

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043515**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.30

(21) Номер заявки
201991385

(22) Дата подачи заявки
2018.01.10

(51) Int. Cl. **C12N 15/09** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(54) АНТИ-GPC3-АНТИТЕЛО

(31) **2017-001732**

(32) **2017.01.10**

(33) **JP**

(43) **2019.12.30**

(86) **PCT/JP2018/000257**

(87) **WO 2018/131586 2018.07.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЯМАГУТИ ЮНИВЕРСИТИ;
НЭШНЛ КЭНСЕР СЕНТЕР; НОЙЛ-
ИММЬОН БАЙОТЕК, ИНК. (JP)**

(72) Изобретатель:
**Тамада Кодзи, Сакода Юкими,
Накацура Тецуя, Сайто Кейго (JP)**

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

(56) NAKANO, K. et al., Anti-glypican 3 antibodies cause ADCC against human hepatocellular carcinoma cells, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, vol. 378, p. 279-284, particularly, p. 280, right column, Classification of the mAbs, table 1, ISSN: 0006-291X

WO-A1-2015097928

WO-A1-2004022739

HIPPO, Y. et al., Identification of soluble NH2-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma, Cancer Research, 2004, vol. 64, p. 2418-2423, particularly, p. 2420, left column, third paragraph, fig 1, ISSN: 0008-5472

WO-A1-2016049459

JP-A-2016-523518

WO-A1-2013070468

WO-A1-2016036973

WO-A1-2016056228

NAKATSURA, T., Jpn. J. Clin. Immunol., 2016, vol. 39, no. 3, p. 164-171, particularly, p. 168, right column, fifth paragraph to p. 169, right column, first paragraph, ISSN: 0911-4300 (Era of cancer immunotherapy has come)

(57) Объектом настоящего изобретения являются анти-GPC3 антитело, которое распознает эпитоп, отличный от эпитопов для существующих антител (например, GC33 и GC199) и может специфически связываться, даже в форме одноцепочечного антитела, с GPC3, расположенного на клеточной мембране; CAR, содержащий анти-GPC3 одноцепочечное антитело; иммунокомпетентная клетка, экспрессирующая CAR; ген анти-GPC3 антитела или ген CAR; вектор, содержащий ген анти-GPC3 антитела или ген CAR; клетка-хозяин, в которую введен вектор; способ для специфической детекции GPC3; и набор для специфической детекции GPC3. Антитело, содержащее конкретные CDR1-CDR3 тяжелой цепи и конкретные CDR1-CDR3 легкой цепи по п.1, и специфически связывающееся с полипептидом GPC3 человека, локализованного на клеточной мембране. CAR-иммунокомпетентные клетки, полученные на основе CAR, содержащие такое одноцепочечное антитело, для применения в иммунотерапии злокачественных новообразований.

043515 B1

043515 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к антителу, специфически связывающемуся с GPC3 (глипикан-3) (анти-GPC3-антителу); к химерному антигенному рецептору (также обозначено в настоящем описании как "CAR"), содержащему анти-GPC3 одноцепочечное антитело, трансмембранную область, слитую с карбоксильным (C) концом анти-GPC3 одноцепочечного антитела, и область активации сигнальной трансдукции иммунокомпетентной клетки, слитую с C-концом трансмембранной области; к иммунокомпетентной клетке, экспрессирующей CAR; к гену анти-GPC3-антитела или гену CAR; к вектору, содержащему ген анти-GPC3-антитела или ген CAR; к клетке-хозяину, в которую был введен вектор; к способу детекции GPC3; и к набору для детекции GPC3.

