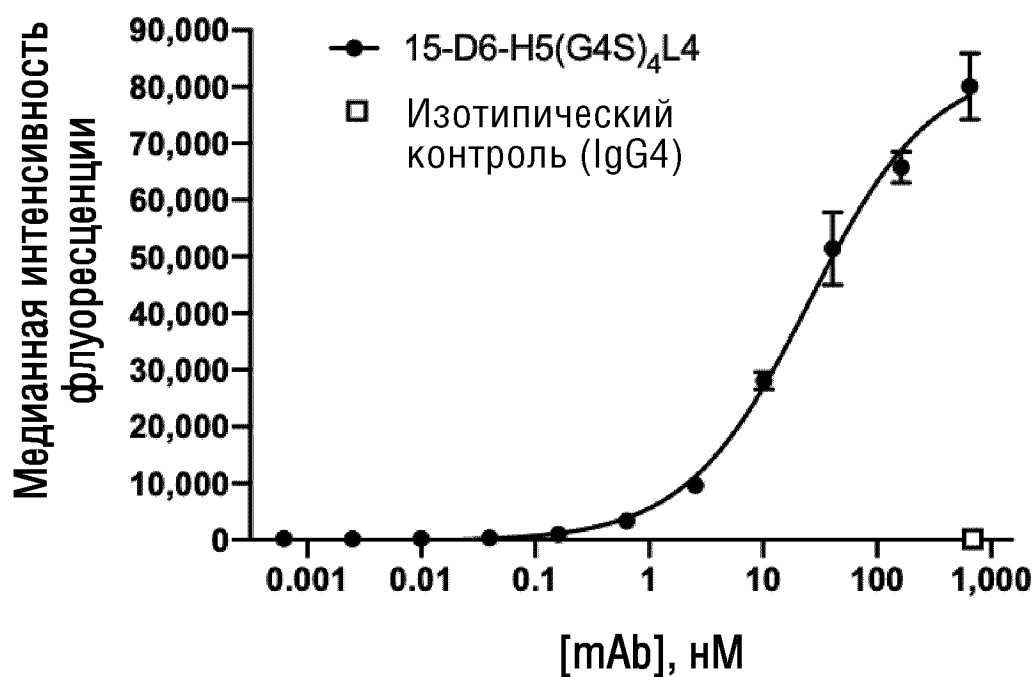
ФИГ.3В



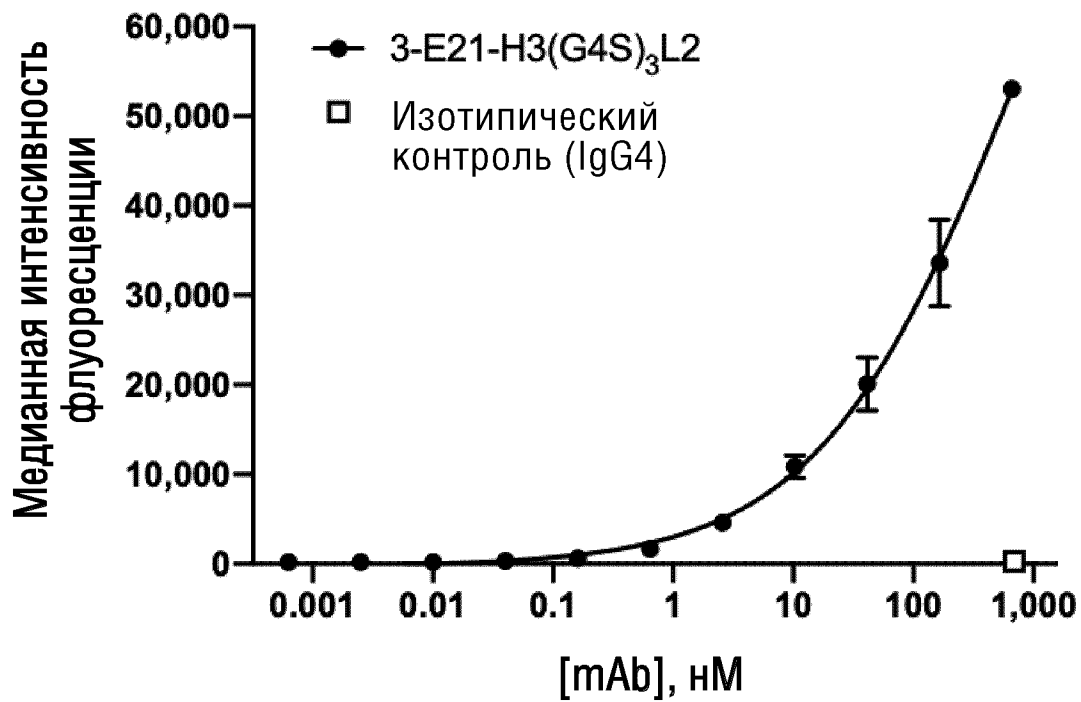
ФИГ.3С



