

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291904 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.09.16

(51) Int. Cl. A61K 38/19 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.11

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ПОМОЩЬЮ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ, НАЦЕЛЕННЫХ НА ГЛИПИКАН 3

(31) 62/951,309

(32) 2019.12.20

(33) US

(86) PCT/US2020/064415

(87) WO 2021/126672 2021.06.24

(71) Заявитель:
МЕДИМБЬОН, ЭЛЭЛСИ (US)

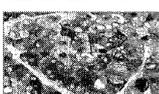
(72) Изобретатель:

Гилбрет Райан, Муди Гордон,
Джардино Торкья Мария Летиция,
Ван Цюн, Мамм Джон (US)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к композициям и способам лечения рака с использованием Т-клеток с химерными антигенными рецепторами, нацеленными на глипикан 3.

		% Positive (n) % положительных (n) при любой интенсивности	% High Pos. (n) % крайне положительных (n) ≥2+ 50% TC
HCC (n=49)		80% (39)	33% (16)
NSCLC SCC (n=76)		30% (23)	7% (5)
Светлые клетки яичника (n=15)		47% (7)	20% (3)

A1

202291904

202291904

A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ПОСРЕДСТВОМ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ, НАЦЕЛЕННЫХ НА ГЛИПИКАН 3

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[01] Настоящее изобретение относится к лечению рака с использованием Т-клеток с химерным антигенным рецептором.

Уровень техники

1. Терапия с использованием Т-клеток с химерным антигенным рецептором

[02] Терапия с использованием Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR) представляет собой специфическую форму иммунотерапии на основе клеток, в которой для борьбы с раком используются сконструированные Т-клетки. При терапии с использованием Т-клеток с CAR Т-клетки собирают из крови пациента, конструируют *ex vivo* для экспрессии CAR, содержащих как антигенсвязывающие домены, так и домены, активирующие Т-клетки, увеличивают количество до более крупной популяции и вводят пациенту. Т-клетки с CAR действуют как живое лекарственное средство, связываясь с раковыми клетками и вызывая их разрушение. В случае успеха эффекты лечения Т-клетками с CAR имеют тенденцию быть длительными, о чем свидетельствует выявление персистенции и увеличения количества Т-клеток с CAR у пациентов спустя долгое время после клинической ремиссии.

2. Структура и функция CAR

[03] Антигенсвязывающий домен CAR представляет собой внеклеточную область, которая нацелена на поверхностный антиген на опухолевых клетках. Подходящими целевыми антигенами могут быть белки, фосфорилированные белки, пептид-МНС, углеводы или молекулы гликолипидов. Идеальные целевые антигены в больших количествах экспрессируются на опухолевых клетках, что дает возможность нацеливаться на высокий процент раковых клеток. Идеальные целевые антигены-кандидаты также обычно экспрессируются в минимальных количествах в нормальных тканях, что ограничивает внеопухолевую токсичность в мишени. Антигенсвязывающий домен CAR содержит нацеливающий фрагмент, такой как одноцепочечный переменный фрагмент антитела (scFv), который направлен против целевого антигена.

[04] Домен CAR, активирующий Т-клетки, является внутриклеточным и активирует Т-клетку в ответ на взаимодействие антигенсвязывающего домена с целевым антигеном. Домен, активирующий Т-клетки, может содержать один или несколько костимулирующих доменов, которые представляют собой внутриклеточные домены известных активирующих Т-клеточных рецепторов. Отбор и расположение костимулирующих доменов в конструкции с CAR влияют на функцию и судьбу Т-клеток с CAR, поскольку костимулирующие домены по-разному влияют на кинетику Т-клеток с CAR, цитотоксическую функцию и профиль безопасности.

[05] Внеклеточные антигенсвязывающие и внутриклеточные домены CAR, активирующие Т-клетки, связаны посредством трансмембранного домена, шарнира и необязательно спейсерной области. Шарнирный домен представляет собой короткий пептидный фрагмент, который обеспечивает конформационную свободу для облегчения связывания с целевым антигеном на опухолевой клетке. Его можно использовать отдельно или в сочетании со спейсерным доменом, который проецирует scFv от поверхности Т-клетки. Оптимальная длина спейсера зависит от близости связывающего эпитопа к поверхности клетки.

[06] Терапия с использованием Т-клеток с CAR против антигена В-лимфоцитов CD19 (Kymriah®, Novartis) продемонстрировала многообещающие результаты при педиатрическом остром лимфоцитарном лейкозе, а терапия с использованием Т-клеток с CAR против антигена созревания В-клеток ("bb2121", взаимодействие Celgene® и Bluebirdbio®) продемонстрировала многообещающие результаты в отношении рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломы. Более свежие данные свидетельствуют о том, что подход с CAR может быть эффективным против солидных опухолей. Терапия с использованием Т-клеток-киллеров с CAR GD2 (NKT) продемонстрировала активность при нейробластоме (Heczey A, et al. Invariant NKT cells with chimeric antigen receptor provide a novel platform for safe and effective cancer immunotherapy. *Blood*, 124(18):2824–33, 2014) и мезотелин-содержащие Т-клетки с CAR с пембролизумабом продемонстрировали противоопухолевую активность при мезотелиоме. Однако необходимы дополнительные мишени для лечения солидных опухолей.

3. Проблемы, связанные с терапией с использованием Т-клеток с CAR

[07] К сожалению, сложности, связанные с терапией на основе Т-клеток с CAR, могут приводить к нежелательным и небезопасным эффектам. Внеопухолевые эффекты, такие как нейротоксичность и острый респираторный дистресс-синдром, являются потенциальными побочными эффектами терапии с использованием Т-клеток с CAR и являются потенциально фатальными. Синдром высвобождения цитокинов (CRS) является

наиболее распространенным явлением острой токсичности, ассоциированной с Т-клетками с CAR. CRS возникает, когда лимфоциты сильно активируются и высвобождают избыточные количества воспалительных цитокинов. Случаи повышения содержания интерлейкина 2, интерлейкина 6, интерлейкина 1 бета, GM-CSF и/или С-реактивного белка в сыворотке крови иногда наблюдаются у пациентов с CRS при анализе этих факторов. CRS классифицируется по степени тяжести и диагностируется как одна из степеней 1–4 (от легкой до тяжелой), при этом более серьезные случаи клинически характеризуются высокой температурой, гипотензией, гипоксией и/или полиорганной токсичностью у пациента. В одном исследовании сообщалось, что у 92% пациентов с острым лимфоцитарным лейкозом, получавших лечение посредством терапии с использованием Т-клеток с CAR для CD19, наблюдался CRS, и у 50% этих пациентов развились симптомы 3–4 степени.

[08] Следовательно, необходимы дополнительные методы терапии на основе Т-клеток с CAR, чтобы расширить арсенал эффективных способов лечения рака. Тем не менее, необходимо разработать новые виды терапии с использованием Т-клеток с CAR, которые позволяют эффективно лечить рак и сводить к минимуму риск развития опасных воспалительных ответных реакций, таких как CRS.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[09] В настоящем изобретении описаны композиции и способы применения Т-клеток с CAR для лечения рака.

[010] Как описано ниже, в первом аспекте настоящее изобретение предусматривает выделенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит антигенсвязывающий домен, специфический в отношении глипикана 3 (GPC3), где антигенсвязывающий домен характеризуется равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей приблизительно 100 наномоль/л (нМ) или меньше, и где конструкция с CAR не индуцирует выработку цитокинов в GPC3-экспрессирующих клетках.

[011] В некоторых вариантах осуществления первого аспекта антигенсвязывающий домен CAR содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[012] В некоторых вариантах осуществления первого аспекта антигенсвязывающий домен представляет собой Fab или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

[013] В некоторых вариантах осуществления первого аспекта антигенсвязывающий домен представляет собой scFv, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

[014] В некоторых вариантах осуществления первого аспекта выделенная нуклеиновая кислота дополнительно кодирует трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен.

[015] В некоторых вариантах осуществления первого аспекта трансмембранный домен предусматривает трансмембранный домен CD28.

[016] В некоторых вариантах осуществления первого аспекта костимулирующий домен предусматривает один или несколько костимулирующих доменов CD28, 4-1BB, CD3-дзета, OX-40, ICOS, CD27, GITR и MyD88/CD40.

[017] В некоторых вариантах осуществления первого аспекта костимулирующий домен предусматривает один или несколько костимулирующих доменов CD28, 4-1BB и CD3-дзета.

[018] В некоторых вариантах осуществления первого аспекта сигнальный домен содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид CSFR2.

[019] В некоторых вариантах осуществления первого аспекта CAR для GPC3 дополнительно содержит шарнирный/спейсерный домен.

[020] В некоторых вариантах осуществления первого аспекта шарнирный/спейсерный домен представляет собой шарнирный/спейсерный домен IgG4P.

[021] В некоторых вариантах осуществления первого аспекта последовательность нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, или SEQ ID NO: 26.

[022] Во втором аспекте настоящее изобретение предусматривает химерный антигенный рецептор (CAR) для GPC3, содержащий антигенсвязывающий домен, где антигенсвязывающий домен содержит антитело, Fab или scFv, содержащие переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), где VH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, и где VL содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 44, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 45.

[023] В некоторых вариантах осуществления второго аспекта VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 29.

[024] В некоторых вариантах осуществления второго аспекта VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 30.

[025] В некоторых вариантах осуществления второго аспекта CAR для GPC3 дополнительно содержит трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен.

[026] В некоторых вариантах осуществления второго аспекта CAR для GPC3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 25.

[027] В третьем аспекте настоящее изобретение предусматривает вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где последовательность нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 33, или SEQ ID NO: 34.

[028] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, содержащую вектор по третьему аспекту.

[029] В четвертом аспекте настоящее изобретение предусматривает клетку, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит антигенсвязывающий домен, специфический в отношении глипикана 3 (GPC3), где антигенсвязывающий домен характеризуется равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей приблизительно 100 наномоль/л (нМ) или меньше, и где конструкция с CAR не индуцирует выработку цитокинов в клетках GPC3.

[030] В некоторых вариантах осуществления четвертого аспекта последовательность нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 33, или SEQ ID NO: 34.

[031] В пятом аспекте настоящее изобретение предусматривает клетку, содержащую химерный антигенный рецептор (CAR) для GPC3, содержащий антигенсвязывающий домен, где антигенсвязывающий домен содержит антитело, Fab или scFv, содержащие переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), где VH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, CDR2, содержащую аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO: 38, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, и где VL содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 44, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 45.

[032] В некоторых вариантах осуществления пятого аспекта VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 29.

[033] В некоторых вариантах осуществления пятого аспекта VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 30.

[034] В некоторых вариантах осуществления пятого аспекта CAR дополнительно содержит трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен.

[035] В некоторых вариантах осуществления пятого аспекта CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, или SEQ ID NO: 25.

[036] В некоторых вариантах осуществления пятого аспекта клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), цитотоксического Т-лимфоцита (CTL) и регуляторной Т-клетки.

[037] В некоторых вариантах осуществления пятого аспекта клетка проявляет противоопухолевый иммунитет при контакте с опухолевой клеткой, экспрессирующей GPC3.

[038] В шестом аспекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества клеток, содержащих химерный антигенный рецептор (CAR) для GPC3, содержащий антигенсвязывающий домен, где антигенсвязывающий домен содержит антитело, Fab или scFv, содержащие переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), где VH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, и где VL содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 44, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 45.

[039] В некоторых вариантах осуществления шестого аспекта способ дополнительно включает подавление роста опухоли, индуцирование регрессии опухоли и/или увеличение продолжительности жизни субъекта.

[040] В некоторых вариантах осуществления шестого аспекта клетка представляет собой аутологичную клетку.

[041] В некоторых вариантах осуществления шестого аспекта аутологичная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), цитотоксического Т-лимфоцита (CTL) и регуляторной Т-клетки.

[042] В некоторых вариантах осуществления шестого аспекта рак представляет собой солидную опухоль.

[043] В некоторых вариантах осуществления шестого аспекта рак представляет собой гепатоцеллюлярную карциному, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника и/или плоскоклеточную карциному легкого.

[044] В некоторых вариантах осуществления шестого аспекта рак представляет собой гепатоцеллюлярную карциному.

[045] В некоторых вариантах осуществления шестого аспекта способ дополнительно включает введение субъекту эффективного количества антител к TNF α .

[046] Эти и другие особенности и преимущества настоящего изобретения будут более понятны из следующего подробного описания, взятого вместе с прилагаемой формулой изобретения. Следует отметить, что объем формулы изобретения определяется приведенными в ней формулировками, а не конкретным обсуждением признаков и преимуществ, изложенных в настоящем описании.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[047] Сопроводительные графические материалы включены для обеспечения дальнейшего понимания способов и композиций по настоящему изобретению.

Графические материалы иллюстрируют один или несколько из варианта(-ов) осуществления настоящего изобретения и вместе с описанием служат для пояснения принципов и действия настоящего изобретения.

[048] **Фигуры 1А и 1В. Экспрессия GPC3 в раковых и нормальных тканях.** **1А:** окрашивание антител к GPC3 приводит в результате к гепатоцеллюлярной карциноме (HCC), немелкоклеточному раку легкого (NSCLC) и раку яичника. **1В:** результаты иммуногистохимии (ИНС) ткани ганглия толстой кишки человека.

[049] **Фигура 2. Сравнение тяжелых и легких переменных областей одноцепочечных переменных фрагментов (scFv).** Показаны GPC3-1 и GPC3-2.

[050] Фигура 3А. Связывание CAR для GPC3 клеточной поверхности с растворимым белком GPC3. Показаны значения K_D (подгонки показаны сплошными линиями).

[051] Фигуры 3В и 3С. Связывание поверхностного плазмонного резонанса scFv-Fc для GPC3 с растворимым белком GPC3. Средние значения k_a , k_d и K_D приведены для обоих взаимодействий (подгонки показаны сплошными линиями).

[052] Фигуры 4А и 4В. Выработка цитокинов при *in vitro* введении конструкций химерного антигенного рецептора (CAR) в клетки с целевым антигеном и без него. Т-клетки с CAR для GPC3 обеспечивают выработку антигенспецифических цитокинов. Клеточные линии показаны слева направо для каждой конструкции в порядке, указанном в подписях сверху вниз. **4А:** отображены результаты для трех цитокинов. УТ, нетрансдуцированные Т-клетки, являющиеся донорскими Т-клетками, которые активированы и количество которых увеличено, но не трансдуцированы трансгеном CAR. **4В:** результаты для гамма-интерферона (IFN- γ) показаны для подмножества конструкций. Типы клеток (все отрицательные, за исключением HEPG2) показаны в подписях справа.

[053] Фигура 5. Цитотоксичность CAR в клеточных линиях НСС. Используемые конструкции показаны в подписях справа. Соотношение Е:Т, эффектор:целевое соотношение. УТ: нетрансдуцированные Т-клетки.

[054] Фигура 6. Цитотоксичность GPC3-1 в клеточных линиях НСС, экспрессирующих низкий уровень GPC3. **6А:** экспрессия GPC3, оцененная с помощью проточной цитометрии, в указанных клеточных линиях. **6В:** плотность рецепторов в указанных клеточных линиях. **6С:** цитотоксичность GPC3-1 против клеточных линий, указанных в подписях, при соотношении эффектор:мишень 3:1 (верхний график) и 0,3:1 (нижний график). **6D:** КТ50 (время уничтожения 50% мишеней) GPC3-1 против указанных клеточных линий при двух различных соотношениях эффектор:мишень.

[055] Фигура 7. Исследование полифункциональности конструкций на основе Т-клеток с CAR для GPC3-2 и GPC3-1. scFv указаны слева от каждой строки, а домены костимулятора указаны вверху каждой диаграммы.

[056] Фигуры 8А и 8В. 8А. Эффект трансплантации Т-клеток с химерным антигенным рецептором (Т-клеток с CAR) в отношении веса тела. Используемые конструкции показаны в подписях справа. ВВ: вес тела. АСТ: адоптивная Т-клеточная терапия. УТ: нетрансдуцированные Т-клетки. PBS: фосфатно-солевой буфер. **7В:** ИНС, отображающая накопление Т-клеток с CAR в легочной ткани у мышей, обработанных с использованием Т-клеток с CAR для GPC3.

[057] Фигура 9. Эффект введения Т-клеток с CAR в отношении объема опухоли. Используемые конструкции показаны в подписях справа. АСТ: адоптивная Т-клеточная терапия. УТ: нетрансдуцированные Т-клетки. PBS: фосфатно-солевой буфер.

[058] Фигура 10. Эффект введения Т-клеток с CAR в отношении выживаемости. Используемые конструкции показаны в подписях справа. АСТ: адоптивная Т-клеточная терапия. УТ: нетрансдуцированные Т-клетки. PBS: фосфатно-солевой буфер.

[059] Фигуры 11А–11D. Исследование сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FAC) в отношении дифференцировки и истощения Т-клеток с CAR для GPC3-1 с использованием различных костимулирующих доменов. Показаны результаты для селезенки (11А и 11В) и опухолевых клеток (11С и 11D). Точечные графики показывают частоту CD3+ Т-клеток, инфильтрирующих каждый орган для каждой конструкции (11А и 11С). Т-клетки с CAR для GPC3 с сигнальными доменами 4-1BB/CD3-дзета (BZ) обладают большей центральной памятью и меньше истощаются, чем CD28/CD3-дзета (28Z) *in vivo*. Используемые костимулирующие домены указаны в верхней части каждой панели. Проанализированные маркеры показаны на осях x и y. FSC: прямое рассеяние. EM: эффекторная память. CM: центральная память. TN: не подверженные воздействию Т-клеток.

[060] Фигура 12. Персистенция Т-клеток с CAR для GPC3-1 в опухолях Her3В и HerG2. Используемые конструкции показаны в подписях справа. Указан процент CD3. АСТ: адоптивная Т-клеточная терапия. УТ: нетрансдуцированные Т-клетки.

[061] Фигура 13. Эффект лечения с помощью BZ GPC3-1 в отношении веса тела у мышей, не несущих опухоль, и несущих опухоль. Используемые конструкции показаны в подписях внизу. BW: вес тела. АСТ: адоптивная Т-клеточная терапия. TZ представляет собой TZ GPC3-1. УТ: нетрансдуцированные Т-клетки. PBS: фосфатно-солевой буфер.

[062] Фигура 14. Объем опухоли и время отбирания крови для анализа цитокинов BZ GPC3-1 и TZ GPC3-1. Точки отбирания крови для последующего исследования ответной реакции на цитокины указаны стрелками. Используемые конструкции показаны в подписях справа. АСТ: адоптивная Т-клеточная терапия. УТ: нетрансдуцированные Т-клетки. PBS: фосфатно-солевой буфер.

[063] Фигура 15. Максимальная системная ответная реакция на цитокин (IFN- γ) при лечении с использованием Т-клеток с CAR для GPC3-1. Приведены данные для отбирания крови в день 8, когда наблюдалась максимальная ответная реакция на цитокин. УТ: нетрансдуцированные Т-клетки. PBS: фосфатно-солевой буфер.

[064] **Фигура 16. Гистология опухолевой ткани Her3B у мышей с иммунодефицитом NOD scid gamma (NSG).** Вверху: необработанный контроль. Внизу: животное, обработанное Т-клетками с CAR для BZ GPC3-1. Изображения показаны при 20-кратном увеличении.

[065] **Фигура 17. Гистология нервной ткани кишечника у мышей с иммунодефицитом NOD scid gamma (NSG).** Слева: необработанный контроль. Справа: животное, обработанное Т-клетками с CAR для BZ GPC3-1.

[066] **Фигура 18. Количественное определение GPC3 на клеточной поверхности.** Сверху вниз: клетки A375 (GPC3-отрицательные), клетки HerG2 (высокое содержание GPC3), клетки Her3B (среднее/низкое содержание GPC3) и клетки Huh7 (низкое содержание GPC3). Участки под пиками указывают на популяцию клеток, экспрессирующих белок на уровне, указанном на оси x. APC: аллофиикоцианин.

[067] **Фигура 19. Результаты иммуносорбентного анализа цитокинов (ELISA) после 24-часового воздействия Т-клеток BZ GPC3-1.** Клеточные линии показаны слева направо в порядке, указанном в подписях сверху вниз.

[068] **Фигура 20. Иммуногистохимия против GPC3 для репрезентативных опухолевых ксенотрансплантатов из двух клеточных линий НСС.** Оба ксенотрансплантата оценивались как интенсивность =2. Данные показывают, что опухоли с по меньшей мере 25% положительной экспрессией GPC3 при умеренной интенсивности будут отвечать на Т-клетки с CAR для BZ GPC3-1.

[069] **Фигура 21. Определение относительной поверхностной экспрессии GPC3.** FSC: прямое рассеяние. APC: аллофиикоцианин. MFI: средняя интенсивность флуоресценции. Частота GPC3 при каждом гейтировании показана на точечном графике слева (12,7, 24 и 9,34% соответственно). На гистограмме справа показана экспрессия GPC3 в отсортированных популяциях, что подтверждает чистоту и гомогенность.

[070] **Фигура 22. Цитокиновый ELISA после 24-часового воздействия BZ GPC3-1.** Результаты показаны только для Т-клеток, клеток A375 (GPC3-отрицательных) и экспрессирующих GPC3 при низком, среднем и высоком уровнях экспрессии. Результаты показаны слева направо на каждой панели для каждого типа клеток в порядке, указанном в подписях сверху вниз. UT: нетрансдуцированные Т-клетки. TZ и BZ, TZ GPC3-1 и BZ GPC3-1.

[071] **Фигура 23. Гамма-интерферон (IFN γ) в различных типах клеток после обработки Т-клеток с CAR.** Используемые конструкции показаны на оси x. Результаты показаны слева направо для каждой конструкции для каждого типа клеток в порядке,

указанном в подписях сверху вниз. TZ, TZ GPC3-1. UT: нетрансдуцированные Т-клетки. Среда, обработка только клеточной средой.

[072] Фигура 24. Уровни цитокинов в типах клеток нервной ткани после обработки с помощью Т-клеток с CAR для GPC3-1. Используемые конструкции показаны на оси x. Результаты показаны слева направо для каждой конструкции для каждого типа клеток в порядке, указанном в подписях сверху вниз. UT: нетрансдуцированные Т-клетки. Среда, обработка только клеточной средой.

[073] Фигура 25. Объем опухоли при лечении с использованием Т-клеток с CAR и антител к CRS, ассоциированных с цитокинами. CRS = синдром высвобождения цитокинов. Вверху: объем опухоли при лечении с помощью различных схем CAR и антител. Внизу: исследования отдельных субъектов при лечении с помощью BZ GPC3-1 + PBS, BZ GPC3-1 + антитело к IL-6 и BZ GPC3-1 + антитело к TNF- α . MEDI7028 представляет собой BZ GPC3-1. ACT: адаптивная Т-клеточная терапия. UT: нетрансдуцированные Т-клетки. PBS: фосфатно-солевой буфер.

[074] Фигуры 26А-26С. Исследование более высоких доз Т-клеток с CAR и лечения с помощью антител к TNF α на модели резистентной НСС (Huh7). Антитела к TNF α можно использовать для ослабления токсичности и повышения противоопухолевой активности при более высоких дозах Т-клеток с CAR. Используемые конструкции показаны в подписях справа. **26А:** схема исследования. BW: вес тела. **26В:** рост опухоли. i.v.: внутривенно. **26С.** Изменение веса тела.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

1. Определения

[075] Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значение, обычно понятное специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Следующие литературные источники обеспечивают специалиста в данной области общим определением многих терминов, используемых в настоящем изобретении: Singleton, et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger, et al. (eds.), Springer Verlag (1991) и Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Как используется в данном документе, следующие термины имеют значения, приписываемые им ниже, если не указано иначе.

[076] Как используется в данном документе, термины "содержать" и "включать" и их варианты (например, "содержит", "содержащий", "включает" и "включающий") следует

понимать как обозначающие включение указанного компонента, признака, элемента, или стадии, или группы компонентов, признаков, элементов или стадий, но не исключение любого другого компонента, признака, элемента, или стадии, или группы компонентов, признаков, элементов или стадий. Любой из терминов "содержащий", "состоящий по существу из" и "состоящий из" могут заменяться любым из двух других терминов, сохраняя при этом их обычные значения.

[077] Используемые здесь формы единственного числа включают ссылки во множественном числе, если контекст явно не указывает на иное.

[078] Процентные значения, раскрытые в данном документе, могут варьироваться в пределах ± 10 , 20 или 30% от раскрытых значений и остаются в рамках предусмотренного раскрытия.

[079] Если не указано иное или иное не очевидно из контекста и не понимается специалистом обычной квалификации в данной области техники, то значения в данном документе, которые выражены в виде диапазонов, могут принимать любое конкретное значение или поддиапазон в пределах указанных диапазонов в различных вариантах осуществления настоящего изобретения, вплоть до десятых долей единицы нижнего предела диапазона, если контекст явно не предусматривает иное.

[080] Используемые в данном документе диапазоны и количества могут быть выражены как "приблизительно" конкретное значение или диапазон. Термин "приблизительно" также включает точное количество. Например, "приблизительно 5%" означает "приблизительно 5%", а также "5%". Термин "приблизительно" также может относиться к $\pm 10\%$ от заданного значения или диапазона значений. Следовательно, приблизительно 5% также означает, например, 4,5-5,5%. Если иное не очевидно из контекста, все числовые значения, представленные в данном документе, модифицированы с помощью термина "приблизительно".

[081] Как используется в данном документе, термины "или" и "и/или" могут описывать несколько компонентов в комбинации или исключая друг друга. Например, "x, y, и/или z" может относиться только к "x", только к "y", только к "z", "x, y и z", "(x и y) или z" "x или (y и z)" или "x, или y, или z".

[082] Как используется в данном документе, термин "полипептид" относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любой цепи или цепям из двух или более аминокислот. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок", "аминокислотная цепь" или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот, включены

в определение "полипептида", и термин "полипептид" можно использовать вместо любого из этих терминов или взаимозаменяемо с любым из них.

[083] Как используется в данном документе, "белок" может относиться к отдельному полипептиду, т. е. отдельной аминокислотной цепи, как определено выше, но также может относиться к двум или более полипептидам, связанным, например, с помощью дисульфидных связей, водородных связей или гидрофобных взаимодействий с образованием мультимерного белка.

[084] "Выделенное" вещество, например выделенная нуклеиновая кислота, представляет собой вещество, которое не находится в своем естественном окружении, хотя оно не обязательно является очищенным. Например, выделенная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая не вырабатывается или не находится в своем нативном или естественном окружении, таком как клетка. Выделенное вещество может быть отделено, фракционировано или по меньшей мере частично очищено с помощью любой подходящей методики.

[085] Как используется в данном документе, термины "антитело" и "его антигенсвязывающий фрагмент" относятся к по меньшей мере минимальной части антитела, способной связываться с конкретным антигеном, на который нацелено антитело, например, с по меньшей мере некоторыми из определяющих комплементарность областей (CDR) переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL) в контексте типичного антитела, вырабатываемого В-клеткой. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой поликлональные, моноклональные, человеческие, гуманизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитопсвязывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, Fv с дисульфидными связями (sdFv), фрагменты, содержащие домен VL или VH либо отдельно, либо в сочетании с частью противоположного домена (например, всего домена VL и частичного домена VH с одной, двумя или тремя CDR) и фрагменты, полученные с помощью экспрессионной библиотеки Fab. Молекулы scFv известны из уровня техники и описаны, например, в патенте США № 5892019. Молекулы антител, охватываемые настоящим изобретением, могут быть получены из любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина.

[086] Как используется в данном документе, термин "полинуклеотид" включает одну нуклеиновую кислоту, а также несколько нуклеиновых кислот и относится к выделенной молекуле или конструкции нуклеиновой кислоты, например, матричной РНК

(mRNA) или плазмидной ДНК (pDNA). Термин "нуклеиновая кислота" включает любой тип нуклеиновой кислоты, такой как ДНК или РНК.

[087] Как используется в данном документе, термин "вектор" может относиться к молекуле нуклеиновой кислоты, введенной в клетку-хозяина, в результате чего образуется трансформированная клетка-хозяин. Вектор может содержать последовательности нуклеиновой кислоты, которые обеспечивают его репликацию в клетке-хозяине, такие как точка начала репликации. Вектор также может содержать один или несколько генов селективируемых маркеров и другие генетические элементы, известные из уровня техники. Конкретные типы векторов, рассматриваемых в данном документе, могут быть ассоциированы с вирусами или включены в них для облегчения трансформации клеток.