Уровень техники

Глипикан-3 (GPC3) представляет собой белок внеклеточного матрикса, который экспрессируется в эмбриональных тканях, в частности, в печени или почках, и связан с органогенезом. Экспрессия GPC3 не наблюдается в тканях взрослого человека, за исключением плаценты, но наблюдается в тканях различных видов злокачественных опухолей, таких как гепатоцеллюлярная карцинома, меланома, светлоклеточная аденокарцинома яичников и плоскоклеточный рак легких. Таким образом, GPC3 представляет собой белок, который экспрессируется в эмбриональных тканях, например, как в случае белков, таких как α -фетопrotein (AFP) и карциноэмбриональный антиген (CEA), и, поэтому, они классифицируются как эмбриональные антигены карциномы. В частности, GPC3 можно использовать в качестве молекулы-мишени при лечении злокачественного новообразования, в качестве опухолевого маркера и диагностического маркера, поскольку его отличительной чертой является отсутствие экспрессии белка в клетках нормальных тканей и специфическая экспрессия в злокачественных клетках.

GPC3 является членом семейства протеогликанов, которые действуют как внеклеточный матрикс в клеточной адгезии при органогенезе или как рецептор фактора роста клетки. Якорь GPI (гликосилфосфатидилинозитол) добавляется к серину в положении 560, расположенному на карбоксильном (C) конце GPC3. Якорь GPI играет роль в локализации GPC3 на поверхности клетки через ковалентное связывание с липидом клеточной мембраны. Кроме того, серин в положении 495 и серин в положении 509 GPC3 модифицированы цепью гепарансульфата (HS-цепью). HS-цепь, как известно, регулирует множество путей передачи сигнала, связанных с ростом, таких как путь передачи сигнала Wnt, FGF и BMP. Известно, что путь передачи сигнала, связанный с ростом, различается у разных типов злокачественных новообразований. Например, при гепатоцеллюлярной карциноме (HCC) клетки растут при стимуляции сигнального пути Wnt. Общим признаком семейства глипиканов является избыточное количество цистеина, в количестве 16, во внеклеточной области, и считается, что эти цистеиновые остатки способствуют образованию стабильной конформации путем образования множества внутримолекулярных дисульфидных связей. Сообщалось о возможности расщепления фурин-конвертазой GPC3 на поверхности клеточной мембраны между аргинином (R) в положении 358 и серином (S) в положении 359 (R358/S359). Однако, поскольку амино (N)-концевая субъединица GPC3 перекрестно связана посредством внутримолекулярных дисульфидных связей, то даже при расщеплении фурин-конвертазой на две субъединицы, N-концевую субъединицу и C-концевую субъединицу, GPC3 вероятно может сохранять свою полноразмерную структуру без диссоциации этих субъединиц. Структура растворимого GPC3 остается под вопросом. Таким образом, существует множество вопросов относительно конформации GPC3, локализованной на клеточной мембране, включая также структуры изоформ GPC3.

GPC3 на клеточной мембране имеет сложную структуру. Поэтому, для получения анти-GPC3 антитела было бы желательным, чтобы самой простой структурной областью был эпитоп. Существующий пример анти-GPC3 антитела представляет собой моноклональное антитело 1G12, которое доступно от BioMosaics, Inc. Это антитело представляет собой антитело, полученное путем иммунизации мышей Balb/c антигеном (C-концевой полипептид GPC3 из 70 остатков), разработанным в обход сложной структуры или локализации GPC3, с получением гибридом и для скрининга гибридом с помощью этого антигена. Антитела GC33 и GC199, разработанные японским фармацевтическим производителем, также являются моноклональными антителами, созданными на основе той же концепции, что и выше, и представляют собой антитела, полученные с помощью C-концевого фрагмента GPC3, использованного в качестве антигена (патентный документ 1).

Документы уровня техники

Патентный документ/

Патентный документ 1: Японский патент № 4011100.

Сущность изобретения

Задача, решаемая изобретением.

Объектом настоящего изобретения является: анти-GPC3 антитело, которое распознает эпитоп, отличный от эпитопа существующих антител (например, GC33 и GC199), и которое может специфически связываться, даже в форме одноцепочечного антитела, с GPC3, расположенным на клеточной мембране; CAR, содержащий анти-GPC3 одноцепочечное антитело; иммунокомпетентная клетка, экспрессирующая CAR; ген анти-GPC3 антитела или ген CAR; вектор, содержащий ген анти-GPC3 антитела или ген CAR; клетка-хозяин, в которую введен указанный вектор; способ специфической детекции GPC3; и набор для

специфической детекции GPC3.