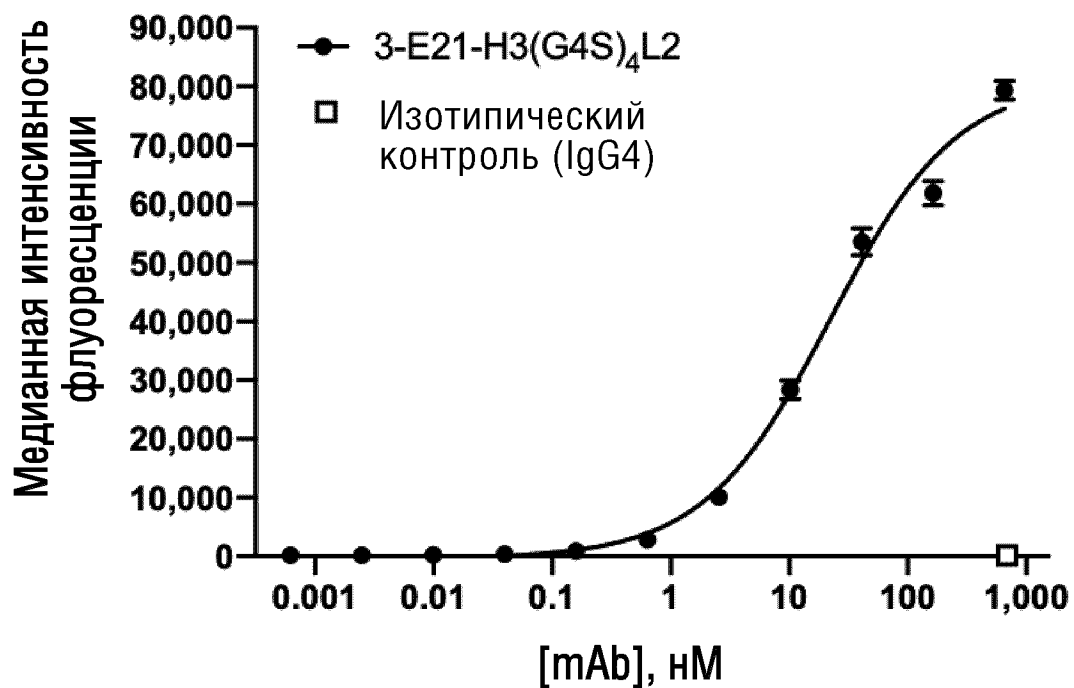
ФИГ.3D



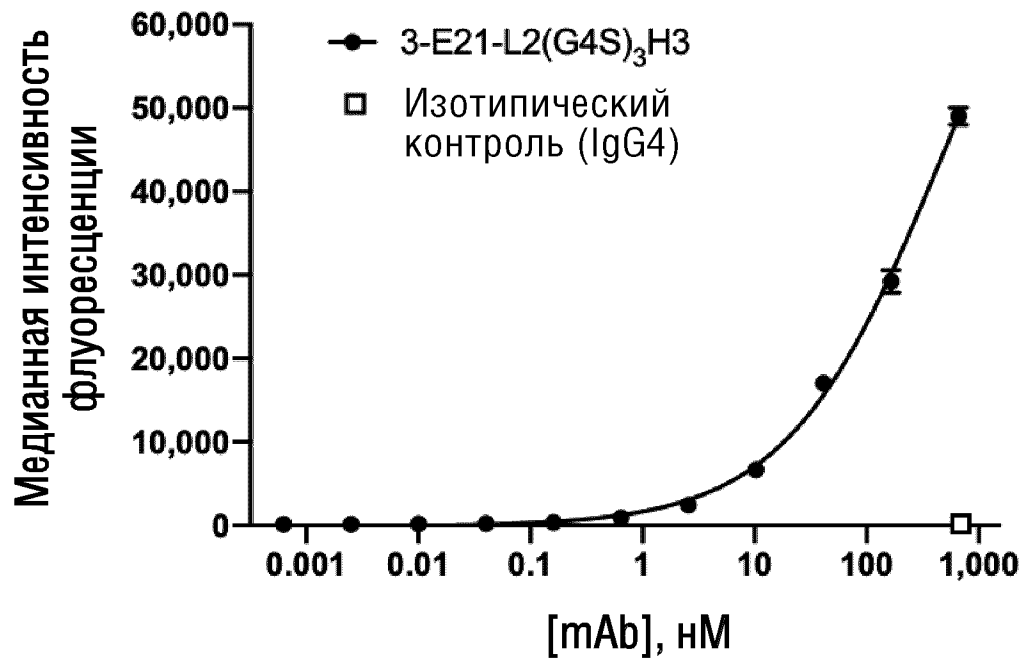