[088] "Трансформированная" клетка или "клетка-хозяин" представляет собой клетку, в которую с помощью методик молекулярной биологии была введена молекула нуклеиновой кислоты. Все методики, с помощью которых молекула нуклеиновой кислоты может быть введена в такую клетку, включая трансфекцию вирусными векторами, трансформацию плазмидными векторами и введение "оголенной" ДНК с помощью электропорации, липофекции и ускорения частиц генной пушкой, предусмотрены в данном документе.

[089] Как используется в данном документе, термин "аффинность" относится к мере силы связывания антигена или мишени (такой как эпитоп) с его родственным связывающим доменом (таким как паратоп). Как используется в данном документе, термин "авидность" относится к общей стабильности комплекса между популяцией эпитопов и паратопов (т. е. антигенов и антигенсвязывающих доменов).

[090] Как используется в данном документе, термины "лечить", "лечение" или "лечение чего-либо" при использовании в контексте лечения рака относятся к ослаблению патологии заболевания, ослаблению или устранению симптомов заболевания, повышению показателей выживаемости и/или уменьшению дискомфорта. Например, лечение может относиться к способности терапевтического препарата при введении субъекту ослаблять симптомы, признаки или причины заболевания. Лечение также относится к смягчению или уменьшению интенсивности по меньшей мере одного клинического симптома, и/или к ингибированию либо задержке прогрессирования состояния, и/или к предупреждению либо задержке начала проявления заболевания или болезни.

[091] Как используется в данном документе, термины "субъект", "индивидуум" или "пациент" относятся к любому субъекту, в частности к субъекту-млекопитающему, для которого требуются диагноз, прогнозирование или терапия. Субъекты-млекопитающие включают, например, людей, приматов, отличных от человека, собак,

кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот, медведей и т. д.

[092] Как используется в данном документе, термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" вводимого терапевтического вещества, такого как Т-клетки с CAR, представляет собой количество, достаточное для достижения конкретно заявленной или предполагаемой цели, такой как осуществление лечения или лечение рака. "Эффективное количество" в отношении поставленной задачи можно определить эмпирическим путем обычным способом.

2. *Общий обзор*

[093] Настоящее изобретение направлено на композиции и способы лечения рака посредством клеточной терапии с использованием химерных антигенных рецепторов (CAR). Более конкретно, настоящее изобретение относится к методам терапии с использованием клеток с CAR, в которой трансформированные клетки, такие как Т-клетки, экспрессируют CAR, нацеленные на глипикан-3 (GPC3). Кроме того, конструкции с CAR, трансформированные клетки, экспрессирующие эти конструкции, и методы терапии с использованием трансформированных клеток, раскрытые в данном документе, могут обеспечить надежные способы лечения рака с минимальным риском синдрома высвобождения цитокинов (CRS) или неизбирательного высвобождения цитокинов в неспецифических GPC3-экспрессирующих клетках.

[094] Без ограничения какой-либо теорией считается, что GPC3 является жизнеспособной раковой мишенью во многих модальностях, включая биспецифические активаторы Т-клеток, CAR-клетки, а также моноклональные антитела и конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC). Онкофетальный антиген GPC3 представляет собой GPI-связанный протеогликан сульфата гепарина. GPC3 стабилизирует взаимодействие Wnt-Fzd, стимулируя передачу сигналов Wnt. GPC3 конкурирует с Patched за связывание с Hh, ослабляя подавление Smoothed и индуцируя разрушение GPC3. Было показано, что оба пути стимулируют рост гепатоцеллюлярной карциномы (HCC). Было показано, что уровни экспрессии GPC3 коррелируют со стадией и степенью HCC.

[095] Кроме того, считается, что GPC3 является многообещающей мишенью для терапии с использованием клеток с CAR. Следовательно, антитела и конструкции с CAR, полученные от этих антител, были разработаны, как описано в данном документе.

3. *Схема конструкции с CAR*

[096] Конструкции с CAR по настоящему изобретению могут иметь несколько компонентов, многие из которых могут быть отобраны на основе требуемой или

уточненной функции конструкции с CAR, полученной в результате. В дополнение к антигенсвязывающему домену конструкции с CAR могут иметь спейсерный домен, шарнирный домен, домен сигнального пептида, трансмембранный домен и один или несколько костимулирующих доменов. Отбор одного компонента по сравнению с другим (т. е. отбор конкретного костимулирующего домена из одного рецептора по сравнению с костимулирующим доменом из другого рецептора) может влиять на клиническую эффективность и профили безопасности.

4. Антигенсвязывающий домен

[097] Предусмотренные в данном документе антигенсвязывающие домены могут включать антитела или один или несколько их антигенсвязывающих фрагментов. Одна предусмотренная конструкция с CAR, нацеленная на GPC3, содержит одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий переменные области легкой и тяжелой цепей из одного или нескольких антител, специфических в отношении GPC3, которые либо непосредственно связаны друг с другом, либо связаны друг с другом посредством гибкого линкера (например, повтора GGGGS, имеющего 1, 2, 3 и больше повторов).

[098] Антигенсвязывающий домен CAR, нацеленный на GPC3, как раскрыто в данном документе, может различаться по своей аффинности связывания с белком GPC3. Взаимосвязь между аффинностью связывания и эффективностью может быть более тонкой в контексте CAR по сравнению с антителами, для которых обычно требуется более высокая аффинность. Например, доклинические исследования рецептора, представляющего собой тирозинкиназоподобный орфанный рецептор 1 (ROR1)-CAR, полученного из высокоаффинного scFv (с константой диссоциации 0,56 нМ), привели в результате к увеличению терапевтического индекса по сравнению с низкоаффинным вариантом. Наоборот, сообщалось о других примерах того, что конструирование scFv для более низкой аффинности улучшает распознавание среди клеток с различной плотностью антигена. Это может быть полезно для улучшения терапевтической специфичности антигенов, дифференциально экспрессируемых в опухолевых тканях по сравнению с нормальными.

[099] Для определения аффинности связывания антигенсвязывающего домена можно применять различные способы. В некоторых вариантах осуществления можно использовать методики, которые исключают эффекты avidности. Эффекты avidности включают несколько антигенсвязывающих сайтов, одновременно взаимодействующих с несколькими эпитопами-мишенями, часто в мультимерных структурах. Таким образом, avidность функционально представляет собой накопленную силу множественных взаимодействий. Примером методологии, исключаящей эффекты avidности, является

любой подход, в котором один или оба взаимодействующих белка являются мономерными/моновалентными, поскольку множественные одновременные взаимодействия невозможны, если один или оба партнера содержат только один участок взаимодействия.

5. Спейсерный домен

[0100] Конструкция с CAR по настоящему изобретению может содержать спейсерный домен для обеспечения конформационной свободы для облегчения связывания с целевым антигеном на клетке-мишени. Оптимальная длина спейсерного домена может зависеть от близости связывающего эпитопа к поверхности клетки-мишени. Например, для ближних эпитопов могут потребоваться более длинные спейсеры, а для дальних эпитопов могут потребоваться более короткие. Помимо стимулирования связывания CAR с целевым антигеном, достижение оптимального расстояния между клеткой с CAR и раковой клеткой может также помочь стерически окклюзировать более крупные ингибирующие молекулы из иммунологического синапса, образованного между клеткой с CAR и раковой клеткой-мишенью. CAR, нацеленный на GPC3, может иметь длинный спейсер, промежуточный спейсер или более короткий спейсер. Длинные спейсеры могут включать домен CH₂CH₃ (~220 аминокислот) иммуноглобулина G1 (IgG1) или IgG4 (либо нативный, либо с модификациями, обычными для терапевтических антител, такими как мутация S228P), тогда как область CH₃ может использоваться сама по себе для конструирования промежуточного спейсера (~120 аминокислот). Более короткие спейсеры могут быть получены из сегментов (< 60 аминокислот) CD28, CD8 α , CD3 или CD4. Короткие спейсеры также могут быть получены из шарнирных областей молекул IgG. Эти шарнирные области могут быть получены из любого изотипа IgG и могут содержать или не содержать мутации, обычные для терапевтических антител, такие как упомянутая выше мутация S228P.

6. Шарнирный домен

[0101] CAR, нацеленный на GPC3, также может иметь шарнирный домен. Гибкий шарнирный домен

представляет собой короткий пептидный фрагмент, который обеспечивает конформационную свободу для облегчения связывания с целевым антигеном на опухолевой клетке. Его можно использовать отдельно или в сочетании со спейсерной последовательностью. Термины "шарнир" и "спейсер" часто используются взаимозаменяемо, например, последовательности IgG4 можно рассматривать как "шарнирные" и "спейсерные" последовательности (т. е. последовательности шарнир/спейсер).

[0102] CAR, нацеленный на GPC3, может дополнительно включать последовательность, содержащую сигнальный пептид. Сигнальные пептиды побуждают клетку перемещать CAR к клеточной мембране. Примеры включают сигнальный полипептид тяжелой цепи IgG1, сигнальные пептиды легкой цепи Ig каппа или лямбда, сигнальный пептид рецептора 2 гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSFR2 или CSFR2), сигнальный полипептид CD8 α или сигнальный пептид CD33.

7. Трансмембранный домен

[0103] CAR, нацеленный на GPC3, может дополнительно включать последовательность, содержащую трансмембранный домен. Трансмембранный домен может включать гидрофобную α -спираль, которая охватывает клеточную мембрану. Свойства трансмембранного домена не были изучены столь тщательно, как другие аспекты конструкций с CAR, однако они потенциально могут влиять на экспрессию CAR и связывание с эндогенными мембранными белками. Трансмембранные домены могут быть получены, например, из CD4, CD8 α или CD28.

8. Костимулирующий домен

[0104] CAR, нацеленный на GPC3, может дополнительно включать одну или несколько последовательностей, образующих костимулирующий домен. Костимулирующий домен представляет собой домен, способный усиливать или модулировать ответную реакцию иммунных эффекторных клеток. Костимулирующие домены могут включать последовательности, например, из одного или нескольких CD3-дзета (или CD3z), CD28, 4-1BB, OX-40, ICOS, CD27, GITR, CD2, IL-2R β и MyD88/CD40. Выбор костимулирующего домена влияет на фенотип и метаболическую сигнатуру клеток с CAR. Например, костимуляция CD28 дает мощный, но недолговечный эффектор-подобный фенотип с высокими уровнями цитолитической способности, секреции интерлейкина-2 (IL-2) и гликолиза. Напротив, T-клетки, модифицированные с помощью CAR, несущих костимуляторные домены 4-1BB, имеют тенденцию к увеличению количества и сохранению *in vivo* дольше, имеют повышенный окислительный метаболизм, менее склонны к истощению и имеют повышенную способность создавать T-клетки центральной памяти.

9. Клетки

[0105] Виды терапии на основе клеток с CAR могут использоваться с различными типами клеток, такими как лимфоциты. Конкретные типы клеток, которые можно использовать, включают T-клетки, естественные клетки-киллеры (NK), естественные T-клетки-киллеры (NKT), инвариантные естественные T-клетки-киллеры (iNKT), альфа-

бета-T-клетки, гамма-дельта-T-клетки, вирусоспецифические T-клетки (VST), цитотоксические T-лимфоциты (CTL) и регуляторные T-клетки (Treg). В одном варианте осуществления клетки с CAR для лечения субъекта являются аутологичными. В других вариантах осуществления клетки с CAR могут происходить от генетически сходного, но неидентичного донора (аллогенного).

10. Получение клеток с CAR

[0106] Конструкции с CAR по настоящему изобретению могут включать некоторую комбинацию модульных компонентов, описанных в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конструкция с CAR содержит антигенсвязывающий домен scFv для GPC3-1. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен scFv для GPC3-2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конструкция с CAR содержит сигнальный пептид CSFR2. В некоторых вариантах осуществления конструкция с CAR содержит шарнирный/спейсерный домен IgG4P, несущий мутацию S228P. В некоторых вариантах осуществления конструкция с CAR содержит трансмембранный CD28.

[0107] В конструкциях с CAR по настоящему изобретению могут использоваться различные костимулирующие домены. В некоторых вариантах осуществления конструкция с CAR содержит костимулирующий домен из внутриклеточного домена CD3z. В некоторых вариантах осуществления конструкция с CAR содержит костимулирующий домен CD28. В некоторых вариантах осуществления конструкция с CAR содержит костимулирующий домен 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления конструкция с CAR содержит костимулирующие домены из CD3z и CD28. В некоторых вариантах осуществления конструкция с CAR содержит костимулирующие домены из CD3z и 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления конструкция с CAR содержит костимулирующие домены из всех CD3z, CD28 и 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления конструкция с CAR содержит костимулирующие домены из ICOS, OX-40 и/или GITR.

11. Оценка конструкции с CAR

[0108] Конструкции по настоящему изобретению сравнивали и оценивали на основе безопасности, а также персистенции и обеспечения центральной памяти. scFv с более низкой аффинностью (высокой скоростью диссоциации), GPC3-1, оценивался положительно из-за его повышенной безопасности. Костимулирующие домены 4-1BB и CD3z (оба в одной и той же конструкции) оценивались положительно на основании их вклада в улучшенную персистенцию и благоприятный фенотип *in vivo* (более центральная память). CAR для GPC3-1 и GPC3-2 по настоящему изобретению выгодно отличаются от

конструкций на основе опубликованных GPC3-нацеленных CAR. Подробности в отношении оценки можно найти в примерах.

12. Варианты осуществления

[0109] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR). CAR содержит антигенсвязывающий домен, специфический в отношении глипикана 3 (GPC3). Антигенсвязывающий домен характеризуется равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей приблизительно 100 наномоль/л (нМ) или меньше, и конструкция с CAR не индуцирует выработку цитокинов в GPC3-клетках. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Антигенсвязывающий домен может представлять собой Fab или одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой scFv, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

[0110] В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно включает трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен. Трансмембранный домен может представлять собой трансмембранный домен CD28. Костимулирующий домен может представлять собой один или несколько из костимулирующих доменов CD28, 4-1BB, CD3-дзета, OX-40, ICOS, CD27, GITR и MyD88/CD40. В одном конкретном варианте костимулирующий домен представляет собой один или несколько из костимулирующих доменов CD28, 4-1BB и CD3-дзета. Сигнальный домен может представлять собой последовательность, кодирующую сигнальный пептид CSFR2.

[0111] В некоторых вариантах осуществления выделенная последовательность нуклеиновой кислоты может включать шарнирный/спейсерный домен. Шарнирный/спейсерный домен может представлять собой шарнирный/спейсерный домен IgG4P.

[0112] В некоторых конкретных вариантах осуществления выделенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный антигенный рецептор (CAR), может иметь последовательность под SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, или SEQ ID NO: 26.

[0113] В других вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает химерный антигенный рецептор (CAR) для GPC3, включающий антигенсвязывающий

домен. Антигенсвязывающий домен может представлять собой антитело, Fab или scFv, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL). В некоторых вариантах осуществления VH может содержать CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления VL может содержать CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 44, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 45.

[0114] В некоторых вариантах осуществления VH может представлять собой аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 29, и VL может представлять собой аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно может содержать трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен.

[0115] В некоторых конкретных вариантах осуществления CAR для GPC3 может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, или SEQ ID NO: 25.

[0116] В других вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR). Последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 33, или SEQ ID NO: 34.

[0117] В других вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, содержащую вектор, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 33, или SEQ ID NO: 34.

[0118] В других вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит антигенсвязывающий домен, специфический в отношении глипикана 3 (GPC3), где антигенсвязывающий домен

характеризуется равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей приблизительно 100 наномоль/л (нМ) или меньше, и где конструкция с CAR не индуцирует выработку цитокинов в клетках GPC3. Например, последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 33, или SEQ ID NO: 34.

[0119] В других вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор (CAR) для GPC3 на своей внеклеточной поверхности. CAR может содержать антигенсвязывающий домен, который может представлять собой антитело, Fab или scFv, каждый из которых содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL). VH может включать CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39. VL может включать CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 44, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 45.

[0120] В некоторых вариантах осуществления VH может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления VL может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 30. CAR может дополнительно включать трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен. Клетка экспрессирует CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, или SEQ ID NO: 25.

[0121] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает Т-клетку, естественную клетку-киллер (NK), цитотоксический Т-лимфоцит (CTL) и/или регуляторную Т-клетку, которые экспрессируют CAR на своей внеклеточной поверхности, и при этом CAR может содержать аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, или SEQ ID NO: 25. Такие клетки могут проявлять противоопухолевый иммунитет при контакте с опухолевой клеткой, экспрессирующей GPC3.

13. Лечение рака с помощью CAR

[0122] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает клетки с CAR для лечения рака. Композиции (например, антитела, конструкции с CAR и клетки с CAR) и способы их применения, описанные в данном документе, особенно полезны для подавления роста или распространения неопластических клеток; особенно роста неопластических клеток, в котором играет роль GPC3.

[0123] Новообразования, поддающиеся лечению с помощью композиций по настоящему изобретению, включают солидные опухоли, например, опухоли печени, легкого или яичника. Тем не менее, формы рака, перечисленные в данном документе, не предназначены для ограничения. Например, типы рака, которые предусмотрены для лечения в данном документе, включают, например, NSCLC, солидные злокачественные образования на поздней стадии, новообразования желчевыводящих путей, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, новообразования пищевода, плоскоклеточную карциному пищевода, обширную стадию мелкоклеточного рака легкого, аденокарциному желудка, рак желудка, рак желудочно-пищеводного перехода, рак головы и шеи, плоскоклеточную карциному головы и шеи, гепатоцеллюлярную карциному, лимфому Ходжкина, рак легкого, меланому, мезотелиому, метастатическую светлоклеточную карциному почки, метастатическую меланому, метастатическую некожную меланому, множественную миелому, новообразования носоглотки, неходжкинскую лимфому, рак яичника, рак маточной трубы, перитонеальные новообразования, мезотелиому плевры, новообразования предстательной железы, рецидивирующий или метастатический PD-L1, положительный или отрицательный SCCHN, рецидивирующий плоскоклеточный рак легкого, почечно-клеточный рак, почечно-клеточную карциному, SCCHN, гипофарингеальную плоскоклеточную карциному, плоскоклеточную карциному гортани, мелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточную карциному головы и шеи, плоскоклеточную карциному легкого, TNBC, переходо-клеточную карциному, неоперабельную или метастатическую меланому, уротелиальный рак и уротелиальную карциному.

[0124] В одном варианте осуществления предусмотренные для лечения формы рака включают любые из них, которые экспрессируют GPC3 на клеточных поверхностях раковых клеток. В одном конкретном примере формы рака, предусмотренные для лечения в данном документе, включают гепатоцеллюлярную карциному, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника и плоскоклеточную карциному легкого.

14. Способы лечения

[0125] CAR-модифицированные клетки по настоящему изобретению, такие как T-клетки с CAR, можно вводить отдельно или в виде фармацевтической композиции с разбавителем и/или другими компонентами, ассоциированными с цитокинами или клеточными популяциями. Вкратце, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут включать, например, T-клетки с CAR, как описано в данном документе, с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный солевой раствор, забуференный солевой раствор и т. п.; сульфаты; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки, полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как EDTA или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть адаптированы для лечения (или профилактики).

[0126] CAR-модифицированные клетки также можно вводить в сочетании с одним или несколькими дополнительными видами терапии. В одном варианте осуществления дополнительные виды терапии могут включать применение антител к цитокинам. Например, одно или несколько антител к TNF α можно использовать для ослабления токсичности и повышения противоопухолевой активности при более высоких дозах T-клеток с CAR, что может быть связано с CRS-подобными симптомами и потерей веса.

[0127] В конкретном варианте осуществления рассматриваемая схема лечения может включать один или несколько биологических компонентов, таких как T-клетка с CAR и противораковое антитело и/или химиотерапевтический компонент. Например, предусмотренная схема лечения может дополнительно включать ингибитор иммунных контрольных точек (ICI), например, такой, который нацелен на ось PD-1/PD-L1 (PDX), и другие иммуноонкологические (ИО) виды лечения, такие как применение агонистов иммунной системы.

[0128] Предусмотренные антитела включают антитела к PD-L1, такие как дурвалумаб (MEDI4736), авелумаб, атезолизумаб, KNO35, антитело к PD-1, такое как ниволумаб, пембролизумаб, REGN2810, SHR1210, IBI308, PDR001, антитело к PD-1, BGB-A317, BCD-100 и JS001, а также антитело к CTLA4, такое как тремелимумаб или ипилимумаб. В данном документе также предусмотрены дополнительные антитела. В данном документе также предусмотрены любые терапевтически эффективные части антител.

[0129] Информацию, касающуюся дурвалумаба (или его фрагментов) для применения в способах, предусмотренных в данном документе, можно найти в патентах

США №№ 8779108, 9493565 и 10400039, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте. В конкретном аспекте дурвалумаб или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способах, предусмотренных в данном документе, содержат последовательности CDR варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи антитела 2.14H9OPT, как описано в вышеупомянутых патентах США.

[0130] Информацию относительно тремелидумаба (или его антигенсвязывающих фрагментов) для применения в способах, предусмотренных в данном документе, можно найти в патенте США № 6682736 (в котором тремелидумаб обозначен как 11.2.1), раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0131] Дополнительные терапевтические средства (химиотерапевтические или биологические препараты), рассматриваемые в данном документе, включают без ограничения цисплатин/гемцитабин или метотрексат, винбластин, ADRIAMYCIN™ (доксорубицин), цисплатин (MVAC), схему на основе карбоплатина или таксан или гемцитабин в виде отдельного средства, темозоломид или дакарбазин, винфлунин, доцетаксел, паклитаксел, наб-паклитаксел, вемурафениб, эрлотиниб, афатиниб, цетуксимаб, бевацизумаб, эрлотиниб, gefитиниб и/или пеметрексед. Дополнительные примеры включают лекарственные средства, нацеленные на системы восстановления повреждений ДНК, такие как ингибиторы поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 (PARP1), и терапевтические средства, ингибирующие активность протеинкиназы WEE1, активность протеинкиназы ATR, активность протеинкиназы ATM, активность протеинкиназы Auroга В и активность ДНК-РК.

[0132] Любые терапевтические композиции или способы, предусмотренные в данном документе, можно комбинировать с одной или несколькими из любых других терапевтических композиций и способов, предусмотренных в данном документе.

[0133] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества клеток, содержащих химерный антигенный рецептор (CAR) для GPC3, содержащий антигенсвязывающий домен. Антигенсвязывающий домен может представлять собой антитело, Fab или scFv, содержащие варибельную область тяжелой цепи (VH) и варибельную область легкой цепи (VL). VH может включать CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39. VL может

включать CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 44, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно подавляет рост опухоли, вызывает регрессию опухоли и/или продлевает выживаемость у субъекта.

[0134] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аутологичную клетку. Например, аутологичная клетка может быть выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), цитотоксического Т-лимфоцита (CTL) и регуляторной Т-клетки.

[0135] В некоторых вариантах осуществления рак, подлежащий лечению данным способом, представляет собой солидную опухоль. Например, рак может представлять собой гепатоцеллюлярную карциному, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника и/или плоскоклеточную карциному легкого. В конкретном варианте осуществления рак представляет собой гепатоцеллюлярную карциному.

[0136] В настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества клеток, содержащих химерный антигенный рецептор (CAR) для GPC3, и эффективного количества антитела к TNF α .

[0137] Следует понимать, что конкретные аспекты описания, описанные в данном документе, не ограничены конкретными представленными вариантами осуществления и могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для цели описания конкретных аспектов, и если она специально не определена в данном документе, то не предназначена для ограничения. Кроме того, раскрытые в данном документе конкретные варианты осуществления могут быть объединены с другими раскрытыми в данном документе вариантами осуществления, что признавалось бы специалистом в данной области техники, без ограничения.

ПРИМЕРЫ

[0138] Следующие примеры являются иллюстративными для конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения и различных путей их применения. Они изложены исключительно в пояснительных целях и не должны истолковываться как каким-либо образом ограничивающие объем настоящего изобретения. Описание терминов представлено в таблице 1.

[0139] **Таблица 1. Описание терминов**

Термин	Описание
GPC3-1	scFv антитела к GPC3 (более низкая аффинность)
GPC3-2	scFv антитела к GPC3 (более высокая аффинность)
GPC3-4	Ранее раскрытый scFv антитела к GPC3 (UPenn)
GPC3-3	Ранее раскрытый scFv антитела к GPC3 (Baylor)
BZ	Внутриклеточный домен CAR с двумя костимулирующими доменами 4-1BB и CD3-дзета
TZ	Внутриклеточный домен CAR с укороченным сигнальным доменом CD3-дзета (действующим как сигнальный некомпетентный контроль)
28Z	Внутриклеточный домен CAR с двумя костимулирующими доменами CD28 и CD3-дзета
28BZ	Внутриклеточный домен CAR с тремя костимулирующими доменами CD28, 4-1BB и CD3-дзета
GPC3-1 BZ (MEDI7028)	CAR с scFv для GPC3-1, сигнальным пептидом CSFR2, шарнирной областью IgG4P и костимулирующими доменами 4-1BB и CD3z
GPC3-2 BZ	CAR с scFv для GPC3-2, сигнальным пептидом CSFR2, шарнирной областью IgG4P и костимулирующими доменами 4-1BB и CD3z
CSFR2	Сигнальный пептид, используемый во всех конструкциях с CAR
IgG4P	Шарнирная последовательность, используемая во всех конструкциях с CAR
Hep3B	Модель гепатоцеллюлярной карциномы
Huh7	Модель резистентной гепатоцеллюлярной карциномы (HCC)

Пример 1. Экспрессия GPC3

Способы

[0140] В ИHC GPC3 использовали мышинное моноклональное антитело GC33 к человеческому GPC3 (Ventana). Вторичное окрашивание выполняли с использованием антитела к HRP мыши. Микроматрицы тканей человека (TMA, US Biomax), представляющие гепатоцеллюлярную карциному (HCC), немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) и рак яичника или ткань ганглия толстой кишки человека, окрашивали в отношении экспрессии GPC3, а интенсивность и характер окрашивания определяли с помощью микроскопии.

Результаты

[0141] GPC3 сверхэкспрессировался в 80% случаев HCC, в 30% случаев плоскоклеточной карциномы легкого и в 47% случаев светлоклеточной карциномы яичника. Однако GPC3 не выявлялся с помощью иммуногистохимии в нормальной ткани печени, включая образцы с циррозом и гиперплазией, и характеризовался низкой экспрессией в нормальных тканях (например, легком). См. **фигуры 1А и 1В**.

Пример 2. Разработка и исследования аффинность к scFv.

Краткое описание

[0142] В примере настоящего изобретения были разработаны scFv антител к GPC3 и были определены их относительные показатели аффинности к GPC3.

Способы

[0143] GPC3-1 (SEQ ID NO: 1) и GPC3-2 (SEQ ID NO: 2) содержат почти идентичный домен V_H (SEQ ID NOS: 27 и 29), но другой домен V_L (SEQ ID NOS: 28 и 30; см. фигуру 2). GPC3-2 содержит полностью зародышевый каркас, тогда как GPC3-1 – не содержит.

[0144] Кажущуюся аффинность связывания определяли по связыванию на клеточной поверхности растворимого рекомбинантного белка GPC3 с CAR для GPC3-1 и GPC3-2, экспрессированными на поверхности клеток Jurkat. Осуществляли экспрессию конструкций с CAR на поверхности клеток Jurkat с использованием лентивирусных векторов. Клетки окрашивали рекомбинантным His-меченым белком GPC3 в различных концентрациях (системы R&D). Связанный GPC3 визуализировали путем окрашивания флуоресцентно конъюгированным вторичным антителом к His-метке и клетки анализировали с помощью проточной цитометрии. Кривые связывания согласовывали с простой моделью с одним участком связывания для определения кажущейся K_D .