Средства решения задачи.

Авторы изобретения провели ряд тщательных исследований и создали настоящее изобретение. В ходе этих исследований авторы изобретения получили новое анти-GPC3 антитело методом фагового дисплея, который отличается от обычных способов получения моноклональных антител, включающих получение гибридом. В частности, с помощью В-клеток, полученных от мышей, иммунизированных полноразмерным GPC3 человека, была синтезирована иммунная библиотека генов антител, и гены были преобразованы в библиотеку одноцепочечных антител (scFv), которая была затем включена в фаговый дисплей и экспрессирована на поверхности фага, а затем селектирована биопаннингом с помощью рекомбинантного полноразмерного GPC3 человека и GPC3-экспрессирующих клеточных линий, и затем, при необходимости, конкурентным С-концевым полипептидом GPC3 в качестве эпитопа существующих антител, с получением анти-GPC3-антитела. Также было подтверждено, что полученное анти-GPC3 антитело может использоваться для иммунотерапии злокачественных новообразований, используя Т-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR) (также называемые "CAR-Т-клетки"). Настоящее изобретение было осуществлено на основании этих обнаружений.

В частности, настоящее изобретение представляет собой следующее.

[1] Антитело, специфически связывающееся с GPC3 (полипептид, полученный из (гликана-3)) человека, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 155 (в настоящем документе также обозначен как "антитело по настоящему изобретению"), где антитело (1-1) содержит определяющую комплементарность область (CDR) 1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и CDR1 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6; или

(2-1) содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11, CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12, и CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, и CDR1 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, CDR2 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, и CDR3 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16; или

(3-1) содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, и CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, и CDR1 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24, CDR2 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25, и CDR3 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26; или

(4-1) содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31, CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 32, и CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33, и CDR1 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34, CDR2 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35, и CDR3 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36; или

(5-1) содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41, CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42, и CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43, и CDR1 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44, CDR2 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 45, и CDR3 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46; или

(6-1) содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51, CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52, и CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53, и CDR1 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54, CDR2 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 55, и CDR3 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 56; или

(7-1) содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 61, CDR2 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 62, и CDR3 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 63, и CDR1 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 64, CDR2 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 65, и CDR3 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66; или

(8-1) содержит CDR1 тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID

настоящем описании также обозначен как "ген CAR по настоящему изобретению").

[12] Ген антитела, кодирующий антитело по любому из [1]-[4] и [6].

[13] Вектор, содержащий промотор и ген антитела по [11] или ген CAR, кодирующий CAR по [11], функционально связанный с расположенным ниже в сигнальном пути промотором (в настоящем описании также обозначен как "вектор по настоящему изобретению").

[14] Вектор, содержащий промотор и ген антитела по [12], функционально связанный с расположенным ниже в сигнальном пути промотором.

[15] Клетка-хозяин, в которую введен вектор по [13] или [14] (в настоящем описании также обозначена как "клетка-хозяин по настоящему изобретению").

[16] Способ детекции GPC3 (глипикан-3), включающий стадию детекции GPC3, используя антитело по любому из [1]-[6] (в настоящем описании также обозначен как "способ детекции по настоящему изобретению").

[17] Набор для детекции GPC3 (глипикан-3), содержащий антитело по любому из [1]-[6], или его меченную форму (в настоящем описании также обозначен как "набор для детекции по настоящему изобретению").

Примеры других вариантов осуществления настоящего изобретения включают антитело по настоящему изобретению для применения для детекции GPC3 и способ получения антитела по настоящему изобретению, включающий стадии: иммунизацию животных, исключая человека (например, мышей и крыс), полноразмерным GPC3 человека, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 157; синтез кДНК реакцией обратной транскрипции из общей РНК В-клеток, полученных от иммунизированных животных, исключая человека, и амплификацию генов антитела с получением библиотеки генов антитела; и конструирование фаговой библиотеки scFv из библиотеки генов антитела, и инфицирование E.coli библиотекой так, чтобы клетки экспрессировали scFv, с последующим биопэннингом, используя полноразмерный GPC3 человека и линии, GPC3-экспрессирующей, и, если необходимо, дополнительно, конкурентный С-концевой полипептид GPC3 (полипептид GPC3 человека, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 156).