ФИГ.3Е



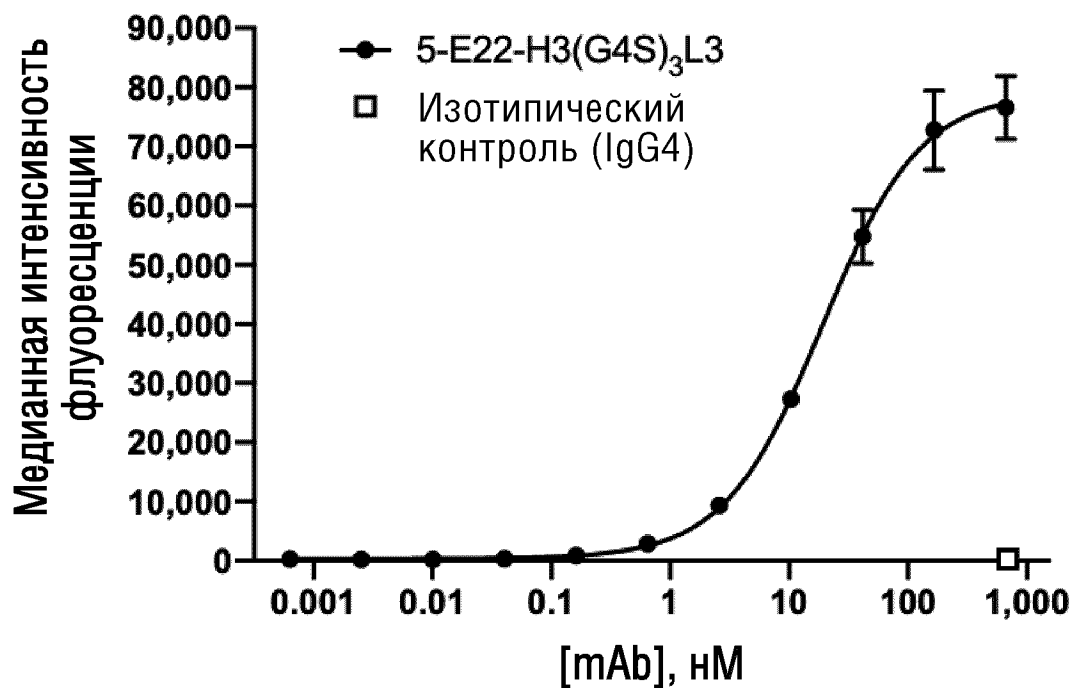
ФИГ.3F



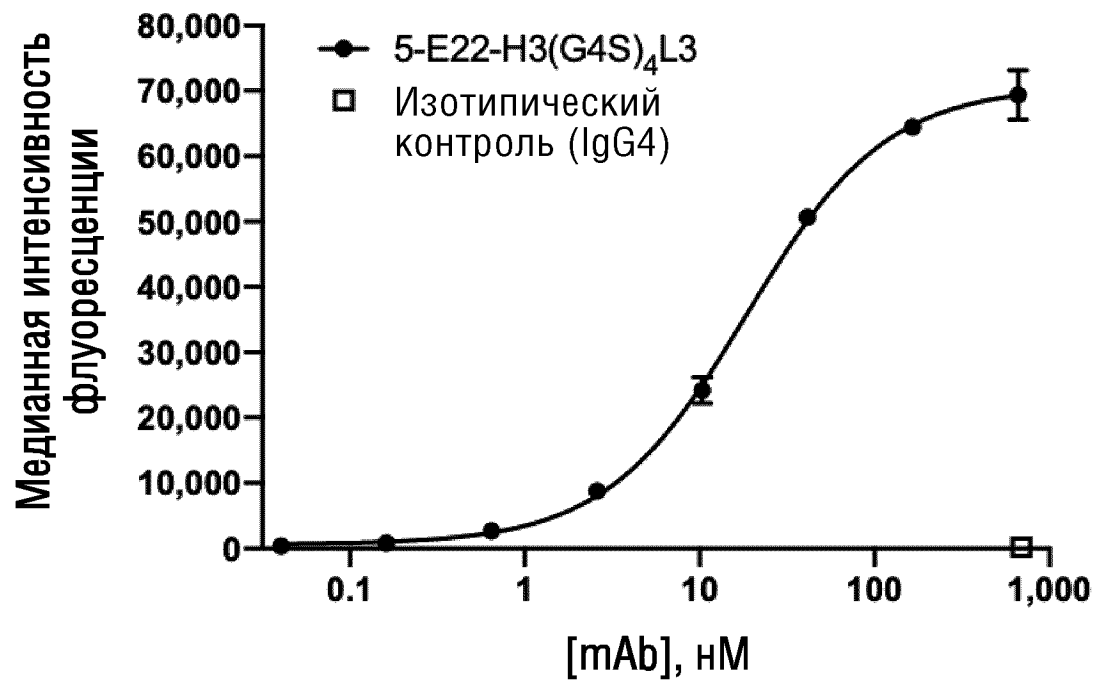