[0145] Альтернативную меру аффинности связывания определяли с использованием системы поверхностного плазмонного резонанса VIAcore и слитых белков scFv-Fc GPC3-1 и GPC3-2. Очищенные слитые молекулы scFv-Fc GPC3-1 и GPC3-2 ковалентно связывали с сенсорным чипом SPR, реагирующим с амином (CM5, GE Healthcare). Для GPC3-1 над поверхностью чипа пропускали растворимый белок GPC3 (R&D Systems) при концентрациях 14, 28, 57, 114 и 228 нМ со скоростью 30 мкл/мин. и контролировали взаимодействие. Для GPC3-2 концентрации 4, 7, 14, 28 и 57 нМ пропускали с той же скоростью потока. Данные сопоставляли с использованием программного обеспечения VIAevaluation (GE Healthcare) и простой модели связывания Ленгмюра 1:1 с глобальным соответствием R_{max} и локальным соответствием k_a , k_d и K_D .

Результаты

[0146] В экспериментах по оценке связывания растворимого GPC3 с CAR для GPC3-1 и GPC3-2, экспрессированными на поверхности клеток Jurkat, значения K_D составляли около 15 нМ для GPC3-1 и 5 нМ для GPC3-2 (см. фигуру 3А). В экспериментах с поверхностным плазмонным резонансом с использованием того же белка GPC3, что и для клеточного связывания, а также очищенных слитых белков scFv-Fc

GPC3-1/GPC3-2 значения K_D для GPC3-1 и GPC3-2 составляли около 73 нМ и 11 нМ соответственно. См. таблицу 1 и фигуры 3В и 3С.

[0147] **Таблица 1. Значения одновалентного связывания.**

Название клона	Одновалентное связывание (ProteOn) Растворимый HuGPC3		
	k_{on} ($M^{-1}S^{-1}$)	k_{off} (S^{-1})	K_D (нМ)
GPC3-1	$2,6 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^{-2}$	73
GPC3-2	$3,5 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^{-3}$	11

[0148] Зарегистрированные значения K_d для четырех scFv показаны в таблице 2.

[0149] **Таблица 2. Константы диссоциации (K_d).**

scFv	K_d (нМ)
GPC3-1	73
GPC3-2	11
GPC3-3	0,5
GPC3-4	12

Пример 3. Разработка и исследование *in vitro* конструкций с CAR.

Краткое описание

[0150] В примере настоящего изобретения конструкции с CAR для GPC3 были разработаны и протестированы в отношении результирующих цитокиновой активности и полифункциональности.

Способы

[0151] **Структура CAR.** Для всех конструкций с CAR использовали сигнальный пептид CSFR2 (используемый в ряде клинических стадий с использованием конструкций на основе Т-клеток с CAR). Шарнирный домен IgG4P (мутация S228P) использовали в качестве "спейсера" между scFv и мембраной, а также использовали трансмембранный домен CD28. На внутриклеточной стороне тестировали различные костимулирующие домены, включая различные комбинации костимулирующих доменов CD28, 4-1BB и CD3-дзета. Были также предприняты попытки создания конструкций с использованием костимулирующих доменов из индуцибельного костимулятора Т-клеток (ICOS), OX40 и гена, родственного семейству TNFR, индуцированного глюкокортикоидами (GITR). Последовательности для конструкций с CAR для GPC3-1 и GPC3-2 показаны в SEQ ID

NO: 3–10, и соответствующие последовательности нуклеиновых кислот показаны в **SEQ ID NO: 11–18**.

[0152] Другие известные CAR для GPC3 (на основе scFv к GPC3-3 и GPC3-4) были сконструированы для сравнения с конструкциями с CAR для GPC3-1 и GPC3-2. CAR для GPC3-3 содержал короткий шарнир IgG1, трансмембранный домен CD28, костимулирующий домен 4-1BB и внутриклеточный домен CD3-дзета. Также была разработана другая конструкция с CAR для GPC3-3, которая имеет костимулирующие домены как CD28, так и 4-1BB. Конструкция с CAR для GPC3-4 содержала шарнир IgG4P, трансмембранный домен CD28 и костимулирующий домен 4-1BB. Последовательности CAR для GPC3-3 и CAR GPC3-4 показаны в **SEQ ID NO: 19–21**, и соответствующие последовательности нуклеиновых кислот показаны в **SEQ ID NO: 22-24**.

[0153] **Получение Т-клеток с CAR.** Очищенные человеческие Т-клетки высевали в среду AIM-V, содержащую 5% сыворотки крови и 1% пенициллина-стрептомицина, в концентрации $0,2 \times 10^6$ клеток/мл + IL-2 (300 МЕ/мл). Т-клетки активировали с помощью антитела к CD3/антитела к CD28 Dynabeads (Invitrogen) и через 24 часа выполняли трансдукцию с помощью спинокуляции. В лунки добавляли лентивирус (M.O.I. 100), и планшеты центрифугировали при 2000 об./мин. при 37°C в течение 2 часов, и помещали в инкубатор при 37°C, 5% CO₂. Клетки разделяли по мере необходимости с поддержанием плотности клеток на уровне около $0,5-1 \times 10^6$ клеток/мл. Т-клетки с CAR иммунофенотипировали не ранее чем через 7 дней после трансдукции и оценивали в функциональных анализах *in vitro* и *in vivo* через примерно 11 дней после трансдукции.

[0154] **Тестирование клеточных линий.** Несколько типов клеток обрабатывали Т-клетками с CAR, содержащими различные конструкции с CAR. Для всех исследований цитокинов 5×10^4 Т-клеток с CAR культивировали совместно с клетками-мишенями при соотношении 1:1 в RPMI с 10% FCS. Через 24 часа собирали супернатанты. Цитокины анализировали с помощью набора Meso Scale Discovery 4-plex для выявления IFN- γ , IL-2, TNF- α и IL-10. Концентрации цитокинов определяли в пикограммах на миллилитр.

[0155] Исследования цитотоксичности выполняли с использованием технологии осуществления контроля клеточного сопротивления (xCELLigence). Высевали 3×10^4 клеток-мишеней и через 24 часа добавляли Т-клетки с CAR при соотношении эффектора и мишени (E:T), составляющем 3, 1 или 0,3. Нормализованный клеточный индекс определяли для клеток Hep3B, Huh7 и SNU-182 после обработки различными конструкциями с CAR. Hep3B экспрессировали высокий уровень GPC3 (14 тыс./клетка), Huh7 экспрессировали средний/низкий уровень GPC3 (7 тыс./клетка) и SNU-182 являлись отрицательными в отношении GPC3 (0/клетка).

[0156] Также проводили исследование полифункциональности конструкций с CAR. В данном документе

BZ GPC3-1 или указанные Т-клетки с CAR совместно культивировали в течение 6 часов с Her3B или A375 в присутствии Golgi Stop и меченого флуорофором антитела к маркеру дегрануляции CD107a. Взаимодействие с мишенью индуцировало дегрануляцию Т-клеток с CAR и последующее связывание флуоресцентно меченого антитела к CD107, присутствующего в культуральной среде. Накопление CD107, выявляемое с помощью проточной цитометрии, является прямо пропорциональным степени дегрануляции и свидетельствует о лизисе клетки-мишени. Поскольку клетки инкубировали в присутствии реагента Golgi Stop, то выработку эффекторных цитокинов (IFN- γ , IL-2, TNF- α) также можно было оценить с помощью внутриклеточного окрашивания. Булевы вентили, объединяющие каждую функцию (CD107a, IFN- γ , IL-2 и TNF- α), генерировали с помощью Flowtop, а круговые диаграммы результатов генерировали с помощью программного обеспечения для анализа Spice.

Результаты

[0157] В целом наблюдалась более высокая степень выхода TNF α и IL-2 для конструкций с GPC3-2 и GPC3-3 по сравнению с GPC3-1. Обработка Т-клеток с CAR конструкциями с CAR для GPC3-1 и GPC3-2 приводила к выработке антигенспецифических цитокинов. С другой стороны, конструкция BZ GPC3-4 индуцировала цитокины даже в типах клеток, которые являлись GPC3-отрицательными. Конструкции с GPC3-1 и GPC3-2 не вырабатывали цитокин в отсутствие мишени. Выработка цитокинов, по-видимому, зависела от плотности и аффинности антигенов. См. **фигуры 4А и 4В**.

[0158] Конструкции с GPC3-1 и GPC3-2 были цитотоксичны только для клеток, экспрессирующих GPC3, тогда как конструкция с GPC3-4 была цитотоксичной как для GPC3-положительных клеток (Her3B и Huh7), так и для GPC3-отрицательных клеток (SNU-182). CAR с более низкой аффинностью (GPC3-1 BZ) проявлял цитотоксичность, эквивалентную CAR с высокой аффинностью (GPC3-2 BZ). См. **фигуру 5**.

[0159] BZ GPC3-1 проявлял цитотоксичность против клеточных линий НСС, экспрессирующих низкий уровень GPC3. Все протестированные клетки-мишени были высоко восприимчивы к уничтожению посредством GPC3-1 при соотношении Е:Т 3:1 и 0,3:1, при этом уменьшение уничтожения наблюдалось только в одной из клеточных линий с более низкой экспрессией GPC3 при соотношении Е:Т 0,3:1. Однако полностью сопоставимая скорость уничтожения, наблюдаемая с изогенной парой GPC3 по настоящему изобретению, с высоким и низким содержанием клеточной линии Her3B

предполагает, что сниженная плотность антигена сама по себе не является критическим фактором, ограничивающим цитолиз, опосредованный Т-клетками с CAR. См. фиг. 6.

[0160] Т-клетки с CAR для GPC3-2 и GPC3-1 являются полифункциональными независимо от используемого внутриклеточного домена. Т-клетки с CAR для BZ GPC3-1 были полифункциональными, при этом большая часть клеток проявляла 2+ функций. Также Т-клетки с CAR для CD28 были менее полифункциональными *in vitro*, чем Т-клетки с CAR, имеющие внутриклеточный домен 4-1BB. См. **фигуру 7**.

Вывод

[0161] Лечение с помощью GPC3-1 приводило в результате к самой низкой общей выработке цитокинов из протестированных CAR. Как GPC3-1, так и GPC3-2 были полифункциональными и специфически цитотоксичными по отношению к клеткам, экспрессирующим GPC3.

Пример 4. *In vivo* исследование нескольких конструкций с CAR на животной модели гепатоцеллюлярной карциномы

Краткое описание

[0162] В настоящем примере конструкции с CAR для GPC3 тестировали *in vivo* и сравнивали эффекты в отношении веса тела, опухоли и выживаемости

Способы

[0163] 5 x 10⁶ клеток Hep3В имплантировали в бока мышей NSG (10 мышей/группа). Когда опухоли достигали среднего объема 150 мм³ мышам вводили 4 миллиона BZ GPC3-2 BZ или GPC3-1. Вес тела, объем опухоли (2х/неделя) и выживаемость контролировали. Животным, вес которых снижался до 80-90 процентов, давали пищевую добавку; животных, у которых вес падал ниже 80 процентов, подвергали эвтаназии. События, связанные с выживаемостью (случаи смерти), определялись размером опухоли, составлявшим более чем 1500 мм³. Каждый эксперимент выполняли дважды.

Результаты

[0164] Потеря веса тела наблюдалась при использовании конструкции с GPC3-2 с высокой аффинностью, но не конструкции с GPC3-1 с более низкой аффинностью, что указывало на то, что связывающее вещество с более низкой аффинностью было менее токсичным *in vivo*. Т-клетки с CAR на основе GPC3-2 не переносились в эквивалентной дозе *in vivo* для Т-клеток с CAR на основе GPC3-1. Более высокая степень токсичности BZ GPC3-2 коррелировала с обширной инфильтрацией Т-клеток с CAR в нормальное легкое

мышь. В легких мышей, обработанных BZ GPC3-1, был обнаружен только умеренный уровень инфильтрата. См. **фигуры 8А и 8В**.

[0165] Т-клетки с CAR для GPC3 индуцировали регрессию опухоли Her3В у мышей NSG. BZ GPC3-1 продемонстрировал более высокую противоопухолевую активность по сравнению с BZ GPC3-3 и BZ GPC3-4. См. **фигуру 9**.

[0166] Т-клетки с CAR для GPC3-1 и GPC3-2 продлевали выживаемость у мышей NSG с опухолями в большей степени, чем Т-клетки с CAR для GPC3-3 или GPC3-4, $p < 0,01$ по сравнению с BZ GPC3-3; вес согласно методу Каплана-Мейера / логарифмический ранговый критерий согласно Мантелю-Коксу. См. **фигуру 10**. Аналогичным образом было определено, что делеция WPRE не имела отрицательных функциональных последствий для клеток BZ GPC3-1 *in vitro* или *in vivo*.

Вывод

[0167] Из протестированных CAR для BZ GPC3-1 и BZ GPC3-2 проявляли наибольшую противоопухолевую активность и обеспечивали наибольшую пользу для выживаемости. BZ GPC3-1 проявлял меньшую токсичность и инфильтрацию в нормальные ткани, чем BZ GPC3-2.

Пример 5. *In vivo* сравнение конструкций с CAR для GPC3-1

Краткое описание

[0168] В настоящем примере несколько конструкций с CAR для GPC3-1, содержащих различные сигнальные домены, тестировали *in vivo* и сравнивали.

Способы

[0169] **Анализ в отношении дифференциации и истощения.** Были изучены дифференциация и истощение множественных конструкций с CAR для GPC3-1. Мышей с опухолями Her3В подвергали обработке с помощью Т-клеток с CAR, имеющих различные сигнальные домены (TZ = TZ GPC3-1; BZ = BZ GPC3-1; 28Z = 28Z GPC3-1), и селезенку и опухоли анализировали через 7 дней после инъекции клеток с помощью проточной цитометрии. Дифференцировку и истощение анализировали с использованием FACS, выявляющих множественные маркеры в селезенке и опухолевых клетках. Статус дифференцировки Т-клеток анализировали с помощью комбинированной экспрессии CD62L и CD45RO (CD62L+/CD45RO- = необработанные; CD62L+/CD45RO+ = центральная память; CD62L-/CD45RO+ = эффекторная память; CD62L-/CD45RO- = эффекторные клетки памяти, повторно экспрессирующие CD45RA (EMRA)). CD3% использовали как меру персистенции и увеличения количества.

[0170] Мышам инъецировали 5×10^6 клеток Нер3В с получением опухолей среднего размера, составляющего 150 мм^3 . Мышам, не несущим опухоли, или мышам с опухолями вводили дозы Нер3В, составлявшие 4 миллиона Т-клеток BZ GPC3-1 или TZ GPC3-1. Эффект в отношении веса тела как у мышей, несущих опухоль, так и у мышей, не несущих ее, измеряли в течение 35 дней после лечения. Объем опухоли также оценивали два раза в неделю. После лечения у животных периодически брали кровь для анализа IFN- γ и TNF- α в крови. Цитокины анализировали в сыворотке через 8 дней после введения доз Т-клеток с CAR. Каждый эксперимент выполняли дважды.

[0171] Для изучения потенциальной периферической нейротоксичности у мышей GPC3+, несущих опухоль (линия НСС Нер3В), и мышей NSG, не несущих опухоль, животным вводили человеческие Т-клетки с CAR для GPC3. Гистологию выполняли на опухоли и нервной ткани кишечника животных с опухолями Нер3В, получавших обработку с помощью BZ GPC3-1.

[0172] Таблица 3. План исследования

Группа	Обработка	Опухоль	Доза в день 1* (клеток $\times 10^6$)	Некропсия ^a День 15
1	Контроль, представляющий собой средуноситель	Y	0	10F
2	TZ GPC3-1**	Y	5	10F
3	BZ GPC3-1**	Y	5	10F
4	Контроль, представляющий собой средуноситель	N	0	10F
5	TZ GPC3-1**	N	5	10F
6	BZ GPC3-1	N	5	10F

^aПост-пиковая ответная реакция Т-клеток с CAR, но опухоли присутствовали до сбора; *дозу выбирали до полной регрессии опухоли Нер3В; **TZ GPC3-1 содержал функциональный связывающий фрагмент без сигнального домена; **BZ GPC3-1 содержал функциональный связывающий фрагмент и сигнальный домен.

Результаты

[0173] Т-клетки с CAR для GPC3 с сигнальными доменами 4-1BB/CD3-дзета (BZ) продемонстрировали большую центральную память и меньшее истощение, чем CD28/CD3-дзета (28Z) *in vivo*. Результаты продемонстрировали, что Т-клетки с CAR для BZ GPC3-1 в селезенке были менее дифференцированы, чем Т-клетки с CAR для 28Z GPC3-1,

сохраняя при этом способность полностью активироваться и дифференцироваться в опухоли, где присутствовал антиген. См. **фигуры 11А-11D**.

[0174] BZ GPC3-1 проявлял персистенцию. Экспрессия маркеров активации/истощения LAG3 и PD1 подтвердила, что Т-клетки с CAR для BZ GPC3-1 сохраняли меньше активированных/истощенных клеток на периферии. См. **фигуру 12**.

[0175] BZ GPC3-1 не вызывал потери веса ни у мышей с опухолью, ни у мышей без опухоли в дозах, вызывающих регрессию опухоли. См. **фигуру 13**.

[0176] Полная регрессия опухоли наблюдалась только у мышей, получавших лечение с помощью Т-клеток с CAR для BZ GPC3-1. См. **фигуру 14**.

[0177] Были выявлены минимальные уровни системных цитокинов (временное повышение IFN- γ и TNF- α , измеренное через 7 дней после инфузии в день 8). Минимальные и временные уровни системных цитокинов были выявлены при эффективных дозах Т-клеток с CAR, и потери веса при этом не наблюдалось. Человеческие IFN- γ и TNF- α были единственными цитокинами, временно выявленными при повышенных уровнях в сыворотке крови после регрессивной дозы терапевтического средства на основе CAR. Уровни дополнительных человеческих или мышинных цитокинов, включая hIL-2, mIL-10, mIL-6, mTNF α и mIFN γ , были ниже выявляемого предела (BDL). См. **фигуру 15**.

[0178] Регрессия опухоли сопровождалась обширной инфильтрацией и размножением Т-клеток в опухоли. Опухоли становились меньше вследствие уменьшения количества опухолевых клеток, были некротизированы и инфильтрированы мононуклеарными клетками. У используемых мышей отсутствовали лимфоциты; поэтому предполагалось, что любой мононуклеарный инфильтрат представлял собой человеческие Т-клетки с CAR. См. **фигуру 16**. Нервная система кишечника, которая экспрессирует только низкие уровни GPC3, оставалась неповрежденной. См. **фигуру 17**. Минимальные мононуклеарные инфильтраты наблюдались в легком и печени (данные не представлены).

Вывод

[0179] По сравнению с конструкциями с другими сигнальными доменами конструкция BZ GPC3-1 являлась персистентной, способствовала ответной реакции центральной памяти и проявляла повышенную активность против опухолей. Кроме того, лечение вызывало лишь временное повышение уровня некоторых цитокинов и не приводило к потере веса тела. После лечения опухоли были инфильтрированы Т-клетками и становились некротизированными, в то время как нормальная ткань оставалась неповрежденной.

Пример 6. Дополнительное определение характеристик Т-клеток с CAR для BZ GPC3-1

Краткое описание

[0180] В настоящем примере дополнительно определяли характеристики Т-клеток с CAR для BZ GPC3-1 при лечении различных типов опухолей и клеток с различными уровнями экспрессии GPC3. Анализировали ответную реакцию на цитокин.

Способы

[0181] Уровни цитокинов в ответной реакции на методы лечения с использованием Т-клеток с CAR для BZ GPC3-1 исследовали в типах опухолей с различными уровнями экспрессии GPC3. Иммуногистохимию также выполняли на репрезентативных ксенотрансплантатах опухолей Her3В и Huh7.

[0182] Анализ экспрессии GPC3 также выполняли на клетках внутри типа опухоли. Интенсивность окрашивания оценивали по шкале от 1-4, где 1 представляло самую низкую интенсивность, а 4 представляло самую высокую интенсивность. Интенсивность окрашивания 2 указывала на низкую/умеренную интенсивность. Относительную экспрессию относительно экспрессии GPC3 определяли с помощью FACS. Экспрессию GPC3 на клетках Her3В определяли путем окрашивания поверхности антителом к GPC3, меченым флуорофором, и последующего анализа с помощью проточной цитометрии. На основании экспрессии GPC3 клетки Her3В гейтировали как клетки с низким, средним или высоким уровнями экспрессии, и частоту GPC3 в каждом гейте наносили на график.

[0183] Уровни цитокинов определяли с помощью ELISA. Клеточные линии культивировали совместно с Т-клетками с CAR для BZ GPC3-1 в соотношении 1:1 в RPMI, 10% FCS. Через 24 часа супернатанты собирали и цитокины анализировали с помощью набора Meso Scale Discovery 4-plex для выявления IFN- γ , IL-2, TNF- α и IL-10. Перед анализом цитокинов клетки подвергали воздействию Т-клеток BZ GPC3-1 в течение 24 часов. Уровни цитокинов в различных типах клеток тестировали после обработки BZ GPC3-1.

Результаты

[0184] Выход цитокинов, индуцированный Т-клетками с CAR для BZ GPC3-1, в GPC3-экспрессирующих клеточных линиях был пропорционален поверхностной экспрессии GPC3. См. **фигуры 18–22**.

[0185] Т-клетки с CAR для BZ GPC3-1 не вызывали ответной реакции на цитокин в GPC3-отрицательной или нормальной ткани. См. **фигуры 23 и 24**.

Вывод

[0186] Т-клетки с CAR для BZ GPC3-1 индуцировали выброс цитокинов на уровнях, пропорциональных экспрессии GPC3 в клетках, получавших лечение.

Пример 7. Лечение с использованием конструкций на основе Т-клеток с CAR для GPC3-1 и антител к цитокинам

Краткое описание

[0187] В настоящем примере была предпринята попытка терапии с использованием Т-клеток с CAR для GPC3-1 в сочетании с антителами к цитокинам.

Способы

[0188] Опухоли обрабатывали различными комбинациями видов терапии с использованием Т-клеток с CAR для GPC3-1 и антител к цитокинам. Мышей с опухолями Her3B (10 мышей/группа) обрабатывали 5 миллионами клеток, трансдуцированных BZ GPC3-1 или TZ GPC3-1 (TZ = усеченный CD3-дзета, не участвующий в передаче сигналов отрицательный контроль), в присутствии или в отсутствие 100 мкг антитела к TNF α человека (голимумаб, Janssen) или антитела к IL-6 мыши (Bio X Cell).

[0189] Резистентную модель НСС, Nuh7, использовали для тестирования высоких доз ($1e7$ - $3e7$) Т-клеток с CAR для GPC3-1 в сочетании с двумя разными временными интервалами введения антитела к TNF- α . Мышей с опухолями Nuh7 (10 мышей/группа) обрабатывали указанной дозой Т-клеток BZ GPC3-1 (10 или 30 миллионов клеток), и при этом дозу 100 мкг антитела к TNF- α вводили в тот же день, что и средство для лечения на основе Т-клеток с CAR (день 0) или через два дня после начала лечения (день 2).

Результаты

[0190] Блокирование TNF- α , но не IL-6 отменяло эффективность BZ GPC3-1. См. **фигуру 25**.

[0191] Более высокие дозы Т-клеток с CAR необходимы, чтобы вызвать подавление роста опухоли в резистентной модели НСС Nuh7, однако более высокие дозы также ассоциированы с CRS-подобными симптомами и потерей веса. Потеря веса была устранена с достижением подавления роста опухоли с помощью антитела к TNF α с использованием отсроченного введения доз. См. **фигуры 26А-26С**.

Вывод

[0192] Использование лечения с помощью антитела к TNF α в сочетании с терапией с помощью BZ GPC3-1 может смягчать эффекты потери веса при терапии с использованием высоких доз Т-клеток с CAR.

[0193] Варианты осуществления, описанные в данном документе, могут применяться на практике в отсутствие какого-либо элемента или элементов, ограничения

или ограничений, которые конкретно не раскрыты в данном документе. Используемые термины и выражения используются как описательные, а не ограничительные термины, и нет намерения, чтобы при использовании таких терминов и выражений исключались какие-либо эквиваленты показанных и описанных признаков или их частей, однако при этом признается, что возможны различные модификации в пределах объема заявленных вариантов осуществления. Таким образом, следует понимать, что хотя настоящее описание было конкретно раскрыто вариантами осуществления, специалисты в данной области техники могут прибегать к необязательным признакам, модификациям и вариациям концепций, раскрытых в данном документе, и что такие модификации и вариации учтены в объеме этих вариантов осуществления, как определено описанием и прилагаемой формулой изобретения. Хотя некоторые аспекты настоящего раскрытия могут быть идентифицированы в данном документе как особенно выгодные, предполагается, что настоящее изобретение не ограничено этими конкретными аспектами настоящего изобретения.

[0194] Формула изобретения или описание, в которых содержится "или" между одним или несколькими представителями группы, считаются удовлетворенными, если один, более одного или все представители группы присутствуют в указанном продукте или способе, используются в нем или иным образом имеют отношение к нему, если не указано противоположное или иное не очевидно из контекста. Настоящее изобретение включает варианты осуществления, в которых ровно один представитель группы присутствует в указанных продукте или способе, используется в них или иным образом имеет отношение к ним. Настоящее изобретение включает варианты осуществления, в которых более одного представителя или все представители группы присутствуют в указанном продукте или способе, используются в нем или иным образом имеют отношение к нему.

[0195] Кроме того, настоящее изобретение охватывает все варианты, комбинации и перестановки, в которых одно или несколько из ограничений, элементов, пунктов и описательных терминов из одного или нескольких перечисленных пунктов формулы изобретения вводятся в другой пункт формулы. Например, любой пункт формулы изобретения, зависимый от другого пункта формулы, может быть изменен для включения одного или нескольких ограничений, обнаруженных в любом другом пункте формулы изобретения, который зависит от того же основного пункта формулы. Если элементы представлены в виде перечней, например, в формате группы Маркуша, то также раскрыта каждая подгруппа элементов, и при этом любой(-ые) элемент(-ы) можно удалить из группы.

[0196] В целом, следует понимать, что если настоящее изобретение или аспекты настоящего изобретения обозначается/обозначаются как содержащее/содержащие конкретные элементы и/или признаки, то определенные варианты осуществления настоящего изобретения или аспекты настоящего изобретения состоят или по сути состоят из таких элементов и/или признаков. Для целей упрощения, такие варианты осуществления не были конкретно изложены в данном документе в тех же выражениях.

[0197] Все патенты и публикации, упоминаемые в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждый независимый патент и публикация были конкретно и отдельно указаны как включенные посредством ссылки. Цитирование или определение любого литературного источника в каком-либо разделе настоящей заявки не должно рассматриваться как признание того, что такой литературный источник доступен в качестве предшествующего уровня техники по отношению к настоящему изобретению.