Эффект изобретения.

Антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело, специфически связывающееся с GPC3, локализованным на клеточной мембране, не только в форме IgA, но также в форме scFv. CAR-Т клетки, использующие антитело по настоящему изобретению в качестве scFc в CAR, обладают отличной цитотоксической активностью и способностью продуцировать IFN-γ. Следовательно, антитело по настоящему изобретению можно использовать в иммунотерапии злокачественных новообразований.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 приведена диаграмма, демонстрирующая каждый раунд (стадию) биопэннинга, состоящий из 5 типов рядов (А-Е серии). Серия А предусматривает проведение 3 раундов биопэннинга с рекомбинантным GPC3, иммобилизованным на магнитных бусах в качестве затравки, и проведение биопэннинга в 4-ом и 5-ом раунде с GPC3-экспрессирующей клеточной линией в качестве затравки (5-ый раунд проводят только для 1413 #3). В 1-4 раундах в качестве конкурентных антител добавляли существующие анти-GPC3 антитела (GC33 и GC199). Серия В предусматривает проведение биопэннинга с GPC3-экспрессирующими клетками в качестве затравки в присутствии конкурентных антител после 2-ого раунда серии А. Серия Е предусматривает проведение биопэннинга с рекомбинантным GPC3, иммобилизованным на магнитных бусах в качестве затравки в отсутствие конкурентного антитела после 3-его раунда серии А. В серии С в отсутствие конкурентных антител проводили 4 раунда биопэннинга: 2 раунда с GPC3-экспрессирующей клеточной линией в качестве затравки и 2 раунда с рекомбинантным GPC3, иммобилизованным на магнитных бусах, в качестве затравки. Серия D предусматривает проведение такого же биопэннинга как и в серии А в отсутствие конкурентных антител.

На фиг. 2 представлена диаграмма, показывающая результаты проточной цитометрии (FCM) с использованием 18 типов клонов анти-GPC3 scFv (TF1413-02d023, 02d028, 02d030, 02d039, 02e003, 02e004, 02e014, 02e030, 02e040, 03e001, 03e004, 03e005, 03e015, 03e016, 03e019, 03e027, 03e034 и 03e045) и существующих анти-GPC3 антител (GC33 и GC199), и 3-х видов клеточных линий (клеточная линия, экспрессирующая N-концевой фрагмент GPC3, клеточная линия, экспрессирующая С-концевой фрагмент GPC3, и клеточная линия, экспрессирующая [полноразмерный] GPC3). Числовые значения на диаграмме указывают относительные значения, тогда как интенсивность флуоресценции клеточной линии, не GPC3-экспрессирующей (клеточная линия SK-Нер-1), была определена как 1 в FCM.

На фиг. 3 представлена диаграмма, демонстрирующая результаты проточной цитометрии (FCM) с использованием 11 типов клонов scFv (TF1413-02d028, 02d039, 02e004, 02e014, 02e030, 02e040, 03e001, 03e004, 03e005, 03e015 и 03e034) и существующих анти-GPC3 антител (GC33 и GC199), и 3-х видов клеточных линий (клеточная линия, экспрессирующая N-концевой фрагмент GPC3, клеточная линия, экспрессирующая С-концевой фрагмент GPC3, и клеточная линия, экспрессирующая [полноразмерный] GPC3).

На фиг. 4 приведена диаграмма, демонстрирующая результаты проведения FASC сортировки клеток с активацией флуоресценцией), используя GPC3-экспрессирующие клеточные линии, обработанные

3-мя способами (ЭДТА, трипсином и "ЭДТА+коллагеназа"), 3-мя вариантами комбинации антител (антимышиное IgG антитело, меченное APC [в настоящем описании также обозначено как "APC анти-мышинное IgG антитело"] и комбинацией APC анти-мышинного IgG антитела и клона scFv антитела [TF1413-02d028]).