ФИГ.3G



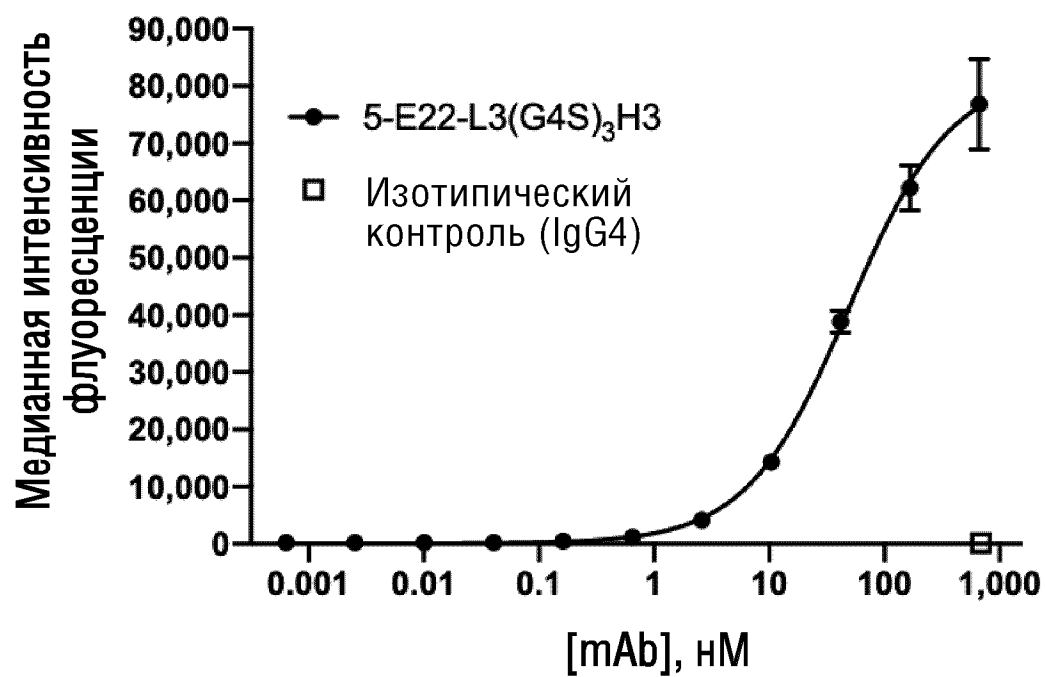
ФИГ.3H



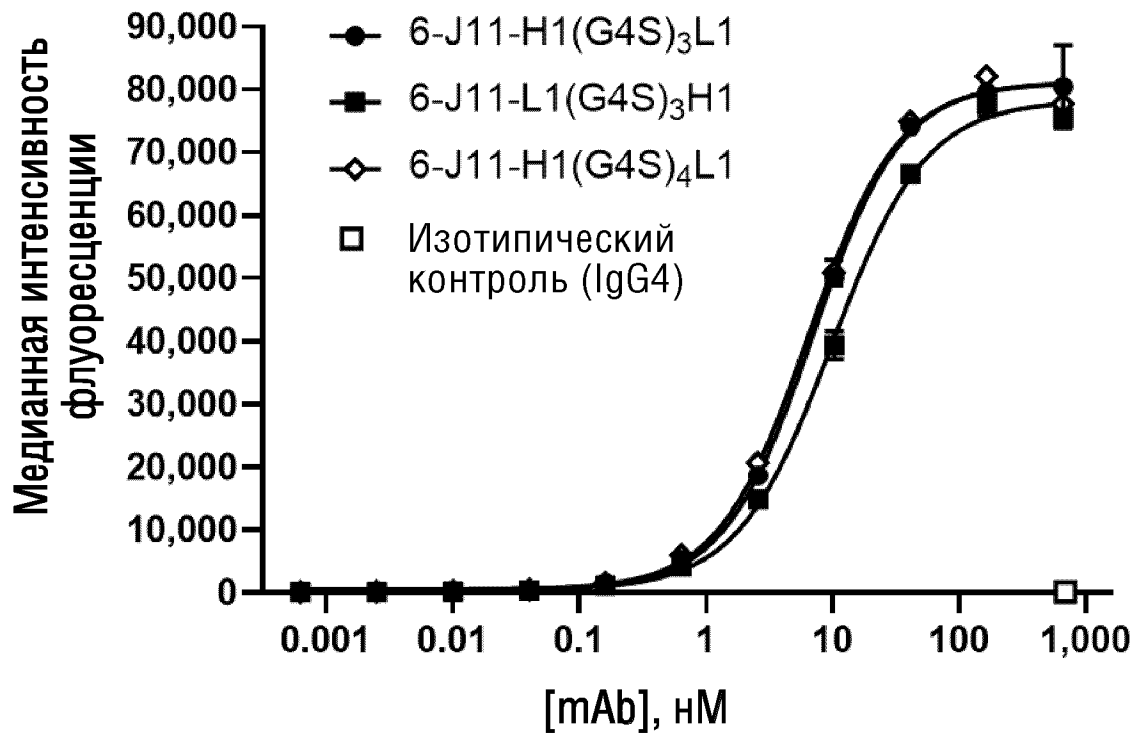