Таблица 3. Последовательности, используемые в примерах

SEQ ID NO: 1	Аминокислотная последовательность scFv GPC3-1
SEQ ID NO: 2	Аминокислотная последовательность scFv GPC3-2
SEQ ID NO: 3	Аминокислотная последовательность CAR для BZ GPC3-1
SEQ ID NO: 4	Аминокислотная последовательность CAR для TZ GPC3-1
SEQ ID NO: 5	Аминокислотная последовательность CAR для 28Z GPC3-1
SEQ ID NO: 6	Аминокислотная последовательность CAR для BZ 28 GPC3-1
SEQ ID NO: 7	Аминокислотная последовательность CAR для BZ GPC3-2
SEQ ID NO: 8	Аминокислотная последовательность CAR для TZ GPC3-2
SEQ ID NO: 9	Аминокислотная последовательность CAR для 28Z GPC3-2
SEQ ID NO: 10	Аминокислотная последовательность CAR для 28BZ GPC3-2
SEQ ID NO: 11	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для BZ GPC3-1
SEQ ID NO: 12	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для TZ GPC3-1
SEQ ID NO: 13	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для 28Z GPC3-1
SEQ ID NO: 14	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для 28BZ GPC3-1
SEQ ID NO: 15	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для BZ GPC3-2
SEQ ID NO: 16	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для TZ GPC3-2
SEQ ID NO: 17	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для 28Z GPC3-2
SEQ ID NO: 18	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для 28BZ GPC3-2
SEQ ID NO: 19	Аминокислотная последовательность CAR для BZ GPC3-3
SEQ ID NO: 20	Аминокислотная последовательность CAR для 28BZ GPC3-3
SEQ ID NO: 21	Аминокислотная последовательность CAR для BZ GPC3-4

SEQ ID NO: 22	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для BZ GPC3-3
SEQ ID NO: 23	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для 28BZ GPC3-3
SEQ ID NO: 24	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для GPC3-4
SEQ ID NO: 25	Аминокислотная последовательность CAR для BZ GPC3-1 (с удаленным WPRE)
SEQ ID NO: 26	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для BZ GPC3-1 (с удаленным WPRE)
SEQ ID NO: 27	GPC3-1 VH
SEQ ID NO: 28	GPC3-1 VL
SEQ ID NO: 29	GPC3-2 VH
SEQ ID NO: 30	GPC3-2 VL
SEQ ID NO: 31	Аминокислотная последовательность scFv GPC3-3
SEQ ID NO: 32	Аминокислотная последовательность scFv GPC3-4
SEQ ID NO: 33	Последовательность нуклеиновой кислоты scFv GPC3-1
SEQ ID NO: 34	Последовательность нуклеиновой кислоты scFv GPC3-2
SEQ ID NO: 35	Последовательность нуклеиновой кислоты scFv GPC3-3
SEQ ID NO: 36	Последовательность нуклеиновой кислоты scFv GPC3-4
SEQ ID NO: 37	CDR1 VH GPC3-1 и GPC3-2
SEQ ID NO: 38	CDR2 VH GPC3-1 и GPC3-2
SEQ ID NO: 39	CDR3 VH GPC3-1 и GPC3-2
SEQ ID NO: 40	GPC3-1 VL CDR1
SEQ ID NO: 41	GPC3-1 VL CDR2
SEQ ID NO: 42	GPC3-1 VL CDR3
SEQ ID NO: 43	GPC3-2 VL CDR1
SEQ ID NO: 44	GPC3-2 VL CDR2
SEQ ID NO: 45	GPC3-2 VL CDR3

Таблица 4. Последовательности

SEQ ID NO: 1	EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLS CAASGFT FSSY AMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGKRYFDYWGQGTMTVSSGGGGSGGG GSGGGGSSYELTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNTVNW FRQLPGTAPKLLVYFNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIGGL QSDDEADYYCVAWDDSLNAPVFGGGTKVTVL
SEQ ID NO: 2	EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLS CAASGFT FSSY AMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGRKRYFDYWGQGTMTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSDIGSNTVNW YQQLPGTAPKLLIYYNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL QSEDEADYYCATWDDRMYS PVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 3	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPGVHSEVQLLES GGGGLVQP GGS LRLS CAASGFT FSSY AMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGK RYFDYWGQGTMTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSA SGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIGGLQSDDEADYYCVAWDDSL NAPVFGGGTKVTVLESKYGPPCPPCFWLVVVVGGVLACYS LLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR

	FPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR *
SEQ ID NO: 4	MLLL VTSLLL CELPHP AFL LIPGVHSEVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGK RYFDYWGQGTMTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSA SGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIGGLQSDDEADYYCVAWDDS LNAPVFGGGTKVTVLESKYGPPCPPCFWVLVVVGGVLACYS LLVTVAFIIFWVRVKFSRSADAPA*
SEQ ID NO: 5	MLLL VTSLLL CELPHP AFL LIPGVHSEVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGK RYFDYWGQGTMTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSA SGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIGGLQSDDEADYYCVAWDDS LNAPVFGGGTKVTVLESKYGPPCPPCFWVLVVVGGVLACYS LLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPY APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPP R*
SEQ ID NO: 6	MLLL VTSLLL CELPHP AFL LIPGVHSEVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGK RYFDYWGQGTMTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSA SGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIGGLQSDDEADYYCVAWDDS LNAPVFGGGTKVTVLESKYGPPCPPCFWVLVVVGGVLACYS LLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPY APPRDFAAYRSKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR FPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR *
SEQ ID NO: 7	MLLL VTSLLL CELPHP AFL LIPEVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSC AASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGRYFD YWGQGTMTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTP GQRVTISCSGGSSDIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYNNQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDRMYS P VFGGGTKLTVLESKYGPPCPPCFWVLVVVGGVLACYS LLVT VAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR*
SEQ ID NO: 8	MLLL VTSLLL CELPHP AFL LIPEVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSC AASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGRYFD YWGQGTMTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTP

	GQRVTISCSGGSSDIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYNNQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDRMYS VFGGGTKLTVLESKYGPPCPPCFWVLLVVGGVLACYSLLV VAFIIFWVRVKFSRSADAPA*
SEQ ID NO: 9	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GKRYFD YWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTP GQRVTISCSGGSSDIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYNNQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDRMYS VFGGGTKLTVLESKYGPPCPPCFWVLLVVGGVLACYSLLV VAFIIFWVRSKRSLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR*
SEQ ID NO: 10	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GKRYFD YWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTP GQRVTISCSGGSSDIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYNNQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDRMYS VFGGGTKLTVLESKYGPPCPPCFWVLLVVGGVLACYSLLV VAFIIFWVRSKRSLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR DFAAYRSKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEE EGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR*
SEQ ID NO: 11	atgtctgtctggtgacaagcctgtctgtgcgaactgccccatcccgccttctgtgattcctg gtgtacactccgaggtgcagctgttgagctctgggggaggcttggtacagcctggggggtccctg agactctctgtgcagcctctggattcaccttagcagctatgccatgagctgggtccgccaggctc cagggaaagggctggagtggtctcagctattagtggtagtggtgtagcacatactacgcagac tccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaac agcctgagagccgaggacacggcctgtattactgtgcgagaggaaagcgatactttgactactg gggcccaggggacaatggcaccgtctcagtggtggggggggcagcggtggtggaggctctg gtggaggaggagctctatgagctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcaga gggtcaccatctctgttctggaggcagctccaacatcggaagtaataactgtaaactggtccggca gctcccaggaacggccccaaactcctcgtttattttaataatcagcgaccctcaggggtccctga ccgattctctggctccaagtctggcacctcggcctcctggccatcggtgggctccagctctgacga tgaggctgactattactgttagcatgggatgactctctgaatgctccggtgttcggcgaggggac caaggtcaccgtcctagagagcaaatatggaccaccatgccctccatgtccttttgggtcctggtg gtcgtgggaggcgtgctggcatgttattctctgctggtcacagtggctttcatcatcttctgggtcaa gcgaggccggaagaaactgtgtacatctcaaacagcctttatgcgccagtgagacaactc aggaggaagacggctgctctgtcgggtccccaggaggaagggggatgtgagctgcgcg tgaagtttctgaagtccgatgctcctgcatacagcaggacagaaccagctgtacaacgagc tgaatctgggcccggagagaggaatacagctgctggataagaggcgcggcagagaccagaa atgggcccggaaagccacgacggaaaaacccccaggagggctgtataatgaactgcagaagga caaatggccgaggcttacagcgaatcgggatgaaggagagagaaggcgcggaagggc cacgatggactgtatcaggcctgagcactgccaccaaggacacctacgatgctctgacatgca ggcactgccaccaggtga
SEQ ID NO: 12	atgtctgtctggtgacaagcctgtctgtgcgaactgccccatcccgccttctgtgattcctg gtgtacactccgaggtgcagctgttgagctctgggggaggcttggtacagcctggggggtccctg agactctctgtgcagcctctggattcaccttagcagctatgccatgagctgggtccgccaggctc

	<p>cagggaaggggctggagtgggtctcagctattagtggtagtggtagcacatactacgcagac tccgtgaagggccggttcacatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaac agcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagaggaaagcgatactttgactactg gggcccaggggacaatgggtaccgtctcgagtgggtggggggggcagcgggtggtagggctctg gtggaggaggagctcctatgagctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcaga gggtcaccatctctgttctggaggcagctccaacatcggaagtaatactgtaaactggtccggca gctcccaggaacggccccaaactcctcgtttattttaataatcagcgaccctcaggggtccctga ccgattctctggctccaagtctggcacctcggcctccctggccatcgggtgggtccagtctgacga tgaggctgactattactgttagcatgggatgactctctgaatgctccggtgttcggcgaggggac caaggtcacctcctagagagcaaatatggaccaccatgccctccatgctcttttgggtcctggg gtcgtgggaggcgtgctggcatgttattctctgctggtcacagtggctttcatcatctctgggtccg cgtgaagtttctcgaagtccgatgctcctcatga</p>
SEQ ID NO: 13	<p>atgctgctgctggtagacaagcctgctgctgctgcgaactgccccatcccgccttctgctgattcctg gtgtacactccgaggtgacgctgttggagtctgggggaggcttggtacagcctgggggggtccctg agactctctgtgcagcctctggattcacctttagcagctatgccatgagctgggtccgccaggctc cagggaaggggctggagtgggtctcagctattagtggtagtggtagcacatactacgcagac tccgtgaagggccggttcacatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaac agcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagaggaaagcgatactttgactactg gggcccaggggacaatgggtaccgtctcgagtgggtggggggggcagcgggtggtagggctctg gtggaggaggagctcctatgagctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcaga gggtcaccatctctgttctggaggcagctccaacatcggaagtaatactgtaaactggtccggca gctcccaggaacggccccaaactcctcgtttattttaataatcagcgaccctcaggggtccctga ccgattctctggctccaagtctggcacctcggcctccctggccatcgggtgggtccagtctgacga tgaggctgactattactgttagcatgggatgactctctgaatgctccggtgttcggcgaggggac caaggtcacctcctagagagcaaatatggaccaccatgccctccatgctcttttgggtcctggg gtcgtgggaggcgtgctggcatgttattcctgctggtcactgtggccttcatcatctctgggtgcg gagcaagcggagcggctgctgcactctgactacatgaacatgactccacggagacccggccct accggaaacattatcagccctacgcccaccagagattttgccgcttataggtccaggggtgaa gttttctcgcagtgcagatgccctgcttatcagcagggacagaatcagctgtacaacgagctgaa tctgggcagggcggagggaatacagctgctggataagcgacggggcagagacccccgaaatgg gagggaaagcccagaaggaaaaacccctcaggaggggctgtataatgaactgcagaaggacaaa atggcagaggcctacagtgaatcgggatgaaaggagagcggcgacgggggaaaaggccacg atggactgtatcagggcctgtctactgccaccaaggacacctacgatgccctgcacatcagggct ctgctccacgctga</p>
SEQ ID NO: 14	<p>atgctgctgctggtagacaagcctgctgctgctgcgaactgccccatcccgccttctgctgattcctg gtgtacactccgaggtgacgctgttggagtctgggggaggcttggtacagcctgggggggtccctg agactctctgtgcagcctctggattcacctttagcagctatgccatgagctgggtccgccaggctc cagggaaggggctggagtgggtctcagctattagtggtagtggtagcacatactacgcagac tccgtgaagggccggttcacatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaac agcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagaggaaagcgatactttgactactg gggcccaggggacaatgggtaccgtctcgagtgggtggggggggcagcgggtggtagggctctg gtggaggaggagctcctatgagctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcaga gggtcaccatctctgttctggaggcagctccaacatcggaagtaatactgtaaactggtccggca gctcccaggaacggccccaaactcctcgtttattttaataatcagcgaccctcaggggtccctga ccgattctctggctccaagtctggcacctcggcctccctggccatcgggtgggtccagtctgacga tgaggctgactattactgttagcatgggatgactctctgaatgctccggtgttcggcgaggggac caaggtcacctcctagagagcaaatatggaccaccatgccctccatgctcttttgggtcctggg gtcgtgggaggcgtgctggcatgttattcctgctggtcactgtggccttcatcatctctgggtgcg gagcaagcggagcggctgctgcactctgactacatgaacatgactccacggagacccggccct accggaaacattatcagccctacgcccaccagagattttgccgcttataggtccaagcggg ccgaaagaaactgctgtacatctcaaacgcccttcatgagaccctcagacaactcaggagg aagacggctgcagctgtaggttccccagggaagggaagggggatgtgagctgaggggtaagt</p>

	<p>tttctgcagtgacagatgccctgcttatcagcagggacagaatcagctgtacaacgagctgaatc tgggcagggcgcgaggaatacagctgctggataagcagcggggcagagaccccgaatggg aggggaagcccagaaggaaaaacctcaggaggggctgtataatgaactgcagaaggacaaaa ggcagaggcctacagtgaatcgggatgaaggagagcggcagcggggaaaaaggccacgat ggactgtatcaggcctgtctactgccaccaaggacacctacgatgccctgcacatgcaggctc gcctccacgctga</p>
SEQ ID NO: 15	<p>atgctgctgctggtgacaagcctgctgctgctgcaactgcccatcccgccttctgctgattcctg aggtccagctgctggagagcggaggaggactggtgcagcctggaggaaagtctgcgactgtcat gcgccgctagcggcttcacctcagctcctatgcaatgagctgggtgcgacaggcaccaggcaa ggggctggagtgggtctccgctatctccggctctggaggctctactactatgcagacagtgtgaa ggggcgggtcacaatctccagagataacttaagaacactctgtacctgcagatgaactctctgag agctgaggacaccgagtgactattgcgccaaggggcaaaaggactttgattattggggacagg gcactatggtgaccgtctctagtggaggaggaggaaagcggaggaggaggatccggcggaggga ggcagtcagtcagtgctgacacagccacctagcgcctccggaaccccaggacagcgggtcaca atctctgtagtgggggatcaagcagactgggagcaaacacgtgaattggtatcagcagctgcct ggaacagctcaaagctgctgatctactataacaatcagaggccctccggcgtccctgatcgcttc tcaggcagcaaatccgggacttctgcaagtctggcattagtggcctgcagtcagaggacgaag ccgattactattgtctacctgggacgataggatgtactctcccggttcggcgggggaacaaagc tgactgtcctggagagcaaatatggaccacctgcctccatgtccttttgggtcctggtggtcgtg ggaggcgtgctggcatgttattctctgctggtcacagtggcttcatcatcttctgggtcaagcagg ccggaagaaactgctgtacatctcaaacagcctttatgcgccagtcagacaactcaggagg aagacggctgctctgtcgggtccccgaggaagaggaggaggatgtgagctgcgcgtgaagt ttctgaagtcccgatgctcctgcatatcagcagggacagaaccagctgtacaacgagctgaatc gggcccggagagaggaaatacagctgctggataagaggcgcggcagagaccagaaatgggc gggaagccacgacggaaaaaccccaggaggggctgtataatgaactgcagaaggacaaaat ggccgaggcttacagcgaatcgggatgaaggagagagaaggcggaaaaaggccacgat ggactgtatcaggcctgagcactgccaccaaggacacctacgatgctctgcacatgcaggcac tgccaccagggtga</p>
SEQ ID NO: 16	<p>atgctgctgctggtgacaagcctgctgctgctgcaactgcccatcccgccttctgctgattcctg aggtccagctgctggagagcggaggaggactggtgcagcctggaggaaagtctgcgactgtcat gcgccgctagcggcttcacctcagctcctatgcaatgagctgggtgcgacaggcaccaggcaa ggggctggagtgggtctccgctatctccggctctggaggctctactactatgcagacagtgtgaa ggggcgggtcacaatctccagagataacttaagaacactctgtacctgcagatgaactctctgag agctgaggacaccgagtgactattgcgccaaggggcaaaaggactttgattattggggacagg gcactatggtgaccgtctctagtggaggaggaggaaagcggaggaggaggatccggcggaggga ggcagtcagtcagtgctgacacagccacctagcgcctccggaaccccaggacagcgggtcaca atctctgtagtgggggatcaagcagactgggagcaaacacgtgaattggtatcagcagctgcct ggaacagctcaaagctgctgatctactataacaatcagaggccctccggcgtccctgatcgcttc tcaggcagcaaatccgggacttctgcaagtctggcattagtggcctgcagtcagaggacgaag ccgattactattgtctacctgggacgataggatgtactctcccggttcggcgggggaacaaagc tgactgtcctggagagcaaatatggaccacctgcctccatgtccttttgggtcctggtggtcgtg ggaggcgtgctggcatgttactcctgctggtcactgtggccttcatcatcttctgggtcgggtga agttttctgcagtgccgacgctcccgatga</p>
SEQ ID NO: 17	<p>atgctgctgctggtgacaagcctgctgctgctgcaactgcccatcccgccttctgctgattcctg aggtccagctgctggagagcggaggaggactggtgcagcctggaggaaagtctgcgactgtcat gcgccgctagcggcttcacctcagctcctatgcaatgagctgggtgcgacaggcaccaggcaa ggggctggagtgggtctccgctatctccggctctggaggctctactactatgcagacagtgtgaa ggggcgggtcacaatctccagagataacttaagaacactctgtacctgcagatgaactctctgag agctgaggacaccgagtgactattgcgccaaggggcaaaaggactttgattattggggacagg gcactatggtgaccgtctctagtggaggaggaggaaagcggaggaggaggatccggcggaggga ggcagtcagtcagtgctgacacagccacctagcgcctccggaaccccaggacagcgggtcaca atctctgtagtgggggatcaagcagactgggagcaaacacgtgaattggtatcagcagctgcct</p>

	<p>ggaacagctcaaagctgctgatctactataacaatcagaggccctccggcgtcctgatcgcttc tcaggcagcaaatccgggacttctgcaagtctggcattagtggcctgcagtcagaggacgaag ccgattactattgtgctacctgggacgataggatgtactctcccggttcggcgggggaacaaagc tgactgtcctggagagcaaatatggaccaccatgccctccatgtccttttgggtcctggtgctg ggaggcgtgctggcatgttattcctgctggtcacagtggccttcatcatcttctgggtgcggagca agcggagccggctgctgactctgactacatgaacatgacccccggagaccggccctacaa gaaagcattatcagccttacgccccaccaggacttcgcagcttatcgtcccagtgaaatftc tcgcagtgcagatgccccgcttatcagcagggccaatcagctgtacaacgagctgaatctgg ggaggcgcgaggaatacagctgctggataagcgacggggccgggacccgaaatgggagg aaagcctagaaggaaaaaccacaggagggcctgtataatgaactgcagaaggacaaaatggc agaggcctacagcgaatcggaatgaaggagagcgccgacggggc aaaggacacgatggc ctgtatcaggggctgagcaccgccacaaaggacacctacgatgccctgcacatgcaggctctgc ctccacgctga</p>
SEQ ID NO: 18	<p>atgctgctgctggtgacaagcctgctgctgctgcaactgccccatcccgccttctgctgattcctg aggtccagctgctggagagcggaggaggactggtgcagcctggaggaaagtctgcgactgtcat gcgccgctagcggcttcacctcagctcctatgcaatgagctgggtgcgacaggcaccaggcaa ggggctggagtgggtctccgctatctccggctctggaggctctacttactatgcagacagtgtgaa ggggcgggtcacaatctccagagataacttaagaacactctgtacctgcagatgaactctctgag agctgaggacaccgagtgactattgcgccaagggcaaaaggactttgattattggggacagg gcactatggtgaccgtctctagtggaggaggaggaaagcggaggaggaggatccggcggagga ggcagtcagtcagtgctgacacagccacctagcgcctccggaacccaggacagcgggtcaca atctctgtagtgggggatcaagcgacattgggagcaacaccgtgaattggtatcagcagctgct ggaacagctcaaagctgctgatctactataacaatcagaggccctccggcgtcctgatcgcttc tcaggcagcaaatccgggacttctgcaagtctggcattagtggcctgcagtcagaggacgaag ccgattactattgtgctacctgggacgataggatgtactctcccggttcggcgggggaacaaagc tgactgtcctggagagcaaatatggaccaccatgccctccatgtccttttgggtcctggtgctg ggaggcgtgctggcatgttattcctgctggtcactgtggccttcatcatcttctgggtgcggagca agcggagccggctgctgactctgactacatgaacatgactccacggagaccggccctaccg gaaacattatcagccctacgccccaccagagattttgccgcttataaggccaagcggccgaa agaaactgctgtacatctcaaacagcccttcatgagaccgctccagacaactcaggaggaagac ggctgcagctgtaggttccccgaggaagaggaaaggggatgtgagctgagggtgaagtttctc gcagtcagatgccctgcttatcagcagggacagaatcagctgtacaacgagctgaatctgggc aggcgcgaggaatacagctgctggataagcgacggggcagagacccgaaatgggagggga agcccagaaggaaaaaccctcaggaggggctgtataatgaactgcagaaggacaaaatggcag aggcctacagtgaaatcgggatgaaggagagcgccgacggggaaaaggccacgatggactg taccagggcctgtctactgccaccaaggacacctacgatgccctgcacatgcaggctctgcctcca cgctga</p>
SEQ ID NO: 19	<p>MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDVVMTQSPLSLPVTTPGEPASIS CRSSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHTVPPTFGQGT KLEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTDGTAYS QKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLTSEDYAVYYCTRFYSY YWGQGLVTVSSDKTHTCPPCFWVLLVVGVLACYSLLV VAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR*</p>
SEQ ID NO: 20	<p>MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDVVMTQSPLSLPVTTPGEPASIS CRSSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHTVPPTFGQGT KLEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVS</p>

	CKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTGDTAYS QKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCTRFYSY YWGQGLVTVSSDKTHTCPPCFWVLLVVVGGVLACYSLLVT VAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR DFAAYRSKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*
SEQ ID NO: 21	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQVQLVQSGGGVVPGRSLRLS CAASGFTFSSYGLHWVRQAPGKGLEWVA AISYDGSKKYYAD SVKGRLTISRDN SKNTLYLQMNSLRPDDTALYFCARGWVVEP LSWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTP GQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADY YCAAWDDSLNGY VFGTGTKLTVLESKYGPPCPPCFWVLLVVVGGVLACYSLLVT VAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*
SEQ ID NO: 22	atgctgctgctggtgacaagcctgctgctgctgcaactgccccatcccgccttctgctgattcctg atgctgctgatgacgcagagccctctctcttcccgttaccctggtgaaccgcacatcaataagttg ccgctccagtcacatcactgtacattcaaatcgcaatacctacctgcaactggtatttgcagaagccg ggacaatcccctcaattggtgatataaaggatccaatcgctttctggaggtcctgatagattcagc ggatccgggtctggtactgattcactctgaaaatc cagggtcgaagctgaggacgtaggcgta tattattgctctcagaacacgcatgtcccgcgacttccggccaggcactaaactgagatcaagg gtggggggggcagcgggtggtgaggctctggtggaggaggaggaccaggtccaactcgttcaa agtggcgagagggtcaaaaagccaggcgcgagcgttaaagatcatgtaaggccagcgggtata cttctactgattatgaaatgcaactgggtgcgacaagccccgggcaaggctttagtgatgggtg cacttgatccaaaaactggggatactgcctatagccagaaattcaaaggcgcgtcacactcactg ccgacaaaagtacgagcacagcttatatggaattgagttcactgacgagcaggatacggcagtt tattactgtacgcgttctactcttacactattgggggcaaggcacttgggtactgtctctctgaca agaccatacgtgtccaccgtgtccctctgggtattggtgtggtcggcggtgtccttctgttaca gccttctctgacagtcgattcataaattttgggtgaaaagaggtcggaaaaagtgtgtatattt caaacaacccttatgagacctgtacaacgactcaggaagaggatggtttagttgacaggttcc ggaggaggaggaaggtgggtgcgaactgcgggtgaaatttagtagaagcgtgacgcaccag cttaccacaaggacagaaccaattgtacaacgagcttaactgggtaggaggaggagaatgat gtactggacaaaaggcaggtcgcgatccggaaatgggaggcaagccacagcgcggaaaaa cccgcaggaaaggctgtacaacgaactcagaaaagataaaatggcagaagcactactccgaaata gggatgaaagggtgaacggcggcaggcaagggccacgaggtctgtaccaagggtgtcaac ggcaactaaagacacgtatgatgcacttcatatgcaagctctgcccccagggtga
SEQ ID NO: 23	atgctgctgctggtgacaagcctgctgctgctgcaactgccccatcccgccttctgctgattcctg atgctgctgatgacgcagagccctctctcttcccgttaccctggtgaaccgcacatcaataagttg ccgctccagtcacatcactgtacattcaaatcgcaatacctacctgcaactggtatttgcagaagccg ggacaatcccctcaattggtgatataaaggatccaatcgctttctggaggtcctgatagattcagc ggatccgggtctggtactgattcactctgaaaatc cagggtcgaagctgaggacgtaggcgta tattattgctctcagaacacgcatgtcccgcgacttccggccaggcactaaactgagatcaagg gtggggggggcagcgggtggtgaggctctggtggaggaggaggaccaggtccaactcgttcaa agtggcgagagggtcaaaaagccaggcgcgagcgttaaagatcatgtaaggccagcgggtata cttctactgattatgaaatgcaactgggtgcgacaagccccgggcaaggctttagtgatgggtg cacttgatccaaaaactggggatactgcctatagccagaaattcaaaggcgcgtcacactcactg ccgacaaaagtacgagcacagcttatatggaattgagttcactgacgagcaggatacggcagtt tattactgtacgcgttctactcttacactattgggggcaaggcacttgggtactgtctctctgaca

	<p>agaccatacgtgtccaccgtgtcccttctgggtattggttggtgctggcgggtgtccttgctgttaca gccttctcgtgacagtcgcattcataatTTTTGGGTGCGGAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCCTC tgactacatgaacatgactccacggagaccggccctaccggaaacattatcagccctacgcc caccagagattttgcccttatagggtccaaaagaggtcggaaaaagtgtgtatattttcaaca accctttatgagacctgtacaacgactcaggaagaggatggttgtagttgcaggttccggagga ggaggaaggtgggtgcaactcgggtgaaatttagtagaagcgtgacgcaccagcttaccaa caaggacagaaccaattgtacaacgagcttaactgggtaggaggagggaatgatgtactgga caaaaggcgaggctcgcgatccggaaatgggaggcaagccacagcggcggaaaaaccgcag gaaggctgtacaacgaactcagaaagataaaatggcagaagcatactccgaaatagggatgaa aggtgaacggcggcgaggcaagggccacgacggtctgtaccaaggggtgtcaacgcaactaa agacacgtatgatgcactcatatgcaagctctgccaccaggtga</p>
SEQ ID NO: 24	<p>atgctgctgctggtgacaagcctgctgctgctgcaactgcccatcccgccttctgctgattcctc aggtccagcttggtgcaaacgaggaggagtggtacagcctggccgctctttgagactgtcttgt gcgccagtggattacattctcttcttattgggtgcattgggtcagacaagcaccgggcaaaggat tggaatgggtcgcggccattagctatgatggctcaagaatattatgccgattccgtaaaaggga ggttgacaataagccgggataacagcaagaacatttctatcttcatgatgaatagcctccgaccgg acgacacggcactgtattttgcgcacgcgggtggtttagaaccctgagttggggacaaggta ctcttgacaggtatcttctggcggagggtgggagtggtgggggtggcagtgccgggggtgggtc acaagcgtgcttacacaacctctctgagcgggaactccgggacaacgggttacgattcatg ctccggctcaagtagcaatataaggatcaatacagtggaattggtatcaacaactccctggcacagc gccaagctgctgatctacttaataaccagaggccgagtggtgtccagataggtcagtggtc taaatcaggtactagcgcgagcctcgcatttcaggacttcaatcagaggatgaagcggactacta ctgtcccgctgggatgattcacttaatggatattttcgggaccggaacaaaattgacggattg gagagcaaatatggaccacatgccctcatgtccttttgggtcctggtgctggtggagggcgtg ctggcatgttattctctgctggtcacagtggcttcatctcttgggtcaagcaggccggaagaa actgctgtacatcttcaaacagcctttatgcccagtgcaacaactcaggaggaagacggctg ctcttgctgggtccccaggaagaggaagggggatgtgagctgctgctggaagtcttctcgaagtg ccgatgctcctgcatacagcaggacagaaccagctgtacaacgagctgaaatctggccggag agaggaatacagcgtgctggataagaggcgcggcagagaccagaaatgggcgggaagcca cgacggaaaaacccccaggaggggctgtataatgaactgcagaaggacaaaatggccgaggct tacagcgaatcgggatgaaggagagagaaggcgcggaaaaggccacgatggactgtatca gggctgagcactgccaccaaggacacctacgatgctctgcacatgcaggcactgccaccag gTGA</p>
SEQ ID NO: 25	<p>MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGKRYFD YWGQGTMTVTVSSGGGSGGGGSGGGSSYELTQPPSASGTP GQRVTISCSGSSNIGSNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNNQRPS GVPDRFSGSKSGTASLAIGGLQSDDEADYYCVAWDDSLNAP VFGGGTKVTVLESKYGPCCPPCFWVLLVVGVLACYSLLV VAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLPPR</p>
SEQ ID NO: 26	<p>ATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCC CCATCCCGCCTTCTGCTGATTCTGAGGTGCAGCTGTTGG AGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAG ACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATG CCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGA GTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTG</p>