На фиг. 5 показана диаграмма, демонстрирующая результаты анализа GPC3 CAR-T-клеток (Т-клетки, экспрессирующие CAR из scFv, распознающего GPC3), полученных из 5 типов клонов scFv (TF1413-02d028, TF1413-02d039, TF1413-02e014, TF1413-02e030 и TF1413-03e005) на цитотоксическую активность против клеточной линии GPC3 Sk-HEP-1. На каждом графике правый пик изображает CD45-положительные клетки (GPC3 CAR-Т клетки), а левый пик изображает CD45-отрицательные клетки (остальные злокачественные клетки [клетки GPC3 Sk-HEP-1]). Ордината каждого графика соответствует количеству клеток. Числовое значение на каждом графике показывает отношение (%) числа CD45-положительных клеток к общему количеству клеток (CD45-положительные клетки и CD45-отрицательные клетки). В качестве контроля использовали Т-клетки, не экспрессирующие GPC3 CAR ("неинфицированные" на диаграмме).

На фиг. 6 представлен график, демонстрирующий соотношение CD45-отрицательных клеток на фиг. 5 (фиг. 6A) и количество CD45-отрицательных клеток (фиг. 6B). На паре гистограмм: на левой гистограмме показана "ложная" (ложная клеточная линия Sk-HEP-1) и на правой гистограмме показана "GPC3" (GPC3 клеточная линия Sk-HEP-1).

На фиг. 7 показана диаграмма, демонстрирующая результаты анализа GPC3 CAR-T-клеток, полученных из 5 типов клонов scFv (TF1413-02d028, TF1413-02d039, TF1413-02e014, TF1413-02e030 и TF1413-03e005) на способность продуцировать IFN- γ против клеточной линии GPC3 Sk-HEP-1. В качестве контроля использовали Т-клетки, не экспрессирующие GPC3 CAR ("не инфицированные" на диаграмме).

Варианты осуществления изобретения

Антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело, содержащее CDR1-CDR3 тяжелой (H) цепи и легкой (L) цепи, как описано выше в любом из (1-1)-(11-1), и специфически связывающее в качестве эпитопа, по меньшей мере, часть (как правило, в диапазоне 3-30 аминокислотных остатков, предпочтительно 4-20 аминокислотных остатков, более предпочтительно 5-15 аминокислотных остатков) полипептида GPC3 человека, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 155 (амино [N] концевой полипептид, состоящий из 32-471 аминокислотных остатков [экзоны 1-7] полноразмерного GPC3 человека, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 157). Это антитело специфически связывается не только в форме иммуноглобулина А, но и в форме scFv с GPC3, распложенным на клеточной мембране, и, как правило, содержит вариабельную область Н-цепи, содержащую CDR1- CDR3 Н-цепи, как описано выше в любом из (1-1)-(11-1), и вариабельную область L-цепи, содержащую CDR1-CDR3 L-цепи, как описано выше в любом из (1-1)-(11-1). В этом контексте фраза "специфически связывается" означает, что антитело распознает и связывается с полипептидом SEQ ID NO: 155 посредством высоко специфичного механизма распознавания "антиген-антитело". Таким образом, антитело по настоящему изобретению не связывается специфически с полипептидом GPC3 человека, состоящим из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 156 (карбоксильный [C] концевой полипептид, состоящий из аминокислотных остатков 472-580 [экзоны 8 и 9] полноразмерного GPC3 человека, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 157).