ФИГ.3I



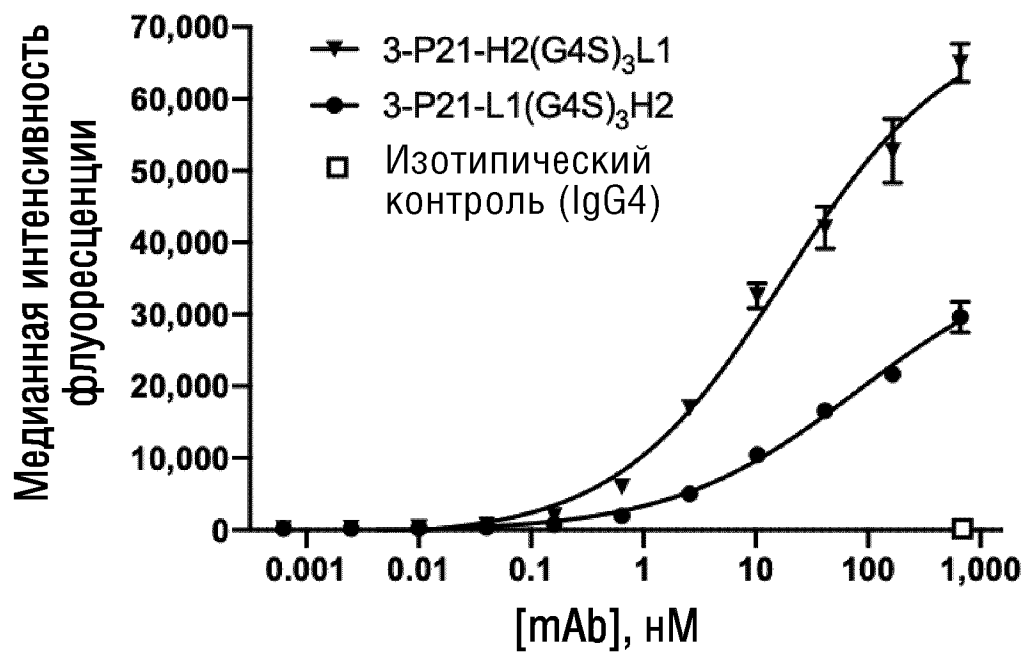
ФИГ.3J



ФИГ.3К



ФИГ.3Л



ФИГ.4