	<p>AGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGAA AGCGATACTTTGACTACTGGGGCCAGGGGACAATGGTCAC CGTCTCGAGTGGTGGGGGGGGCAGCGGTGGTGGAGGCTCT GGTGGAGGAGGGAGCTCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCT CAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGT TCTGGAGGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAACT GGTTCCGGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCGTT TATTTAATAATCAGCGACCCTCAGGGGTCCCTGACCGATT CTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCGGCCTCCCTGGCCATCG GTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGACTATTACTGTGTA GCATGGGATGACTCTCTGAATGCTCCGGTGTTCGGCGGAG GGACCAAGGTCACCGTCCTAGAGAGCAAATATGGACCACC ATGCCCTCCATGTCCTTTTTGGGTCTGGTGGTCTGTTGGGAG GCGTGCTGGCATGTTATTCTCTGCTGGTACAGTGGCTTTC ATCATCTTCTGGGTCAAGCGAGGCCGGAAGAACTGCTGT ACATCTTCAAACAGCCTTTTATGCGCCCAGTGCAGACA CAGGAGGAAGACGGCTGCTCTTGTCGGTTCCTCCGAGGAAG AGGAAGGGGGATGTGAGCTGCGCGTGAAGTTTTCTCGAAG TGCCGATGCTCCTGCATATCAGCAGGGACAGAACCAGCTG TACAACGAGCTGAATCTGGGCCGGAGAGAGGAATACGACG TGCTGGATAAGAGGCGCGGCAGAGACCAGAAATGGGCG GGAAGCCACGACGGAAAAACCCCCAGGAGGGGCTGTATA ATGAACTGCAGAAGGACAAAATGGCCGAGGCTTACAGCGA AATCGGGATGAAGGGAGAGAGAAGGCGCGGAAAAGGCCA CGATGGACTGTATCAGGGCCTGAGCACTGCCACCAAGGAC ACCTACGATGCTCTGCACATGCAGGCACTGCCACCCAGG</p>
SEQ ID NO: 27	<p>EVQLES GGGLVQPGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGKRYFDYWGQGTMTVSS</p>
SEQ ID NO: 28	<p>SYELTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNTVNWFRQLPGT APKLLVYFNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIGGLQSDDEAD YYCVAWDDSLNAPVFGGGTKVTVL</p>
SEQ ID NO: 29	<p>EVQLES GGGLVQPGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGRYFDYWGQGTMTVSS</p>
SEQ ID NO: 30	<p>QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSDIGSNTVNWYQQLPGT APKLLIYNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEAD YYCATWDDRMYS PVFGGGTKLTVL</p>
SEQ ID NO: 31	<p>DVVMTQSPLSLPVTPEP ASISCRSSQSLVHSNRNTYLHWY LQ KPGQSPQLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGS GTFDLKISRVEAED VGVYYCSQNTHPPTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQ VQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTF TDYEMHWVRQAP GQGLEWMGALDPKTGDTAYSQKFKGRVTLADKSTSTAYM ELSSLTSED TAVYYCTRFYSYTYWGQGLTVTVSS</p>
SEQ ID NO: 32	<p>QVQLVQSGGGV VQGRSLRLS CAASGFTFSSYGLHWVRQAP GKLEWVA AISYDGSKKYYADSVKGRLTISRDN SKNTLYLQ MNSLRPDDTALYFCARGW FVEPLSWGQGLVTVSSGGGGSG GGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNTV NWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLQSEDEADYYCAA WDDSLNGYVFGTGKLTVL</p>
SEQ ID NO: 33	<p>gaggtgcagctgttgagctctgggggaggttggtacagcctggggggtccctgagactctctg tgcagcctctggattcaccttagcagctatgccatgagctgggtccgccaggctccaggggaagg</p>

	ggctggagtgggtctcagctattagtggtagtggtagcacatactacgcagactccgtgaag ggccggttcacatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgag agccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagaggaaagcgatactttgactactggggccag gggacaatggtcaccgtctcagtggtggggggggcagcgggtggtggaggctctggtggagg agggagctcctatgagctgactcagccacctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcac catctctgttctggaggcagctccaacatcggaaagtaatactgtaaactggtccggcagctcca ggaacggccccaaactctcgtttattttaataatcagcgaccctcaggggtccctgaccgattct ctggctccaagtctggcacctcggcctcctggccatcgggggctccagctgacgatgaggct gactattactgttagcatgggatgactctgaatgctccgggtggtcggcggagggaaccaaggtc accgtccta
SEQ ID NO: 34	gaggtccagctgctggagagcggaggaggactggtgcagcctggaggaaagtctgcgactgtca tgcgccgctagcggcttcacctcagctcctatgcaatgagctgggtgcgacagccaccaggcaa ggggctggagtgggtctccgctatctccggctctggaggctctacttactatgcagacagtgtgaa ggggcgggtcacaatctccagagataacttaagaacactctgtacctgcagatgaactctctgag agctgaggacaccgcagtgactattgcgccaagggcaaaaggtactttgattattggggacagg gcactatggtgaccgtctctagtggaggaggaggaaagcggaggaggaggatccggcggaggga ggcagtcagtcagtgctgacacagccacctagcgcctccggaacccaggacagcgggtcaca atctctgtagtgggggatcaagcgacattgggagcaaacacgtgaattggtatcagcagctgct ggaacagctccaagctgctgatctactataacaatcagaggccctccggcgtccctgatcgcttc tcaggcagcaaatccgggacttctgcaagtctggccattagtggctgcagtcagaggacgaag ccgattactattgtctacctgggacgataggatgtactctcccggtggtcggcgggggaacaaagc tgactgtcctg
SEQ ID NO: 35	gatgtcgtgatgacgcagagccctctctcttcccggtaccctggtaacccgcataaataagtt gccgctccagtcacactgtacattcaaatecgaatacctacctgactggatttgcagaagcc gggacaatccctcaattgtgatataaaggatccaatcgctttctggagttctgatagattcag cggatccgggtctggtactgatttactctgaaaatatccagggtcgaagctgaggacgtaggcgt atattattgctctcagaacacgcatgtcccggcactttcggcagggcactaaactgagatcaag ggtggggggggcagcgggtggtggaggctctggtggaggaggagccagggtccaactcgttca aagtggcgagaggtcaaaaagccaggcgcgagcgttaaaagtatcatgtaaggccagcggttat acttactgattatgaaatgactgggtgcgacaagccccgggcaaggtcttgatggatgggt gcactgatcaaaaactggggatactgcctatagccagaaattcaaaaggcgcgtcacactcact gccgacaaaagtacgagcacagcttatatggaattgagttcactgacgagcagggatacggcagt ttattactgtacgcgttctactcttacttattggggcaaggcactttggttactgtctctct
SEQ ID NO: 36	caggtccagcttgtgcaaaagcggaggaggagtgttacagcctggccgctctttgagactgtcttgt gcggccagtggttattctctcttattgggttcattgggtcagacaagcaccgggcaaaaggat tggaatgggtcgcggccattagctatgatggtcaaagaatattatgccgattccgtaaaaaggga ggtgacaataagccgggataacagcaagaacacttgtatctcagatgaatagcctccgaccgg acgacacggcactgtattttgcgcacgcgggtggtttagaaccctgagttggggacaaggta ctctgtcacggatcttctggcggagggtgggagtggtgggggtggcagtgccgggggtgggtc acaaagcgtgcttacacaacctccttctgcgagcggaaactccgggacaacgggttacgattcatg ctccggctcaagtagcaatataggatcaatacagtggaattggtatcaacaactcctggcacagc gccaagctgctgatctacttaataaccagaggccgagtggtgtccagataggttcagtggtc taaatcaggtactagcgcgagcctcgcatttcaggacttcaatcagaggatgaagcggactacta ctgtgcccgctgggatgattcacttaatggatattttcgggaccggacaacaaattgacggattg
SEQ ID NO: 37	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 38	AISGSGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 39	GKRYFDY
SEQ ID NO: 40	SGGSSNIGSNTVN
SEQ ID NO: 41	FNNQRPS
SEQ ID NO: 42	VAWDDSLNAPV
SEQ ID NO: 43	SGGSSDIGSNTVN

SEQ ID NO: 44	YNNQRPS
SEQ ID NO: 45	ATWDDRMYSVP

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит антигенсвязывающий домен, специфический в отношении глипикана 3 (GPC3), где антигенсвязывающий домен характеризуется равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей приблизительно 100 наномоль/л (нМ) или меньше, и где конструкция CAR не индуцирует выработку цитокинов в клетках GPC3.

2. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 1, где кодируемый антигенсвязывающий домен CAR содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

3. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 2, где кодируемый антигенсвязывающий домен CAR представляет собой Fab или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

4. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 3, где антигенсвязывающий домен представляет собой scFv, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

5. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, дополнительно кодирующая трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен.

6. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 5, где кодируемый трансмембранный домен предусматривает трансмембранный домен CD28.

7. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 5, где кодируемый костимулирующий домен предусматривает один или несколько из костимулирующих доменов CD28, 4-1BB, CD3-дзета, OX-40, ICOS, CD27, GITR и MyD88/CD40.

8. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 5, где кодируемый костимулирующий домен предусматривает один или несколько из костимулирующих доменов CD28, 4-1BB и CD3-дзета.

9. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 5, где кодируемый сигнальный домен содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид CSFR2.

10. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, дополнительно кодирующая шарнирный/спейсерный домен.

11. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 10, где кодируемый шарнирный/спейсерный домен представляет собой шарнирный/спейсерный домен IgG4P.

12. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 1, где последовательность нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 26.

13. Химерный антигенный рецептор (CAR) для GPC3, содержащий антигенсвязывающий домен, где антигенсвязывающий домен содержит антитело, Fab или scFv, содержащие переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL),

где VH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39; и

где VL содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 44, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 45.

14. CAR для GPC3 по п. 13, где VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 29.

15. CAR для GPC3 по п. 13, где VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 30.

16. CAR для GPC3 по любому из пп. 13-15, где CAR дополнительно содержит трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен.

17. CAR для GPC3 по п. 16, где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 25.

18. Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где последовательность нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

19. Клетка, содержащая вектор по п. 18.

20. Клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит антигенсвязывающий домен, специфический в отношении глипикана 3 (GPC3), где антигенсвязывающий домен характеризуется равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей приблизительно 100 наномоль/л (нМ) или меньше, и где конструкция CAR не индуцирует выработку цитокинов в клетках GPC3.

21. Клетка по п. 20, где последовательность нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

22. Клетка, содержащая химерный антигенный рецептор (CAR) для GPC3, содержащий антигенсвязывающий домен, где антигенсвязывающий домен содержит антитело, Fab или scFv, содержащие переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL),

где VH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, и

где VL содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 44, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 45.

23. Клетка по п. 22, где VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 29.

24. Клетка по п. 22, где VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 30.

25. Клетка по любому из пп. 22-24, где CAR дополнительно содержит трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен.

26. Клетка по любому из пп. 22-25, где CAR содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 25.

27. Клетка по любому из пп. 19-26, где клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), цитотоксического Т-лимфоцита (CTL) и регуляторной Т-клетки.

28. Клетка по п. 27, где клетка проявляет противоопухолевый иммунитет при контакте с опухолевой клеткой, экспрессирующей GPC3.

29. Способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества клеток, содержащих химерный антигенный рецептор (CAR) для GPC3, содержащий антигенсвязывающий домен, где антигенсвязывающий домен содержит антитело, Fab или scFv, содержащие переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL),

где VH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, и

где VL содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 44, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 45.

30. Способ по п. 29, дополнительно включающий подавление роста опухоли, индуцирование регрессии опухоли и/или увеличение продолжительности жизни субъекта.

31. Способ по п. 29, где клетка представляет собой аутологичную клетку.

32. Способ по п. 31, где аутологичная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), цитотоксического Т-лимфоцита (CTL) и регуляторной Т-клетки.

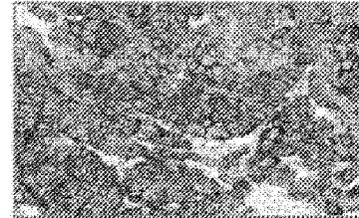
33. Способ по любому из пп. 29-32, где рак представлен солидной опухолью.

34. Способ по п. 33, где рак представляет собой гепатоцеллюлярную карциному, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника и/или плоскоклеточную карциному легкого.

35. Способ по п. 34, где рак представляет собой гепатоцеллюлярную карциному.

36. Способ по любому из пп. 29-35, дополнительно включающий введение субъекту эффективного количества антитела к TNF α .

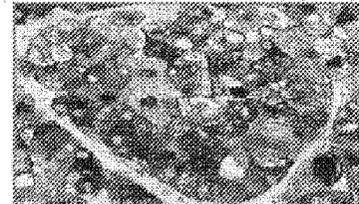
HCC
(n=49)



NSCLC SCC
(n=76)

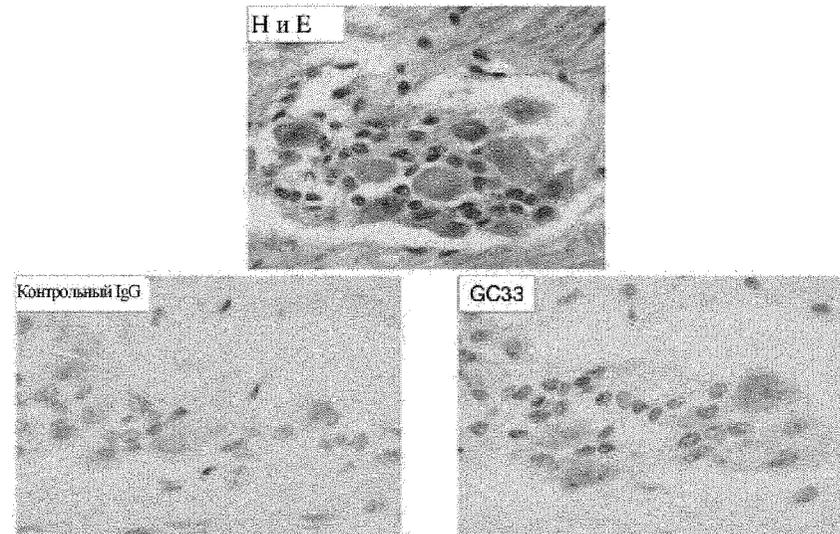


Светлые клетки яичника
(n=15)



% Positive (n) % положительных (n) при любой интенсивности	% High Pos. (n) % крайне положительных (n) >2+ у 50% TC
80% (39)	33% (16)
30% (23)	7% (5)
47% (7)	20% (3)

Фигура 1А



Фигура 1В

	FW 1	CDR 1	FW 2	CDR 2	FW 3	CDR 3	FW 4
GPC3-1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASEGFTFSYIANSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGRKRYFDYWGQGTMTVYSS						
GPC3-2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASEGFTFSYIANSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGGSTYYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGRKRYFDYWGQGTMTVYSS						

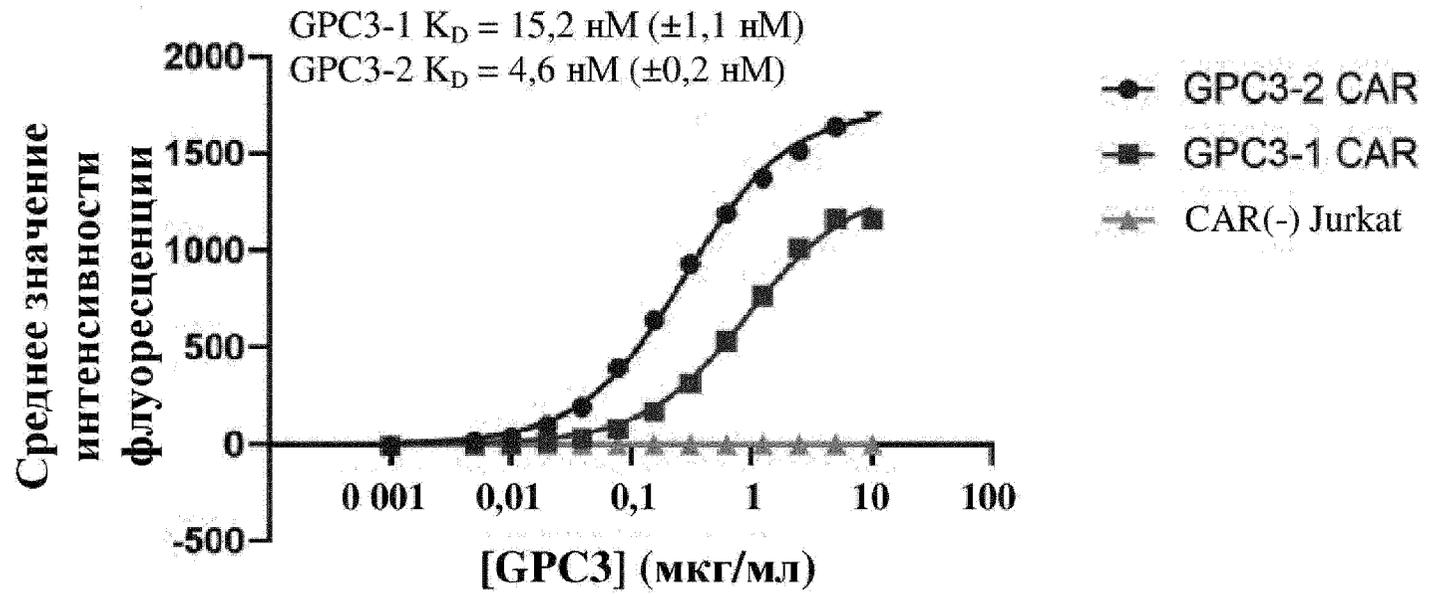
VH

	FW 1	CDR 1	FW 2	CDR 2	FW 3	CDR 3	FW 4
GPC3-1	SYELTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNTYNWFRLQPGTAPKLLVYFNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSDDEADYYCAWDDSLNAPVFGGGTKLTVL						
GPC3-2	QSYLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSDIGSNTYNWFYQLPGTAPKLLIYNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDRMYSVPVFGGGTKLTVL						

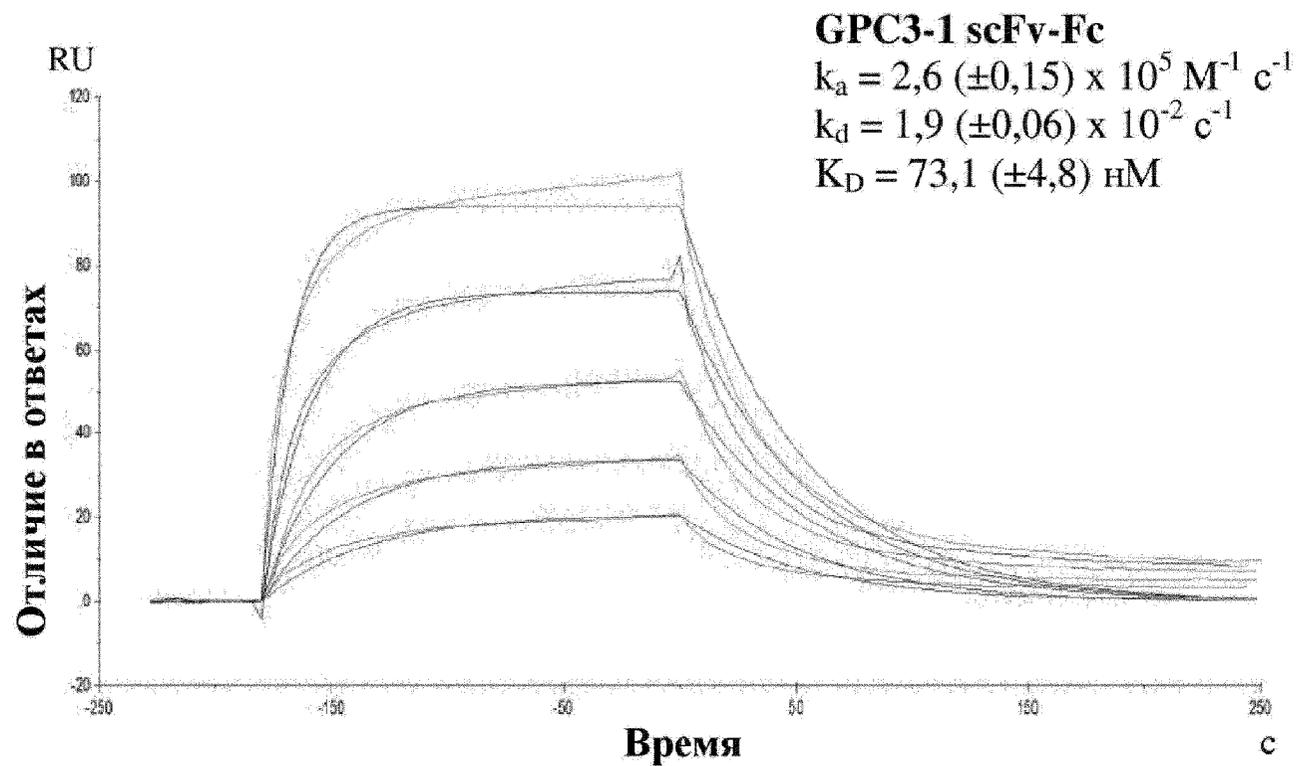
VL

Фигура 2

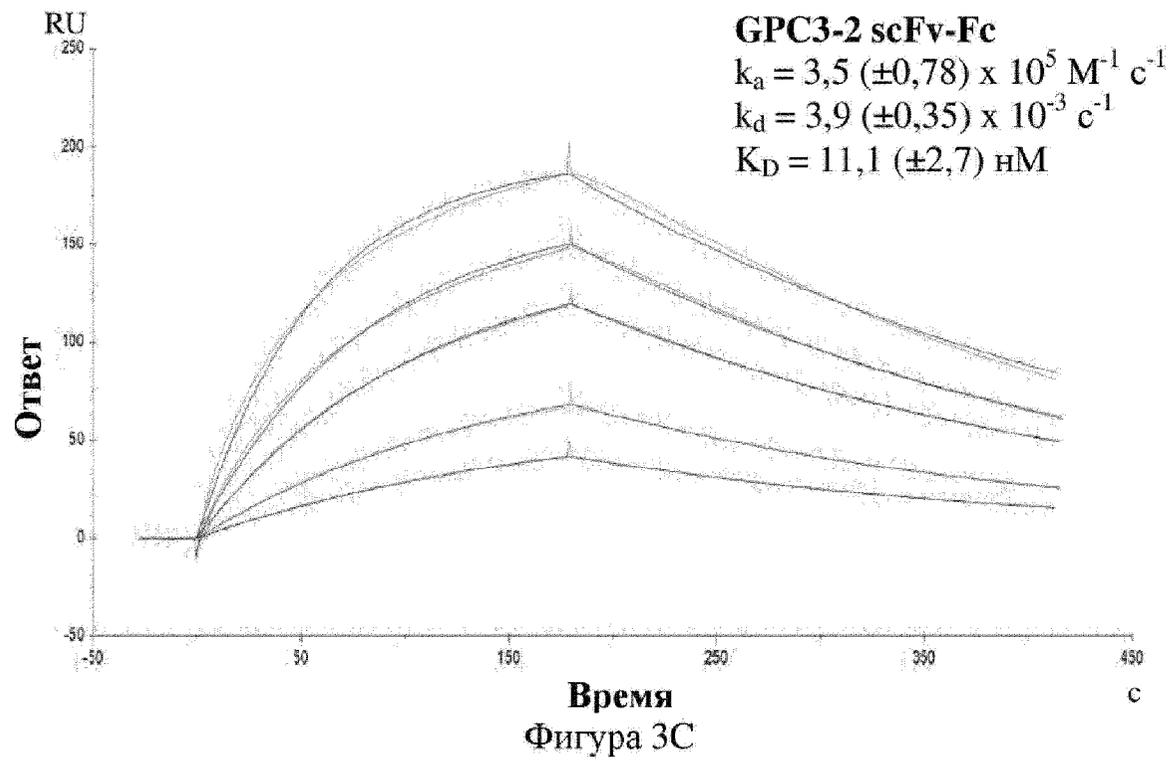
Связывание GPC3 с экспрессирующими CAR клетками Jurkat