Антитело по настоящему изобретению конкретно не ограничено происхождением, типом, классом, морфологией и тому подобное. Антитело по настоящему изобретению включает, например: антитело человека; антитело животного, такого как мышь или крыса; поликлональное антитело, олигоклональное антитело (смесь от нескольких до нескольких десятков антител) и моноклональное антитело; и химерное антитело или гуманизированное антитело, в котором часть области (например, константные области) антитела заменены областью, полученной у организмов, отличающихся по виду, фрагмент антитела, такой как фрагмент антитела F(ab')₂, полученный путем расщепления моноклонального антитела пепсином, фрагмент антитела Fab', полученный путем восстановления фрагмента антитела F(ab')₂, и Fab, полученный расщеплением моноклонального антитела папаином, и рекомбинантное антитело, такое как scFv, содержащее вариабельную область тяжелой (H) цепи антитела и вариабельную область легкой (H) цепи антитела, связанные посредством поперечных аминокислотных связей. В случае применения антитела по настоящему изобретению в качестве CAR, scFv является предпочтительным.

Антитело по настоящему изобретению предпочтительно находится в форме выделенного антитела. В этом контексте термин "выделенное" означает, что антитело находится в состоянии, отличном от состояния, в котором антитело изначально присутствует, то есть антитело извлекают из среды, в которой оно изначально присутствовало, или экспрессируется в среду, отличную от среды, в которой изначально экспрессируется антитело, путем искусственной манипуляции. В частности, "выделенное антитело" включает антитело, которое получено у конкретного индивидуума и находится в том виде, в котором оно находится в организме индивидуума, без применения внешних манипуляций (искусственной манипуляции) или в ткани или жидкости организма (крови, плазме, сыворотке и тому подобное), взятых из организма. Антитело по настоящему изобретению предпочтительно является антителом, полученным искус-

- 9 -

- 10 -

- 12 -

LF4) полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности 98-108 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 108, или полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80% или больше идентична по последовательности аминокислотной последовательности этого полипептида.

FR антитела по настоящему изобретению предпочтительно представляют собой FR известного антитела человека. Примеры таких "FR известного антитела человека" могут включать FR антитела человека с зарегистрированной в базе данных последовательностей, известной в данной области, такой как GenBank, и FR, выбранные из обычной последовательности (консенсусной последовательности наиболее гомологичной последовательности человека; Rabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991), полученной из каждой подгруппы антитела человека.

CDR1 Н-цепи в антителе по настоящему изобретению обычно соответствует остаткам в положениях H31-H35 на основании нумерации Rabat (см. документ "Rabat, E.A. et al., (1991) NIH Publication No. 91-3242, последовательности белков, представляющих иммунологический интерес"). CDR2 Н-цепи в антителе по настоящему изобретению обычно соответствует остаткам в положениях H50-H52, H52A и H53-H65 на основании нумерации Rabat. CDR3 Н-цепи в антителе по настоящему изобретению обычно соответствует остаткам в положениях H95-H100, H100A, H100B, H101 и H102 на основании нумерации Rabat. CDR1 L-цепи в антителе по настоящему изобретению обычно соответствует остаткам в положениях L24-L34 на основании нумерации Rabat. CDR2 L-цепи в антителе по настоящему изобретению обычно соответствует остаткам в положениях L50-L56 на основании нумерации Rabat. CDR3 L-цепи в антителе по настоящему изобретению обычно соответствует остаткам в положениях L89-L97 на основании нумерации Rabat.