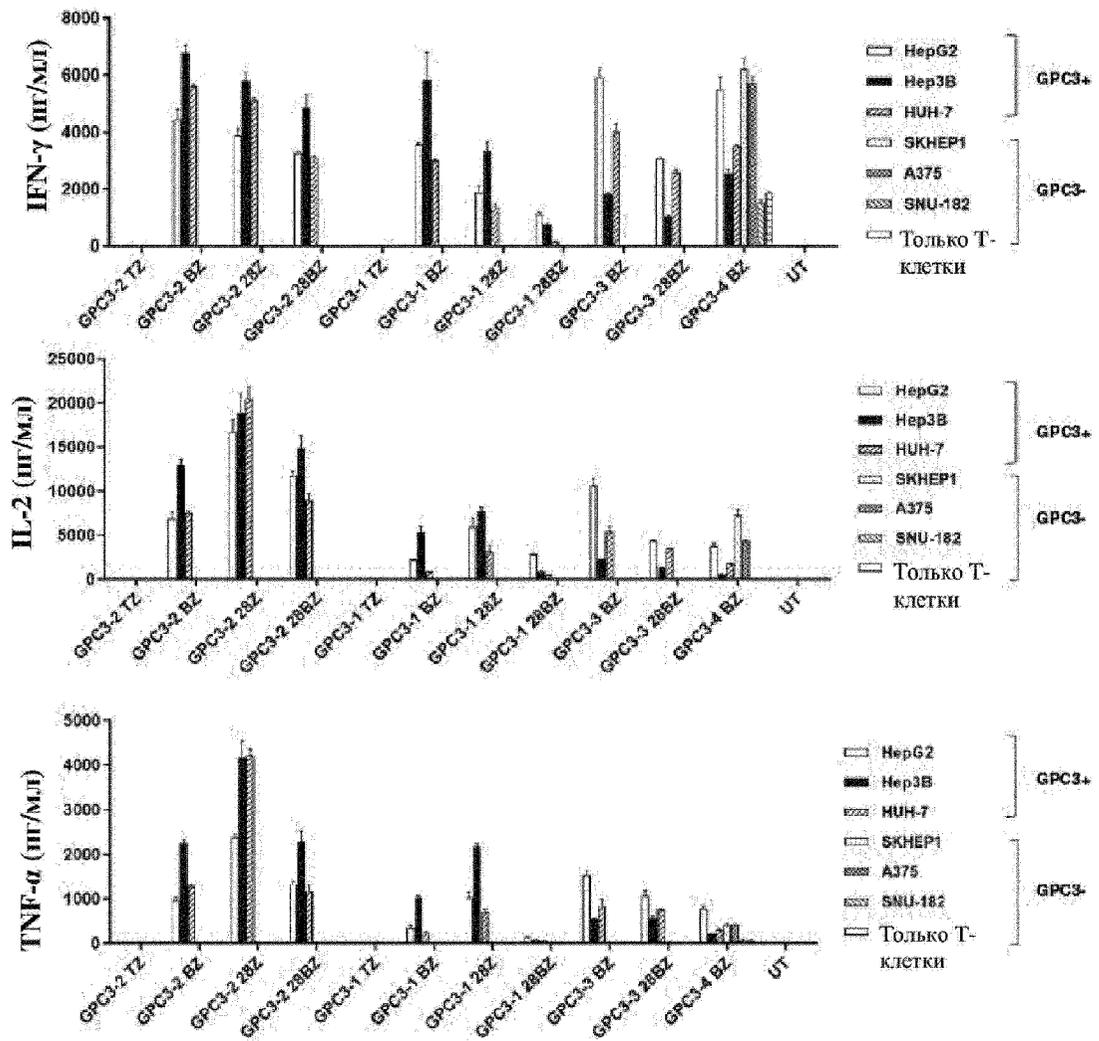


Фигура 3А

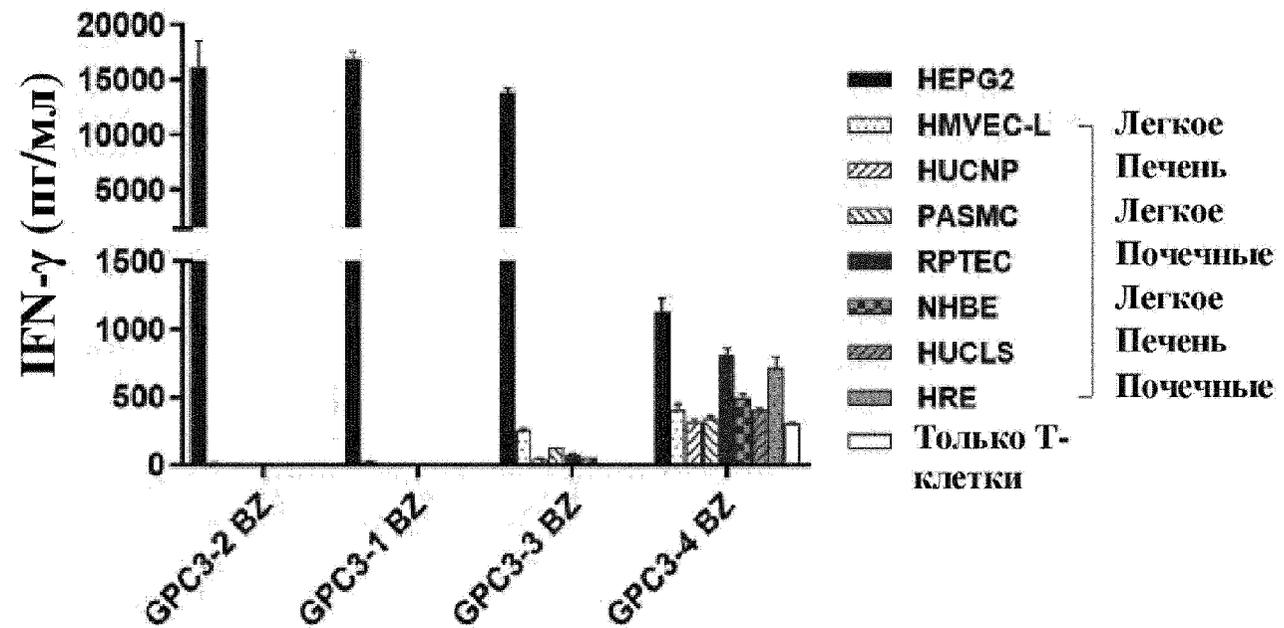


Фигура 3В

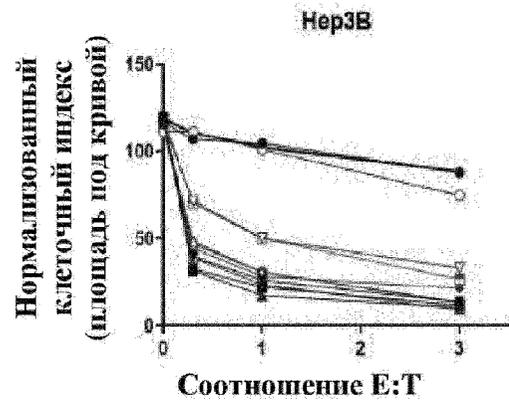




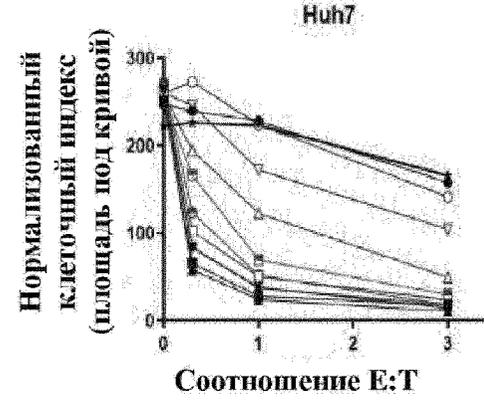
Фигура 4А



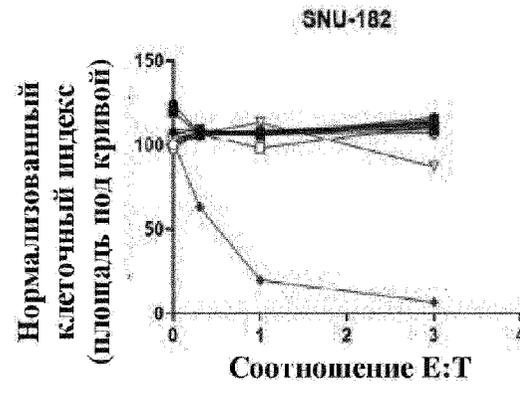
Фигура 4В



- ◆ GPC3-2 TZ
- GPC3-2 BZ
- ▲ GPC3-2 2BZ
- ▼ GPC3-2 2BBZ
- GPC3-1 TZ
- GPC3-1 BZ
- △ GPC3-1 2BZ
- ▽ GPC3-1 2BBZ
- GPC3-3 BZ
- ▣ GPC3-3 2BBZ
- ⊕ GPC3-4 BZ
- ⊖ UT



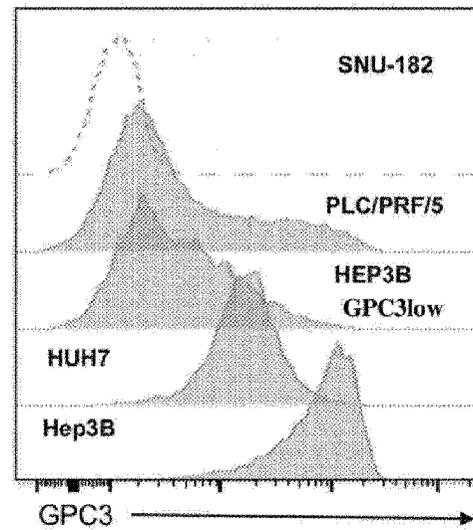
- ◆ GPC3-2 TZ
- GPC3-2 BZ
- ▲ GPC3-2 2BZ
- ▼ GPC3-2 2BBZ
- GPC3-1 TZ
- GPC3-1 BZ
- △ GPC3-1 2BZ
- ▽ GPC3-1 2BBZ
- GPC3-3 BZ
- ▣ GPC3-3 2BBZ
- ⊕ GPC3-4 BZ
- ⊖ UT



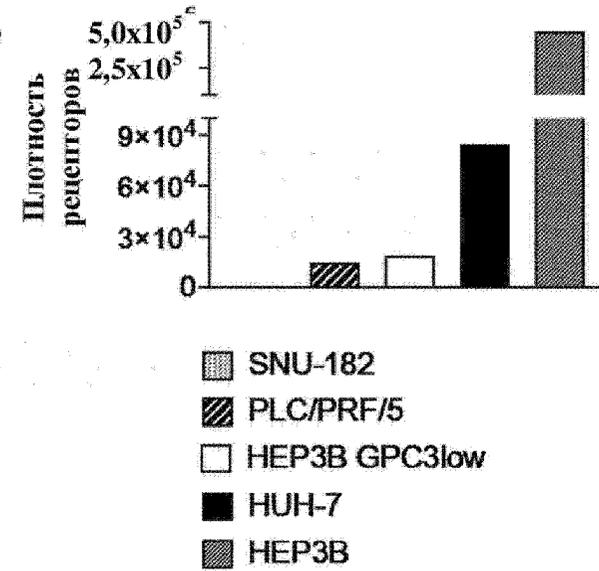
- ◆ GPC3-2 TZ
- GPC3-2 BZ
- ▲ GPC3-2 2BZ
- ▼ GPC3-2 2BBZ
- GPC3-1 TZ
- GPC3-1 BZ
- △ GPC3-1 2BZ
- ▽ GPC3-1 2BBZ
- GPC3-3 BZ
- ▣ GPC3-3 2BBZ
- ⊕ GPC3-4 BZ
- ⊖ UT

Фигура 5

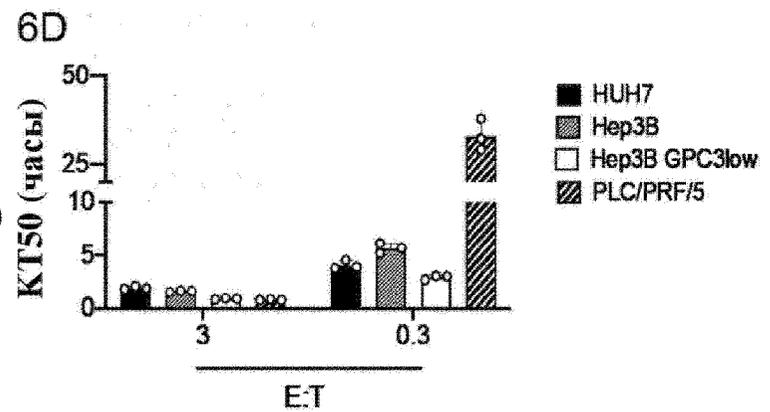
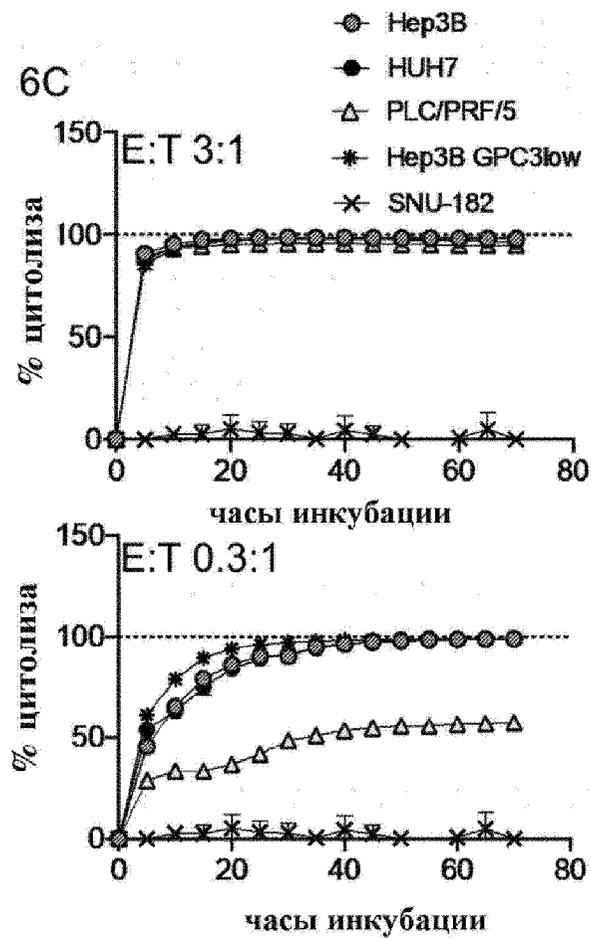
6A