Примеры антитела, содержащего CDR1-CDR3 Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (1-1), в качестве антитела по настоящему изобретению, могут включать антитело, содержащее вариабельные (V) области Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (1-2), и могут конкретно включать: одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3); одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3'-1), одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3'-2), и одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3'-3); и антитело, содержащее Н-цепь и L-цепь, как описано выше в (1-4). Примеры антитела, содержащего CDR1-CDR3 Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (2-1), могут включать антитело, содержащее V-области Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (2-2), и может конкретно включать: одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3); одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-1), одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-2), одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-3), и одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-4); и антитело, содержащее Н-цепь и L-цепь, как описано выше в (2-4). Примеры антитела, содержащего CDR1-CDR3 Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (3-1), могут включать антитело, содержащее V-области Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (3-2) и может конкретно включать: одноцепочечное антитело, как описано выше в (3-3); и антитело, содержащее Н-цепь и L-цепь, как описано выше в (3-4). Примеры антитела, содержащего CDR1-CDR3 Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (4-1), могут включать антитело, содержащее V-области Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (4-2) и может конкретно включать: одноцепочечное антитело, как описано выше в (4-3); и антитело, содержащее Н-цепь и L-цепь, как описано выше в (4-4). Примеры антитела, содержащего CDR1-CDR3 Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (5-1), могут включать антитело, содержащее V-области Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (5-2) и может конкретно включать: одноцепочечное антитело, как описано выше в (5-3); и антитело, содержащее Н-цепь и L-цепь, как описано выше в (5-4). Примеры антитела, содержащего CDR1-CDR3 Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (6-1), могут включать антитело, содержащее V-области Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (6-2) и может конкретно включать: одноцепочечное антитело, как описано выше в (6-3); и антитело, содержащее Н-цепь и L-цепь, как описано выше в (6-4). Примеры антитела, содержащего CDR1-CDR3 Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (7-1), могут включать антитело, содержащее V-области Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (7-2) и может конкретно включать: одноцепочечное антитело, как описано выше в (7-3); и антитело, содержащее Н-цепь и L-цепь, как описано выше в (7-4). Примеры антитела, содержащего CDR1-CDR3 Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (8-1), могут включать антитело, содержащее V-области Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (8-2) и может конкретно включать: одноцепочечное антитело, как описано выше в (8-3); и антитело, содержащее Н-цепь и L-цепь, как описано выше в (8-4). Примеры антитела, содержащего CDR1-CDR3 Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (9-1), могут включать антитело, содержащее V-области Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (9-2) и может конкретно включать: одноцепочечное антитело, как описано выше в (9-3); и антитело, содержащее Н-цепь и L-цепь, как описано выше в (9-4). Примеры антитела, содержащего CDR1-CDR3 Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (10-1), могут включать антитело, содержащее V-области Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (10-2) и может конкретно включать: одноцепочечное антитело, как описано выше в (10-3); и антитело, содержащее Н-цепь и L-цепь, как описано выше в (10-4). Примеры антитела, содержащего CDR1-CDR3 Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (11-1), могут включать антитело, содержащее V-области Н-цепи и L-цепи, как описано выше в (11-2) и может конкретно включать: одноцепочечное антитело, как описано выше в (11-3); и антитело, содержащее Н-цепь и L-цепь, как описано выше в (11-4). Вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область

легкой цепи в одноцепочечном антителе обычно связаны посредством пептидного линкера.

CAR по настоящему изобретению может содержать одноцепочечное антитело по настоящему изобретению, трансмембранную область, слитую с С-концом одноцепочечного антитела по настоящему изобретению, и область активации сигнальной трансдукции иммунокомпетентной клетки, слитую С-концом трансмембранной области. В этом контексте, слияние одноцепочечного антитела по настоящему изобретению и трансмембранной области, или трансмембранной области и области активации сигнальной трансдукции иммунокомпетентной клетки могут быть опосредовано пептидным линкером или шарнирной областью IgG4.

Примеры длины пептидного линкера в антителе по настоящему изобретению могут включать 1-100 аминокислотных остатков, предпочтительно 10-50 аминокислотных остатков. Примеры пептидного линкера в антителе по настоящему изобретению могут включать непрерывную связь 3 аминокислотных последовательностей, каждая из которых состоит из 1-4 остатков глицина и 1 остатка серина.

Трансмембранная область может быть любым пептидом, который может проникать через клеточную мембрану. Примеры могут включать трансмембранную область, полученную из CD8, Т-клеточного рецептора с α - или β -цепью, CD3 ζ , CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, EGFR (рецептора эпидермального фактора роста) или G1TR, и могут конкретно включать трансмембранную область CD8 человека, состоящую из аминокислотных остатков 1-83 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 185. Альтернативно, трансмембранная область может быть получена из пептида, который может проникать через клеточную мембрану путем усечения С-концевых 1-10 аминокислотных остатков, предпочтительно 6 или 7 аминокислотных остатков. Примеры могут включать сконструированную форму 1 трансмембранной области CD8 человека в составе аминокислотных остатков 1-77 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 186, и сконструированную форму 2 трансмембранной области CD8 человека, состоящую из аминокислотных остатков 1-76 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 187.