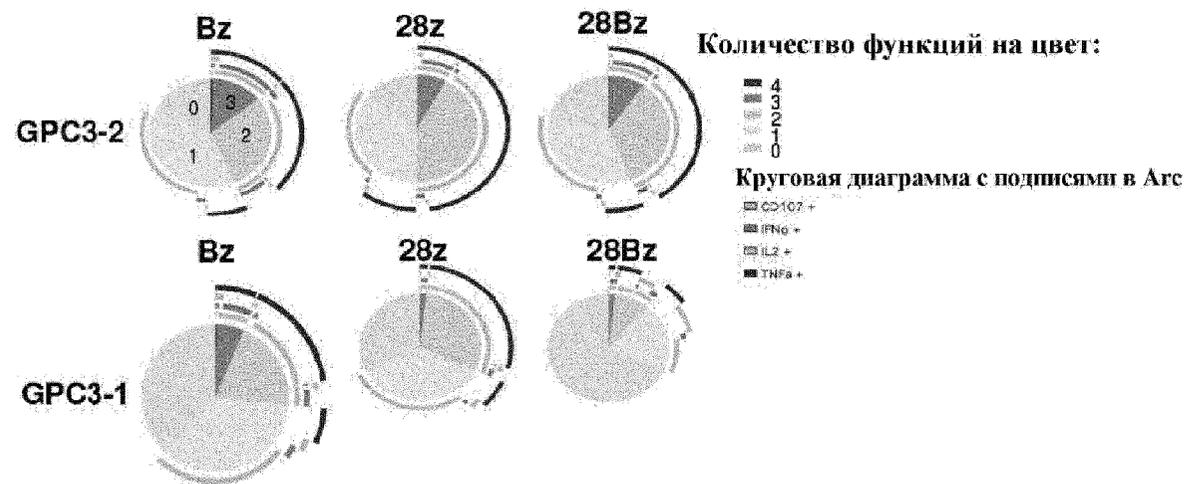
6B



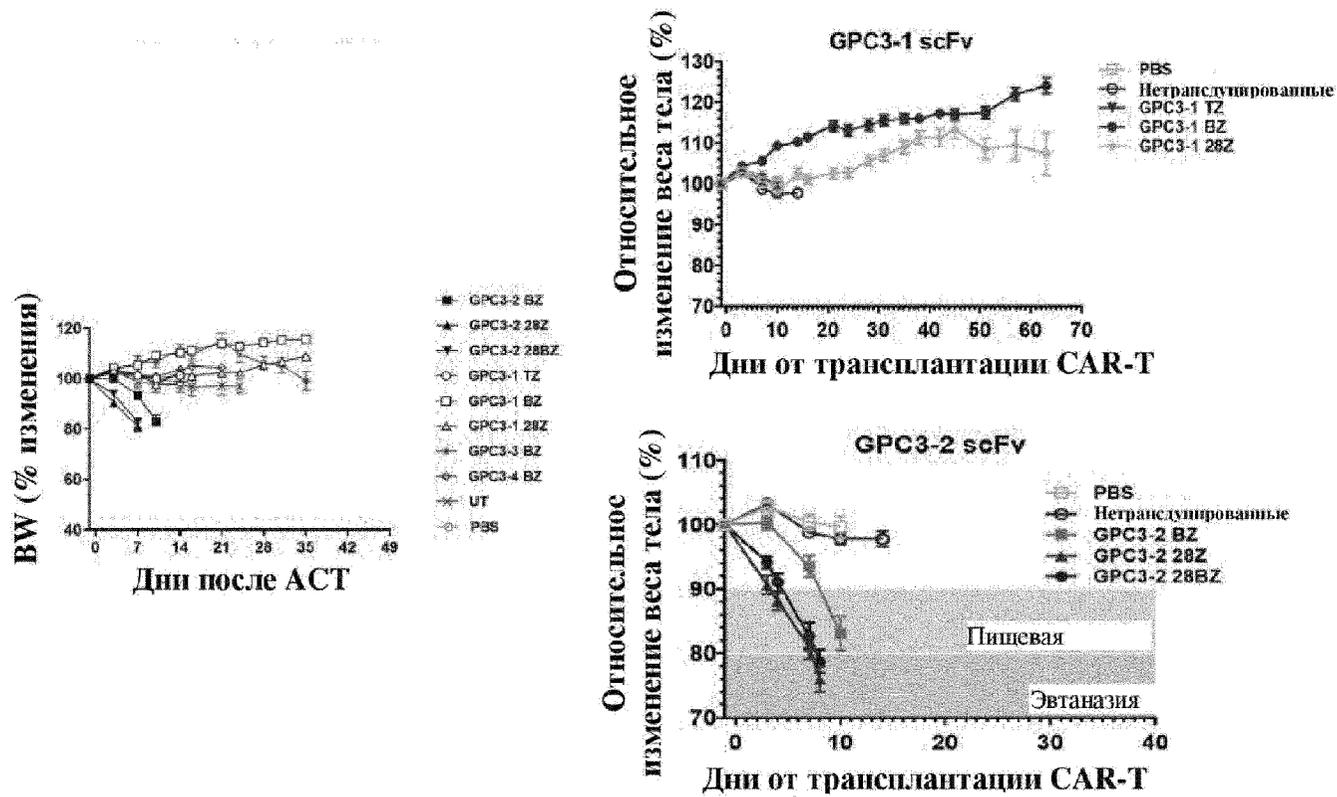
Фигуры 6A-6B



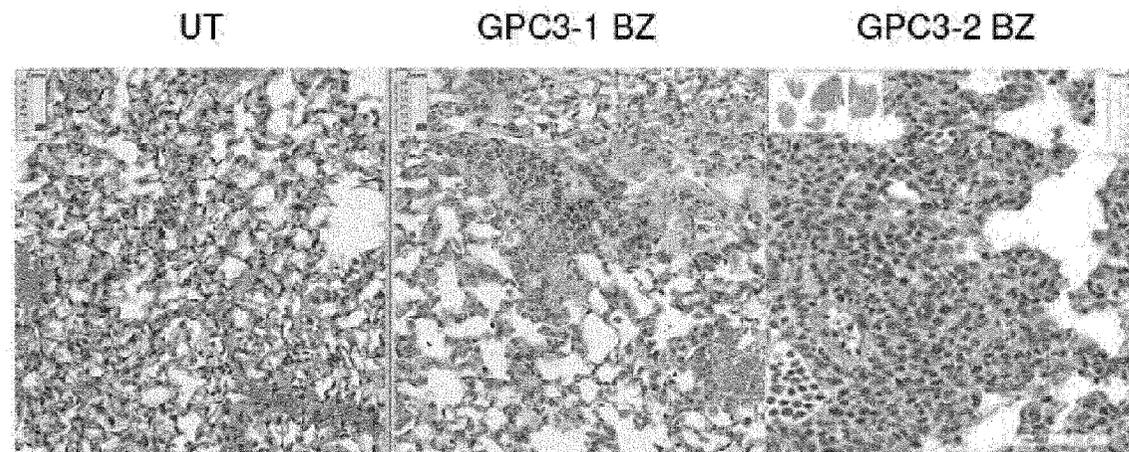
Фигуры 6C-6D



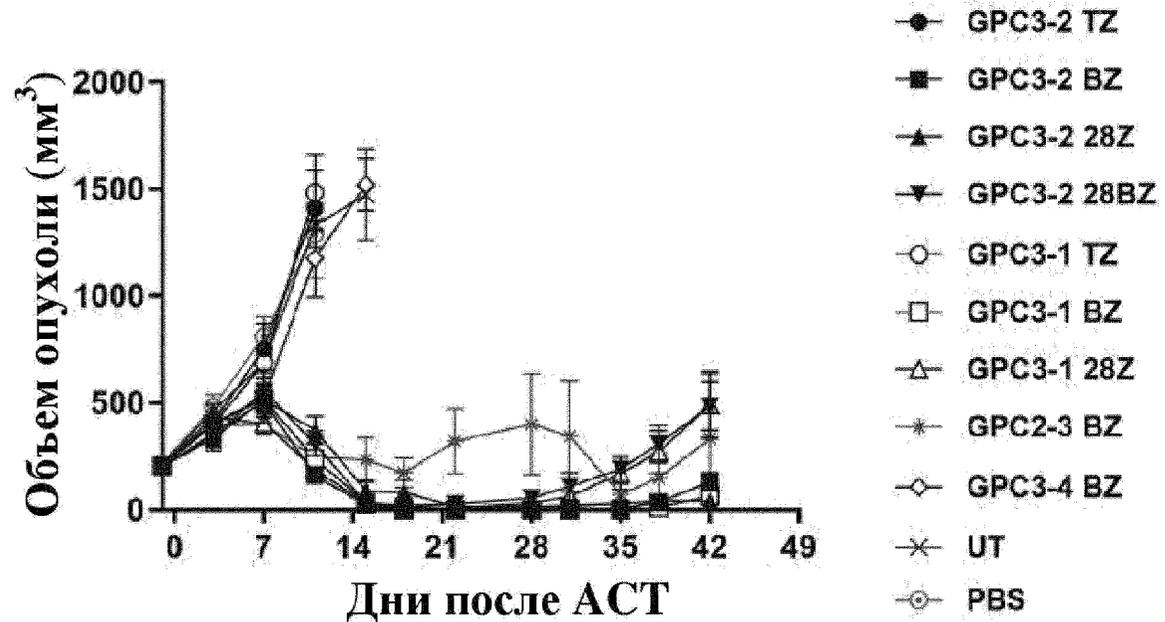
Фигура 7



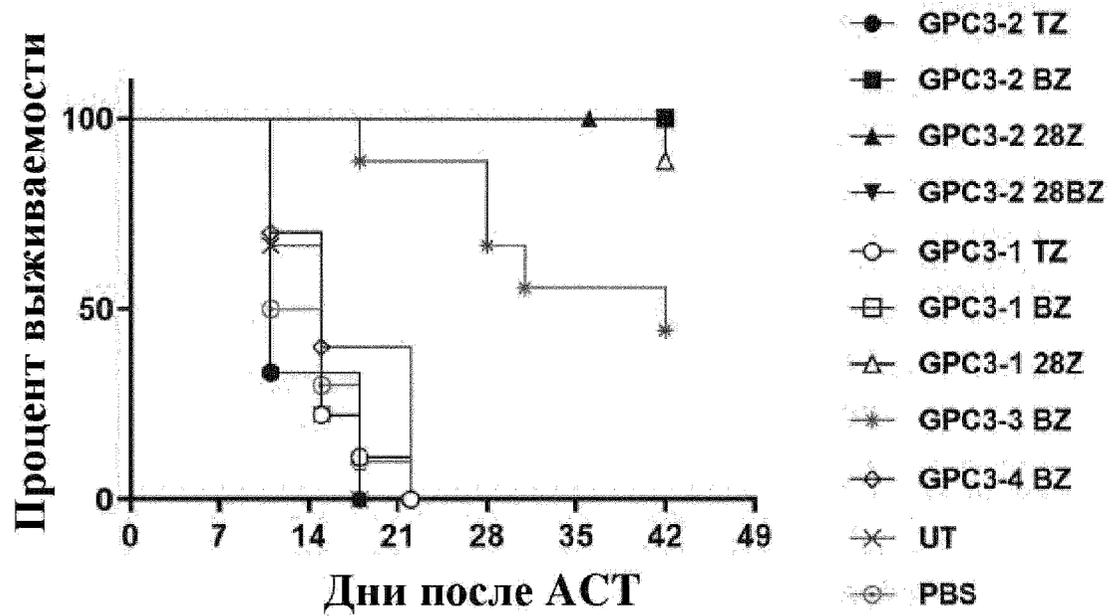
Фигура 8А



Фигура 8В

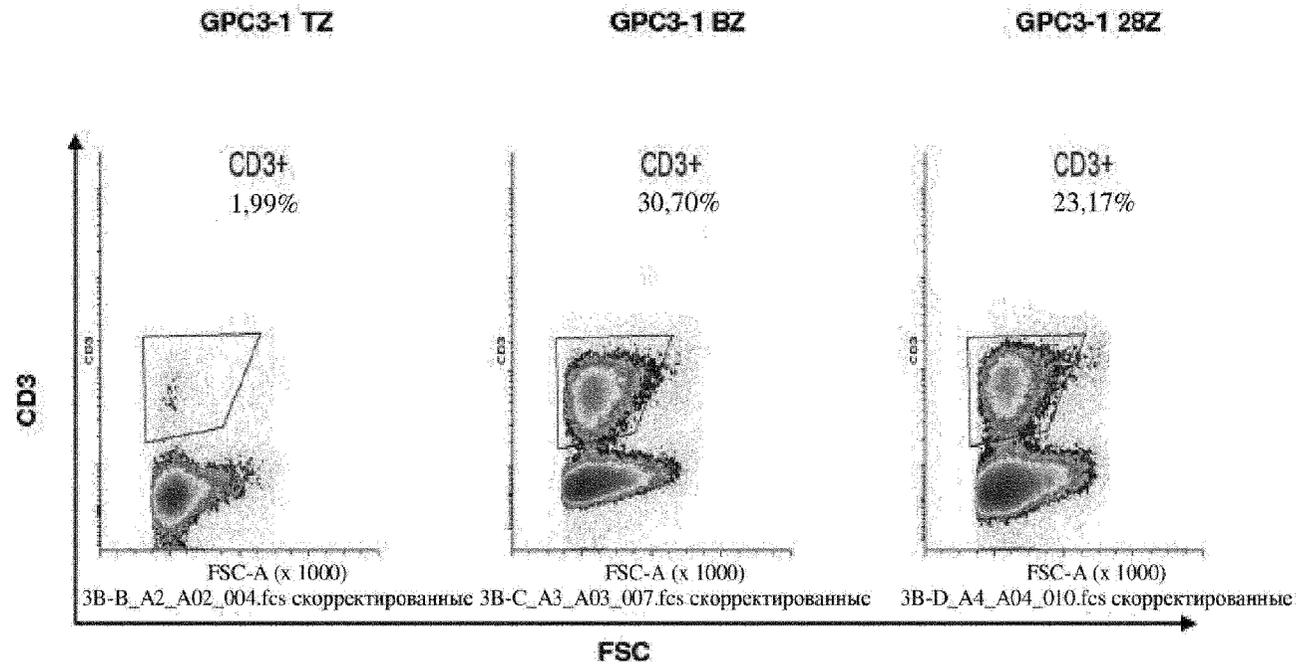


Фигура 9



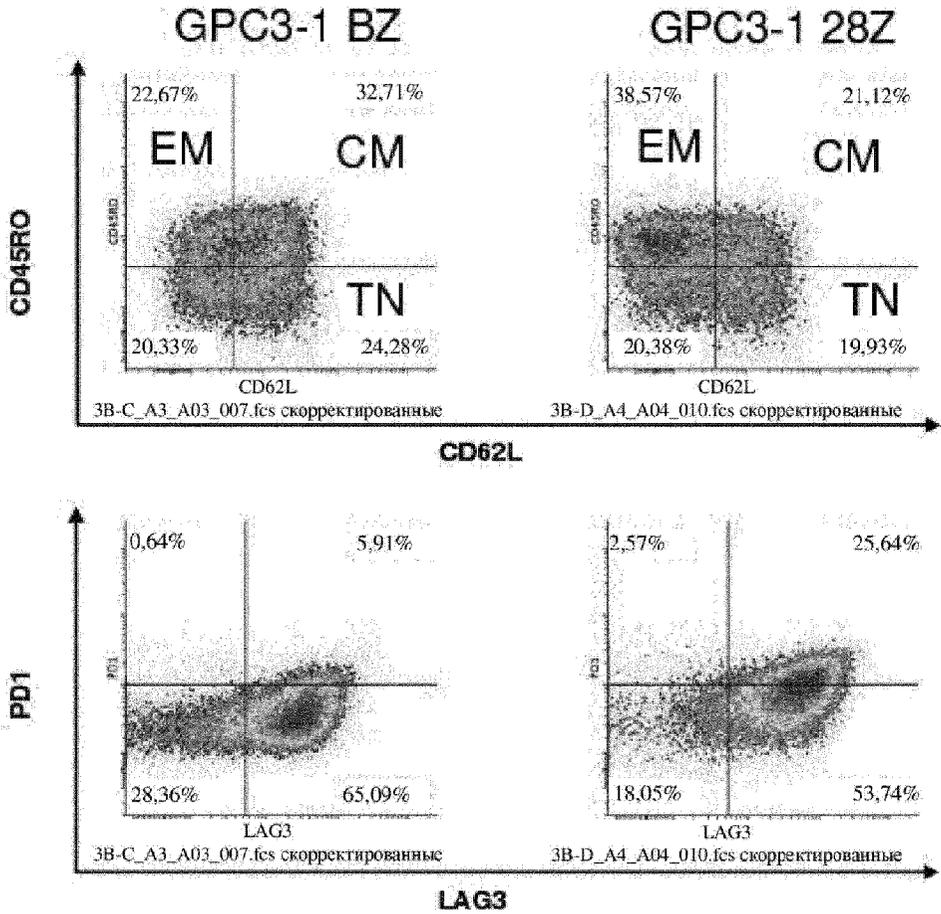
Фигура 10

Селезенка



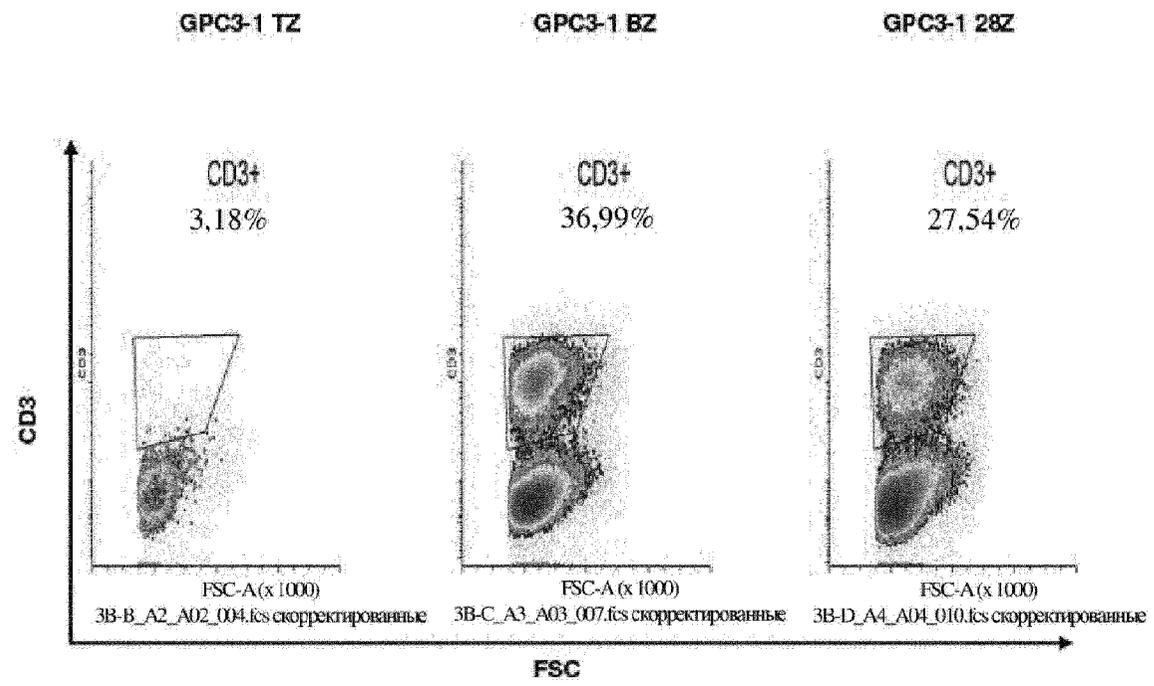
Фигура 11А

Селезенка

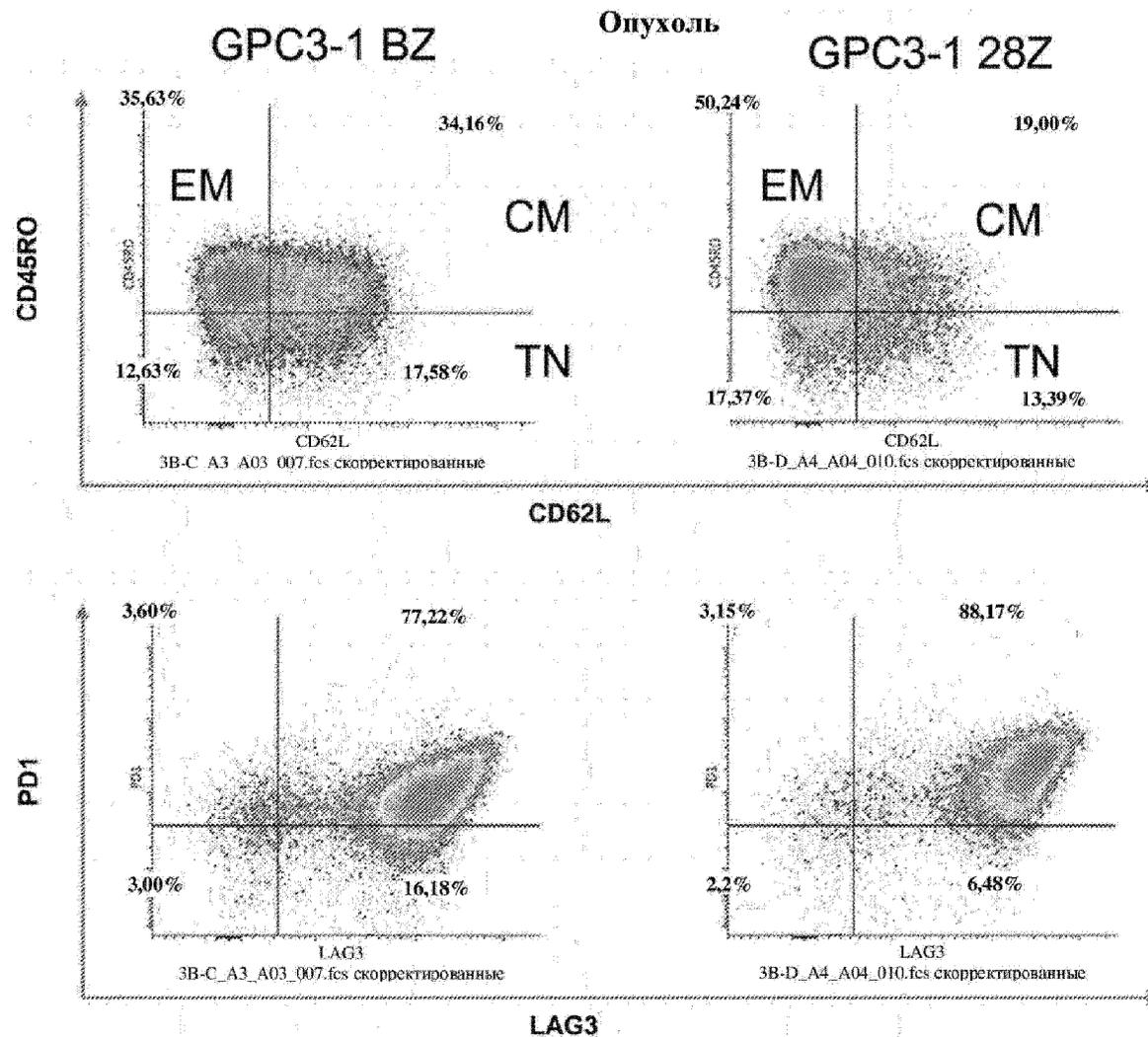


Фигура 11В

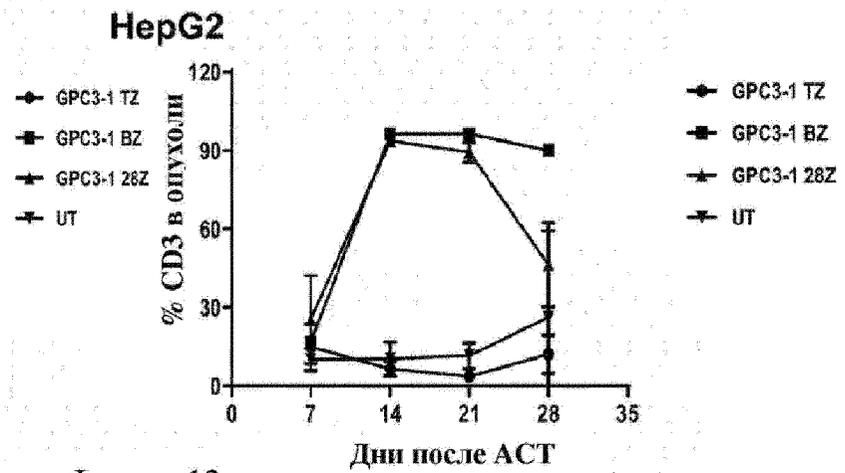
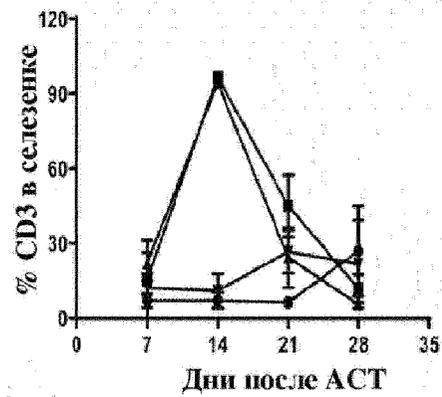
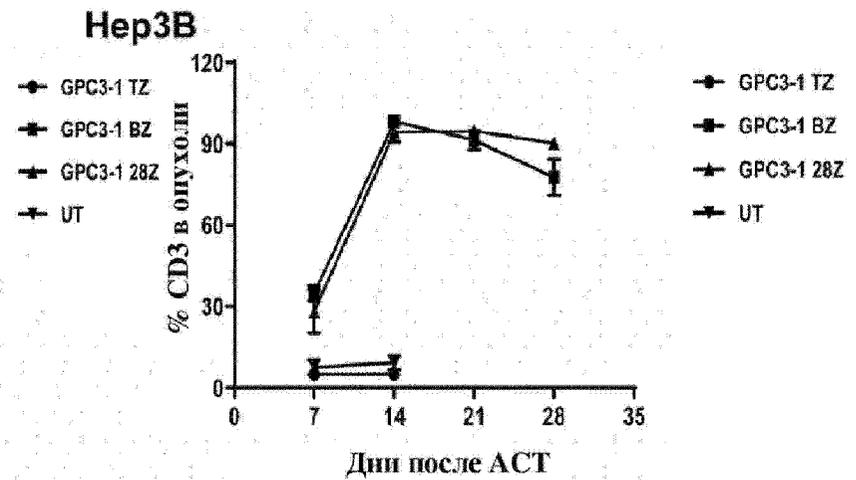
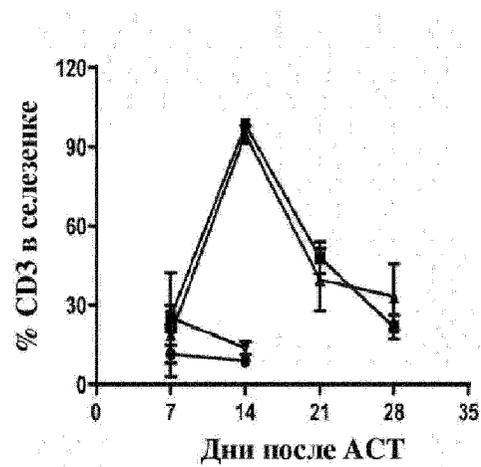
Опухоль



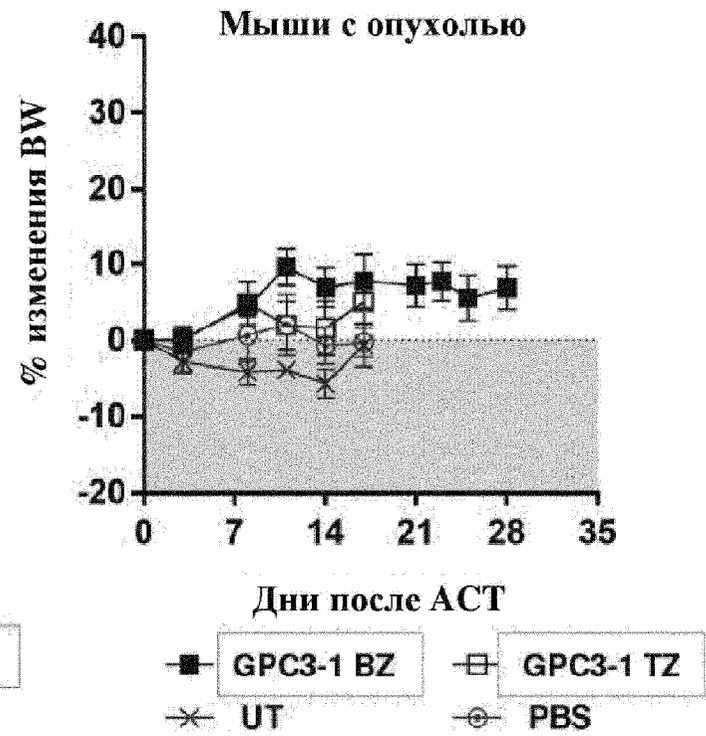
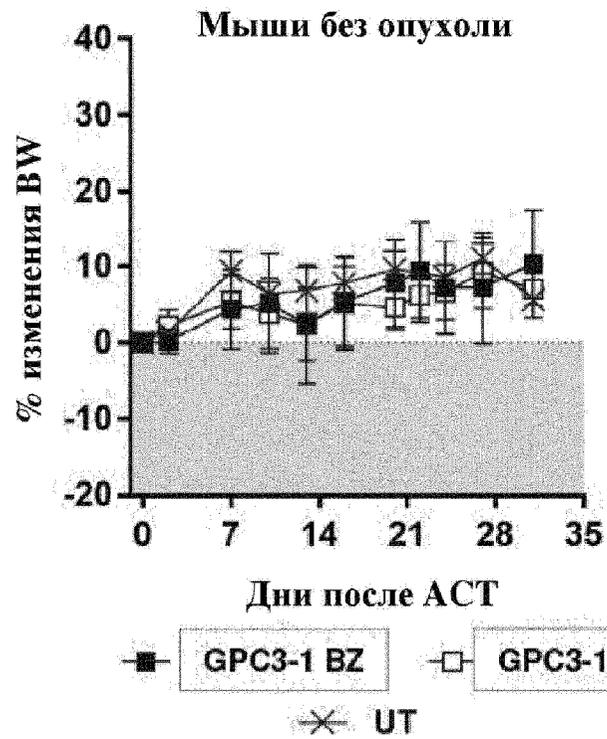
Фигура 11С



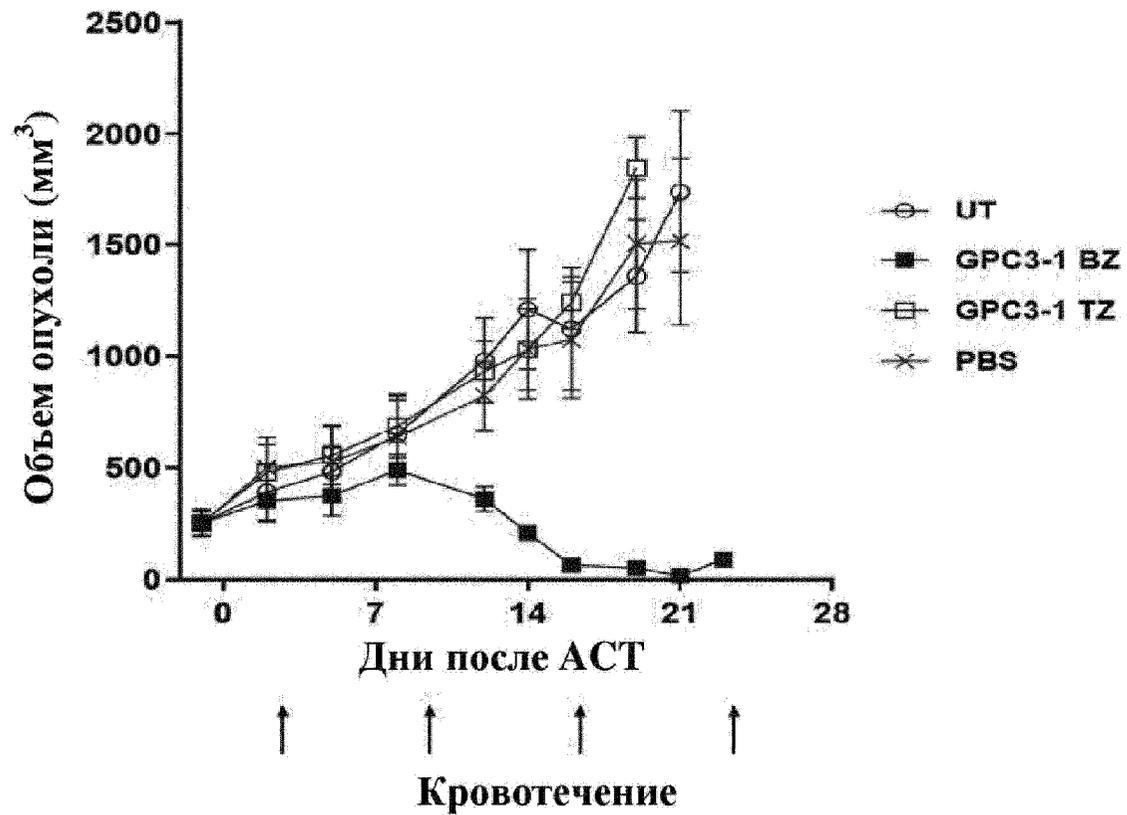
Фигура 11D



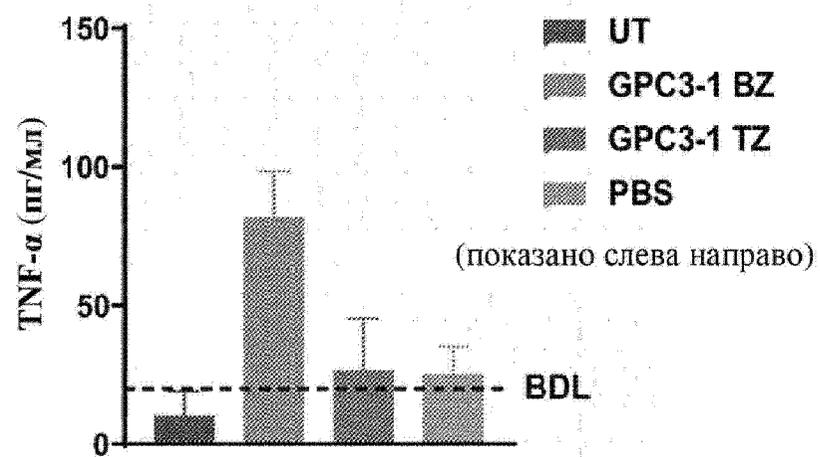
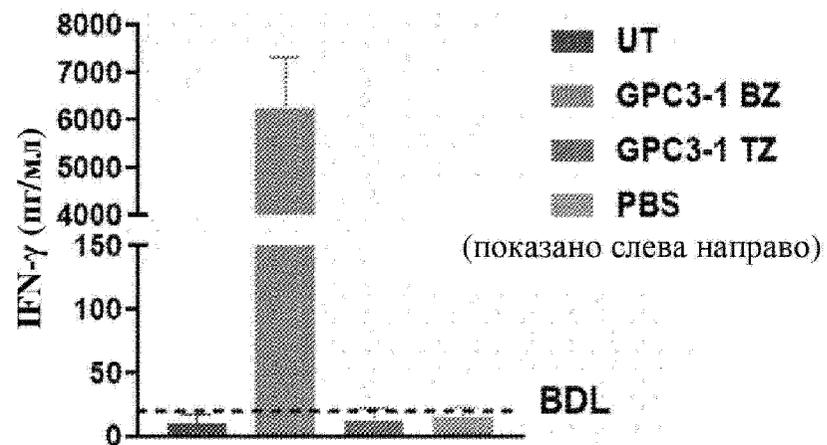
Фигура 12



Фигура 13

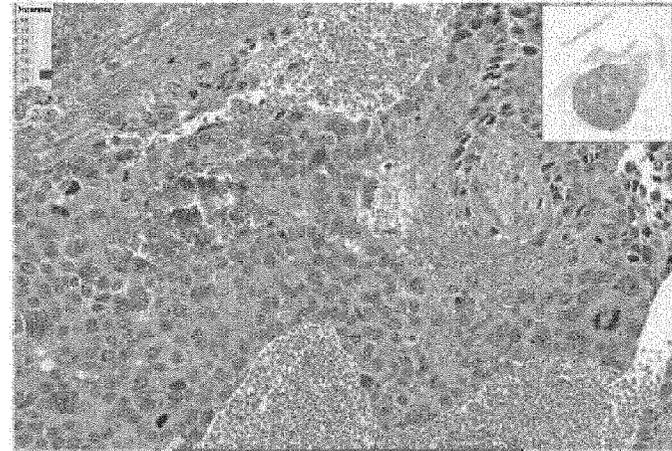


Фигура 14

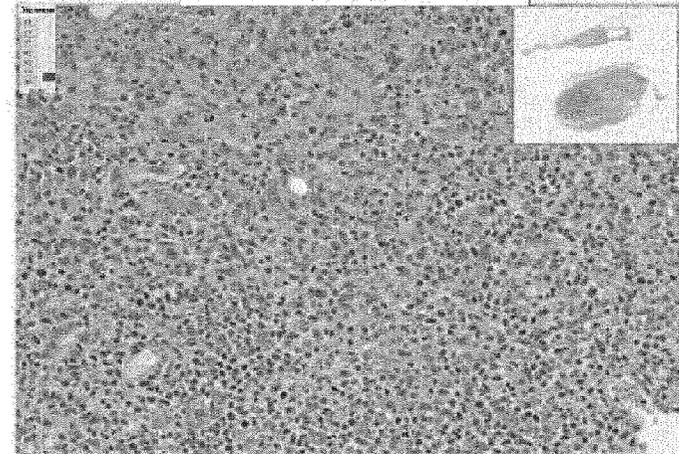


Фигура 15

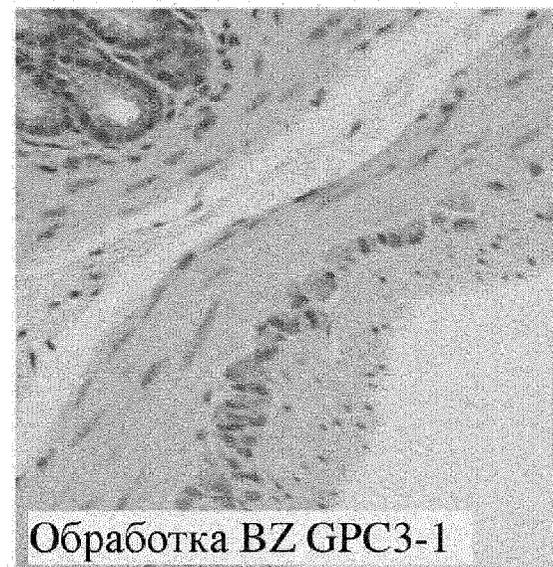
Необработанный контроль



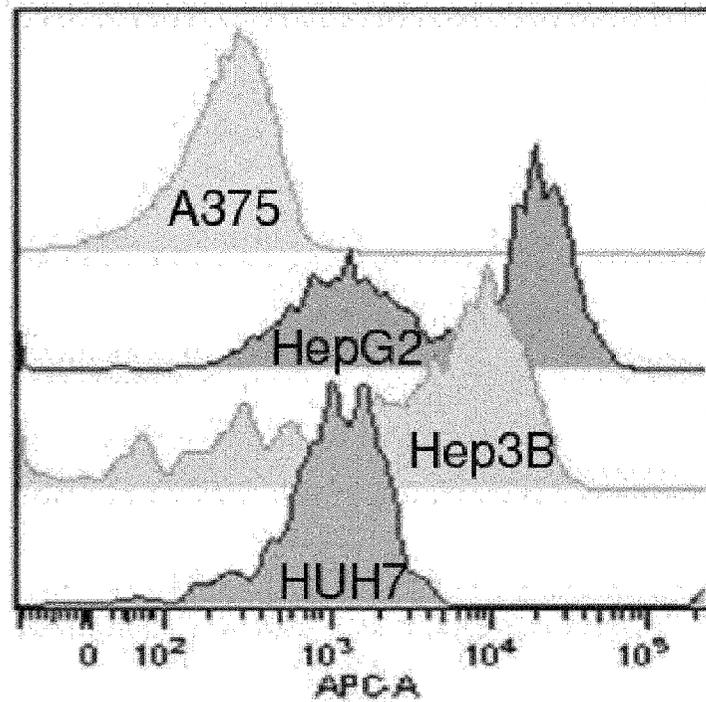
Обработка VZ GPC3-1



Фигура 16

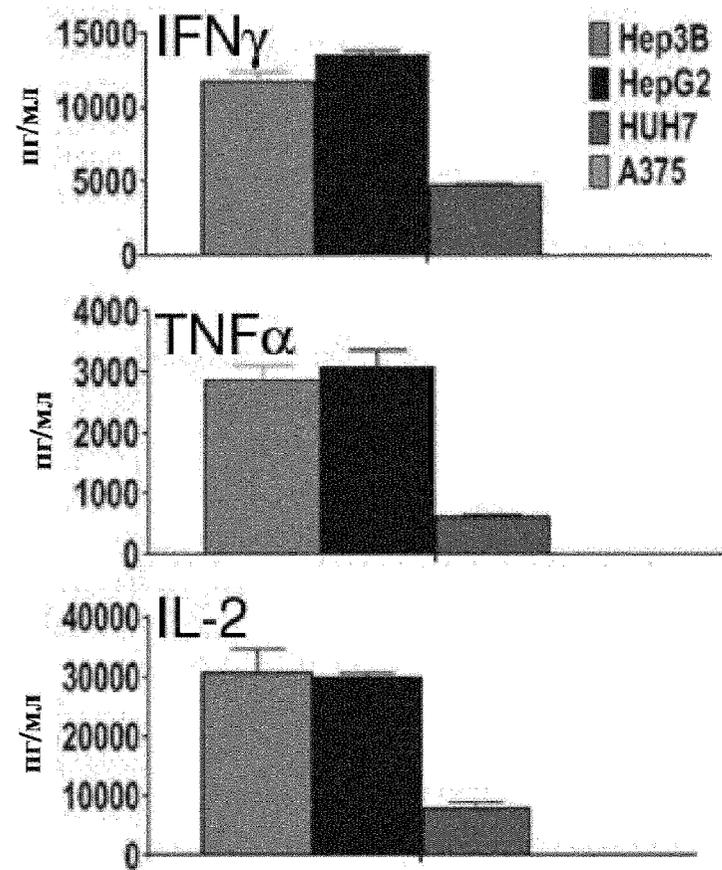


Фигура 17

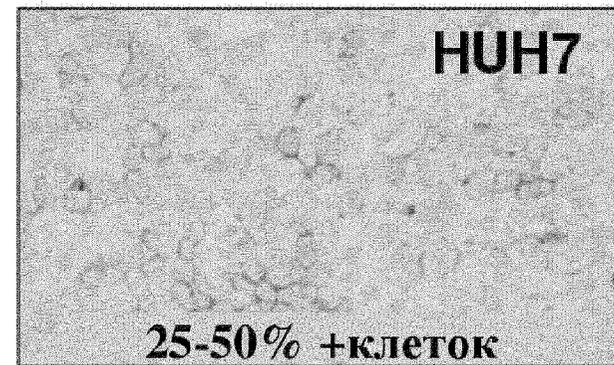
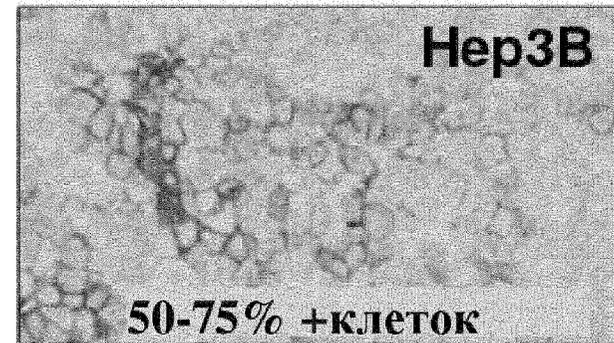


27/38

Фигура 18

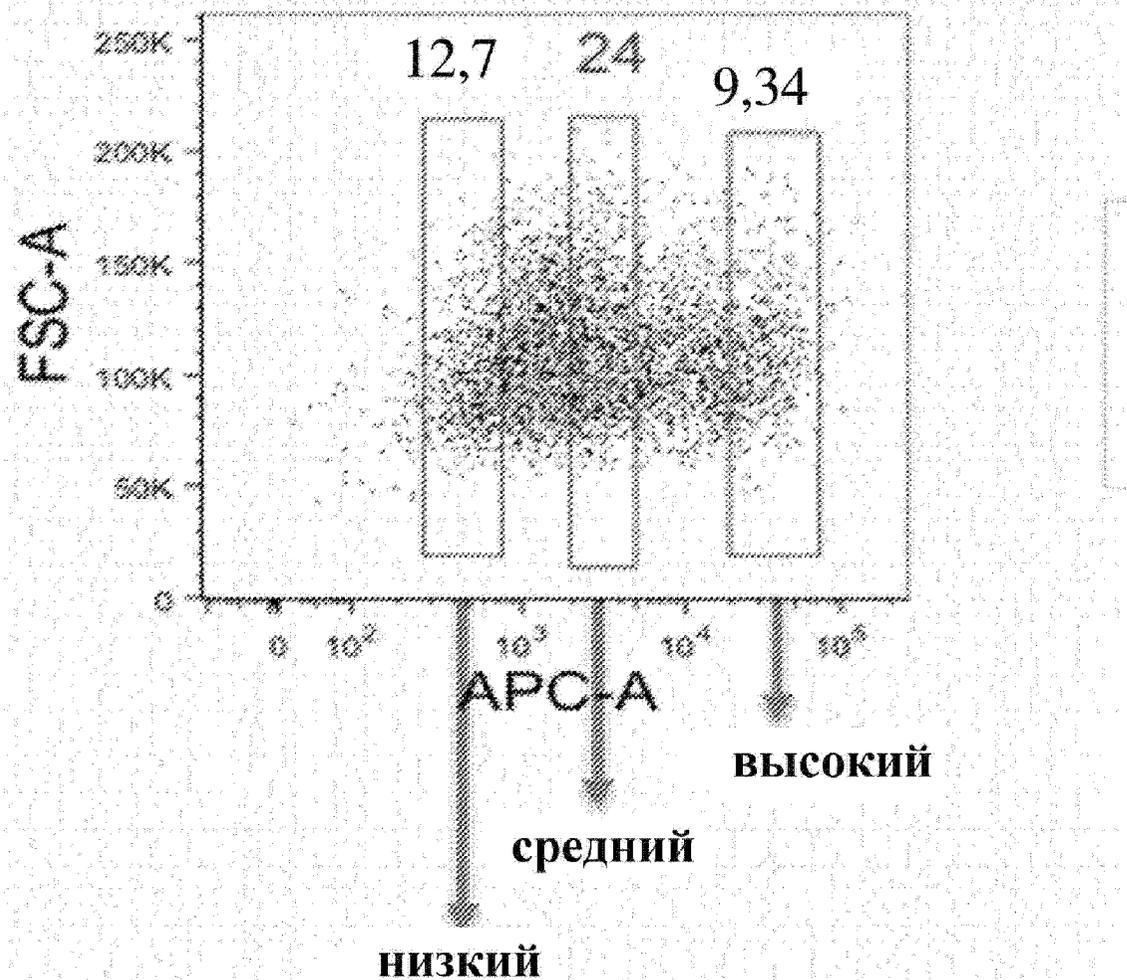


Фигура 19



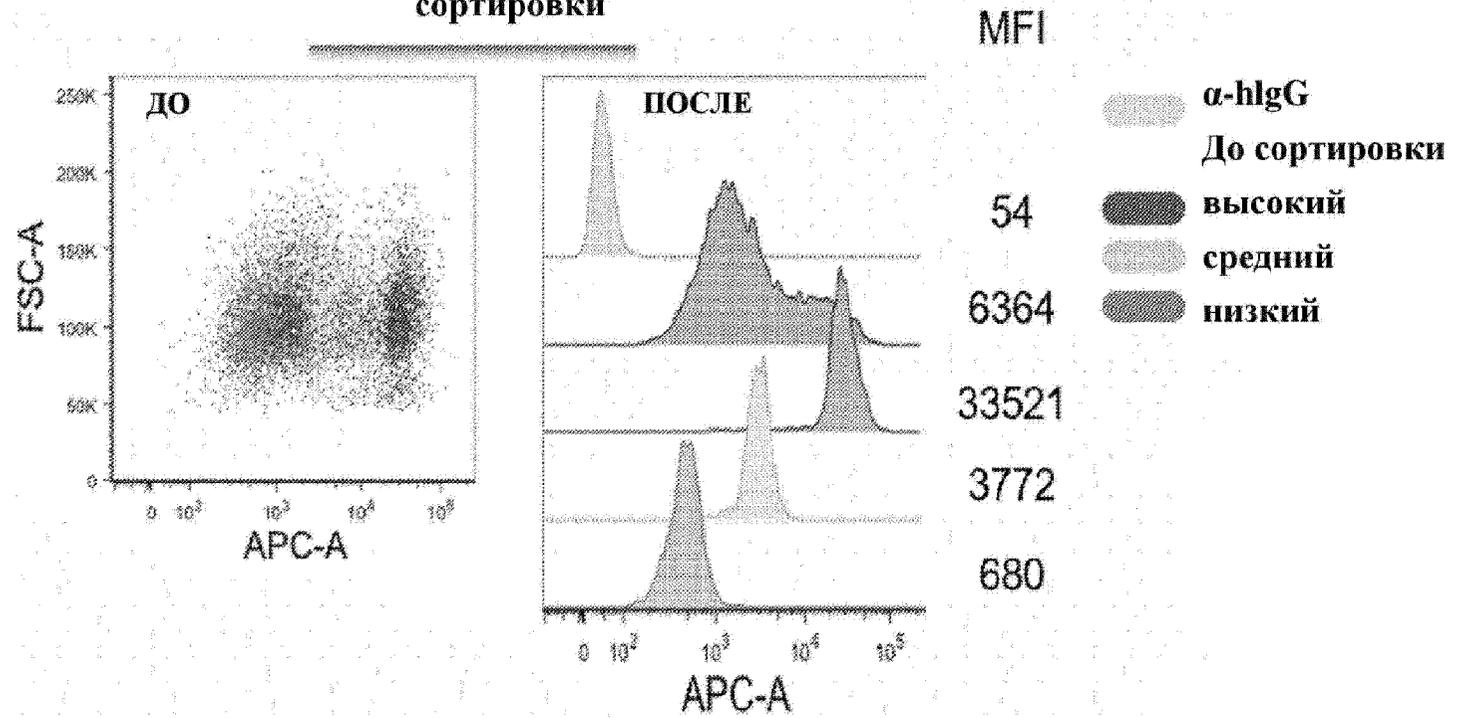
Фигура 20

% каждой отсортированной популяции по сравнению с общей (до сортировки)

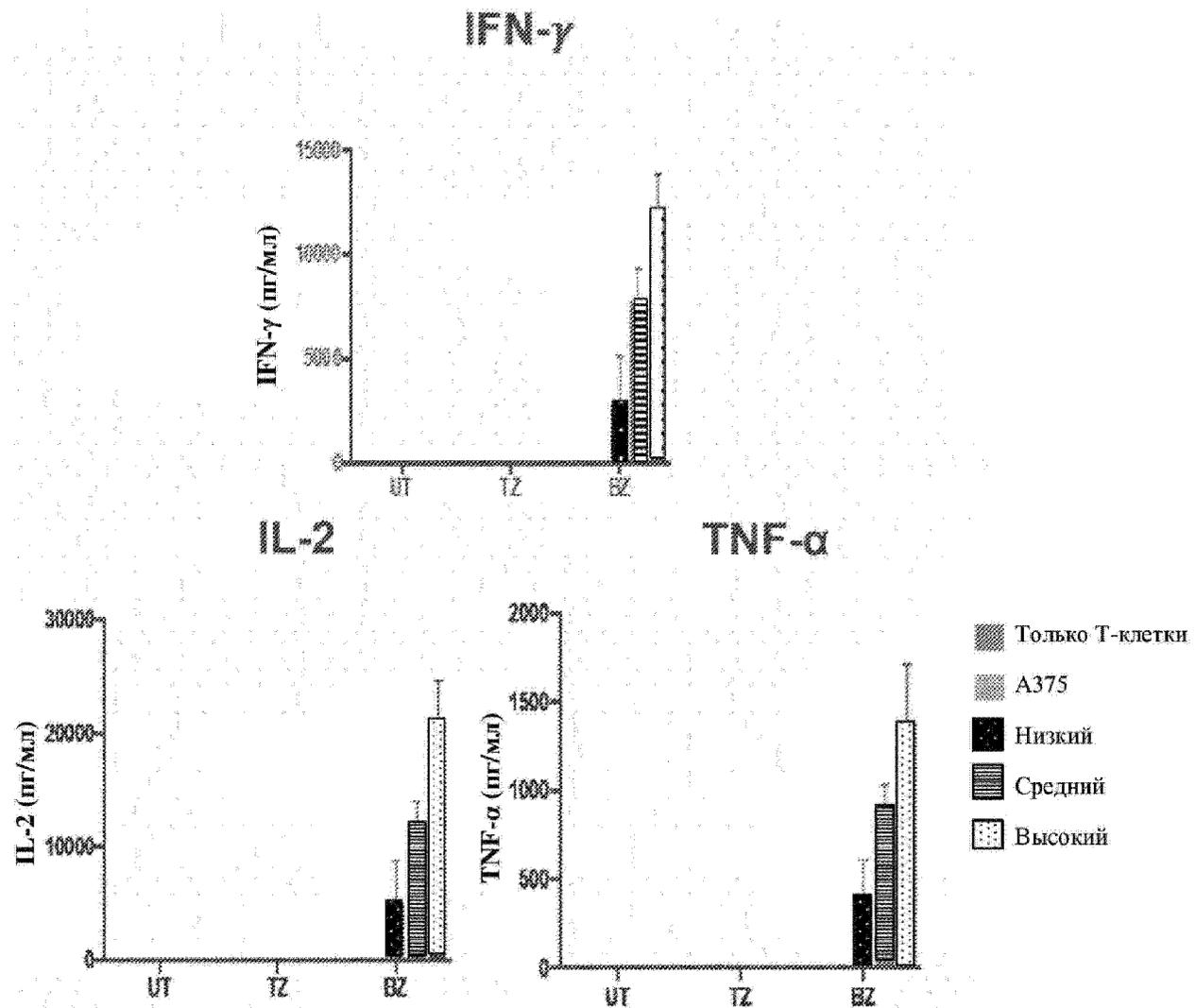


Фигура 21

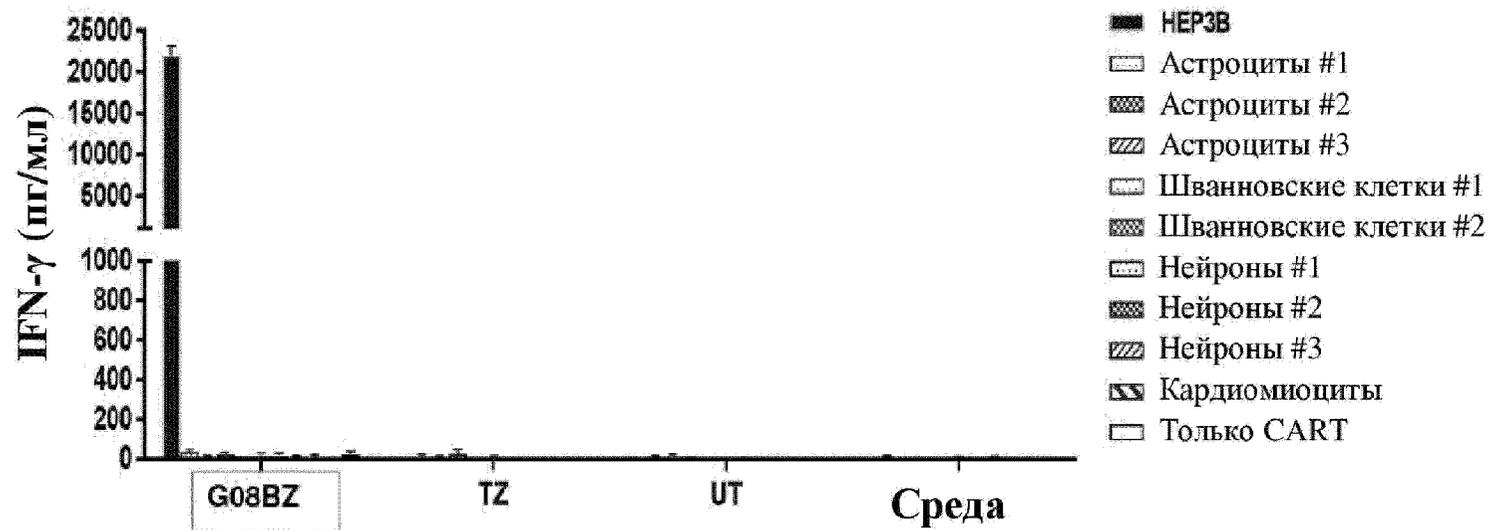
Наложение данных до сортировки и после сортировки



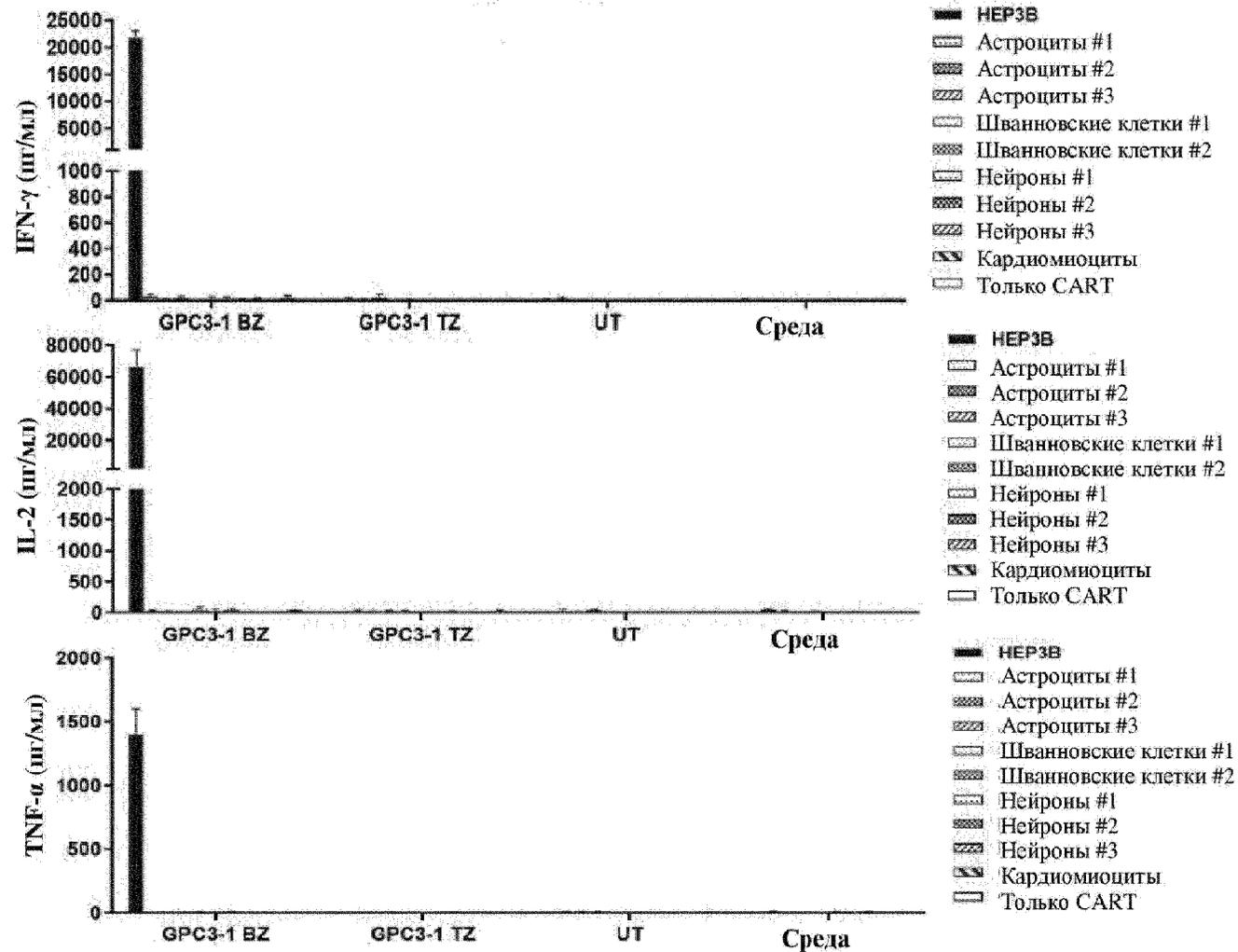
Фигура 21 (продолжение)



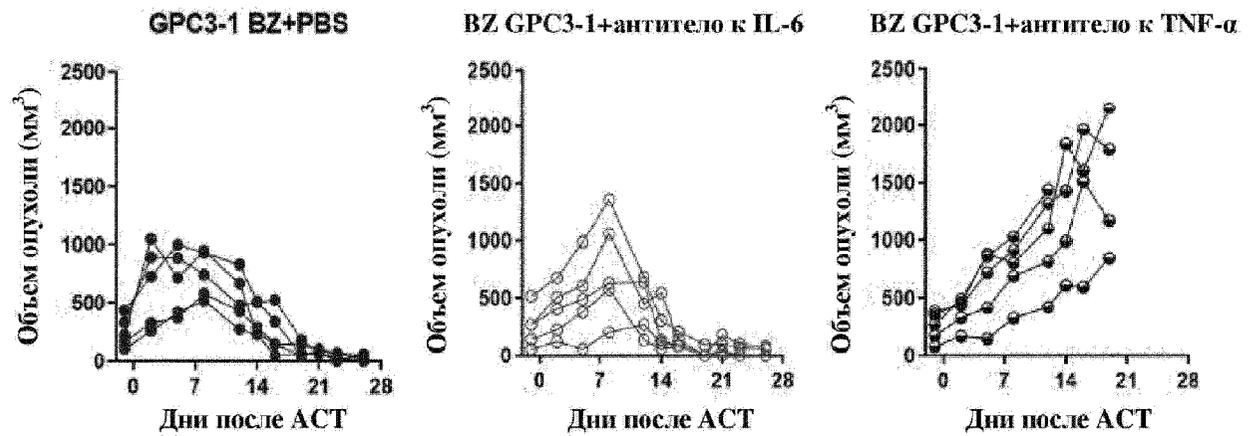
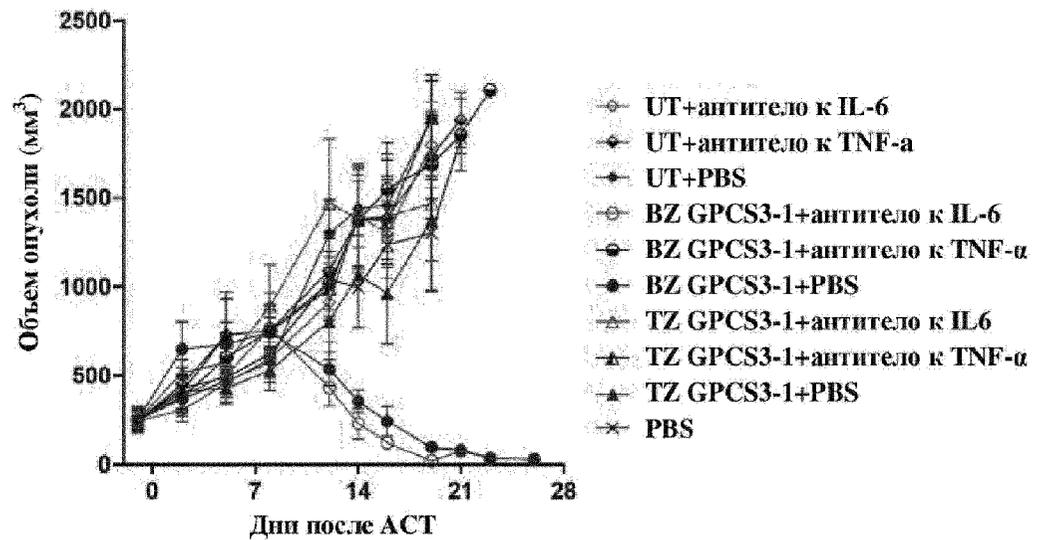
Фигура 22



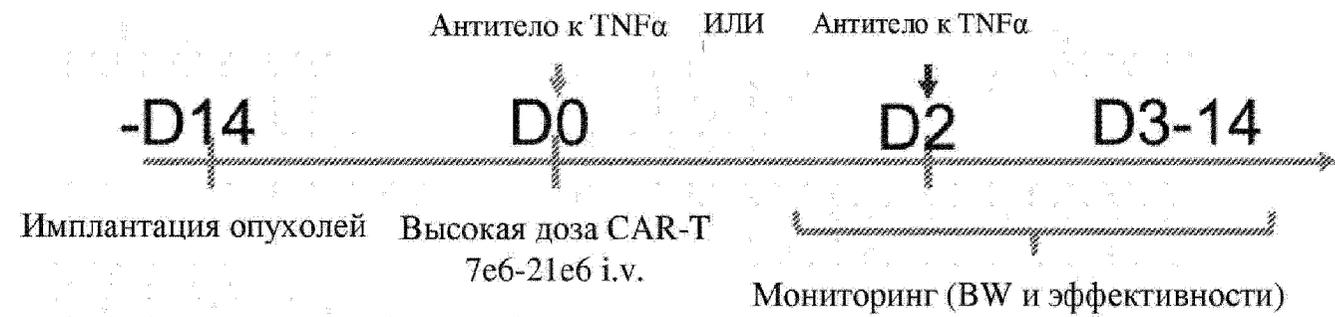
Фигура 23



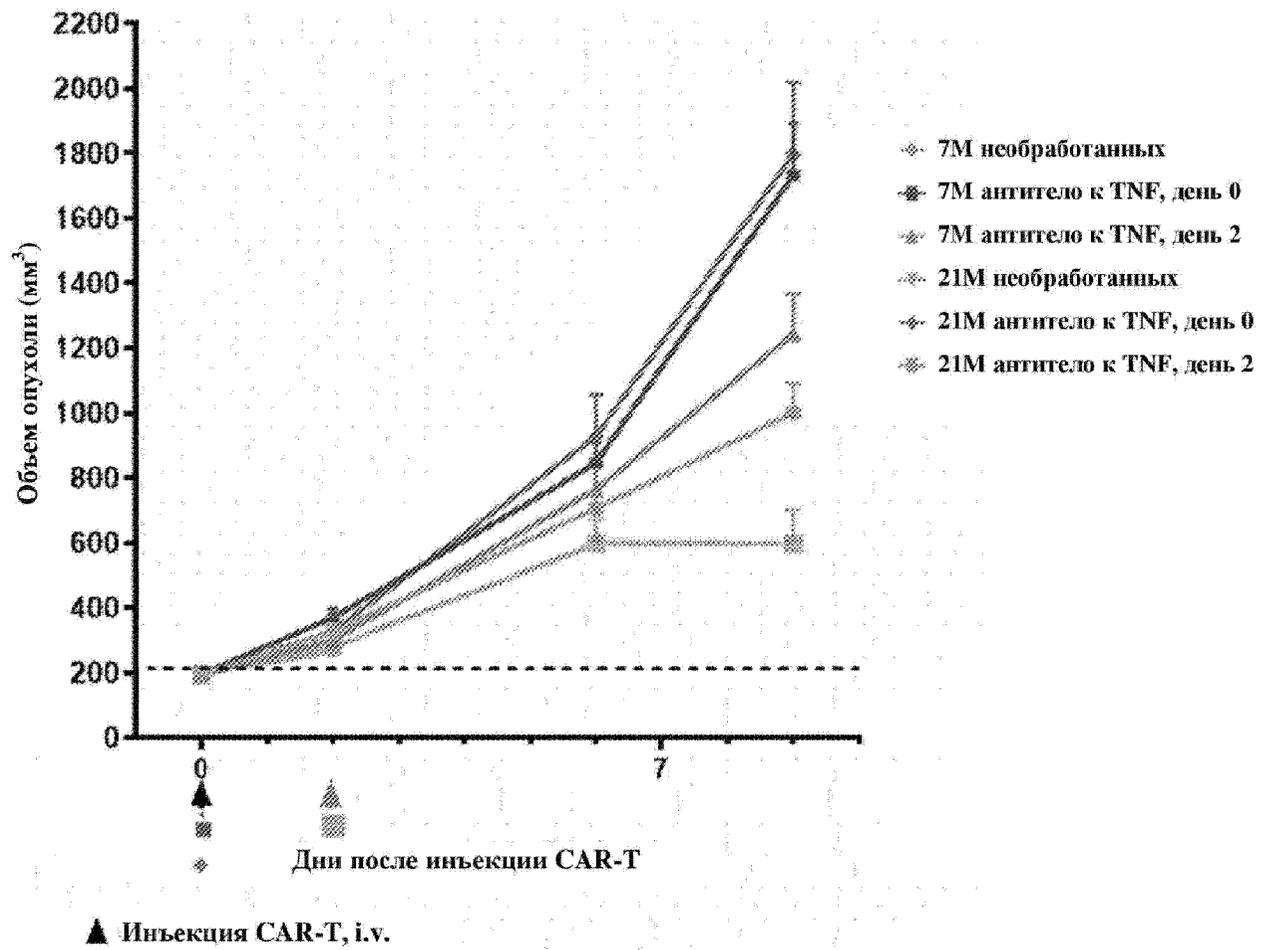
Фигура 24



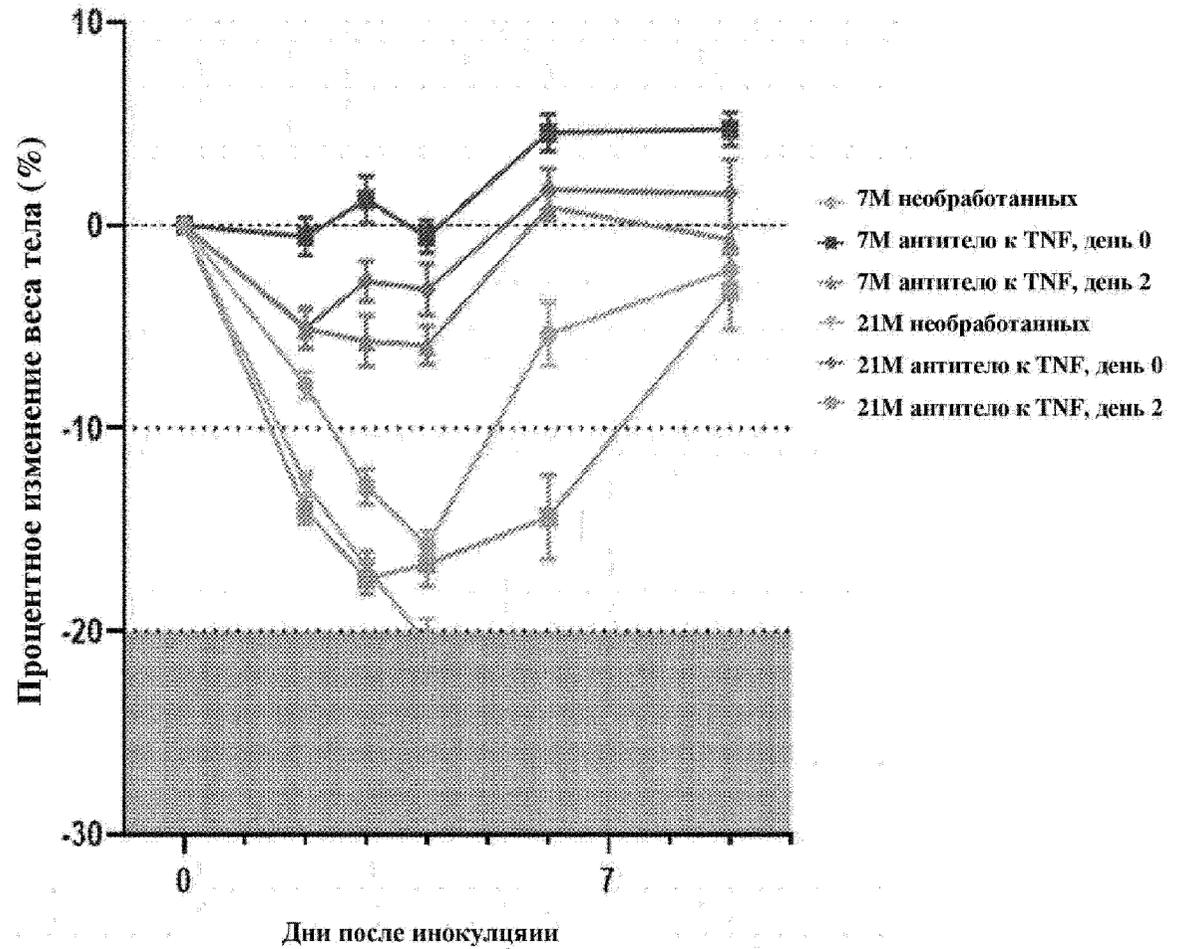
Фигура 25



Фигура 26А



Фигура 26В



Фигура 26С