Областью активации сигнальной трансдукции иммунокомпетентной клетки может быть любой областью, способной передавать сигнал иммунокомпетентным клеткам при связывании одноцепочечного антитела по настоящему изобретению с GPC3 человека. Область активации сигнальной трансдукции иммунокомпетентной клетки предпочтительно содержит по меньшей мере один или несколько членов, выбранных из полипептидов внутриклеточных областей CD28, 4-1BB (CD137), G1TR, CD27, OX40, HVEM, CD3 ζ и Fc рецептор-связанной γ -цепи, и, более предпочтительно, содержит три полипептида внутриклеточных областей CD28, 4-1BB и CD3 ζ . Примеры такого полипептида внутриклеточной области CD28 могут конкретно включать полипептид внутриклеточной области CD28 человека, состоящий из аминокислотных остатков 85-124 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 185. Примеры "полипептида внутриклеточной области 4-1BB" могут конкретно включать полипептид внутриклеточной области человека 4-1BB, состоящий из аминокислотных остатков 125-170 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 185. Примеры такого полипептида внутриклеточной области CD3 ζ могут конкретно включать полипептид внутриклеточной области CD3 ζ человека, состоящий из аминокислотных остатков 172-283 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 185.

Аргинин (Arg) в положении 84 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 185, аргинин в положении 78 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 186 и аргинин в положении 77 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 187 являются общей последовательностью полипептида трансмембранной области, полученного из CD8 человека, и полипептида внутриклеточной области CD28 человека. Лейцин (Leu) в положении 171 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 185, лейцин в положении 165 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 186 и лейцин в положении 164 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 187 являются общей последовательностью полипептида внутриклеточной области 4-1BB человека и полипептида внутриклеточной области CD3 ζ человека.

В настоящем описании "иммунокомпетентная клетка" означает клетку, ответственную за иммунные функции в живом организме. Примеры иммунокомпетентных клеток могут включать: лимфоидные клетки, такие как Т-клетки, природные клетки-киллеры (НК-клетки) и В-клетки; антиген-презентирующие клетки, такие как моноциты, макрофаги и дендритные клетки; и гранулоциты, например, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и тучные клетки. Конкретные примеры предпочтительно могут включать Т-клетку, полученную у млекопитающего, такого как человек, собака, кошка, свинья или мышь, предпочтительно, Т-клетку, полученную у человека. Т-клетка может быть получена путем выделения или очистки из иммунокомпетентной клетки, инфильтрирующей жидкость организма, такой как кровь или жидкость костного мозга, ткань селезенки, тимуса, лимфатического узла или тому подобное, или злокачественную ткань первичной опухоли, метастатической опухоли, ракового асцита или тому подобного. Альтернативно, можно использовать Т-клетку, полученную из ES-клетки или iPS-клетки. Примеры такой Т-клетки могут включать альфа-бета Т-клетку, гамма-дельта Т-клетку, CD8⁺ Т-клетку, CD4⁺ Т-клетку, опухоль-инфильтрирующий лимфоцит, Т-клетку памяти, наивную Т-клетку и клетку NKT. Иммунокомпетентная клетка иметь такое же происхождение как и индивида или ее природа может отличаться. Если индивид, которому проводят введение, является человеком, то в качестве иммунокомпетентной клетки

может быть использована аутологичная клетка, полученная у пациента как у индивида, которому проводят введение, или в качестве иммунокомпетентной клетки может быть использована любая другая клетка, полученная у человека, отличного от индивида, которому проводят введение. В частности, донор и реципиент могут быть одинаковыми или разными и, предпочтительно, они одинаковые.

Примеры индивида, которому проводят введение, предпочтительно включают млекопитающее и клетку млекопитающего. Примеры млекопитающих предпочтительно включают человека, мышь, собаку, крысу, морскую свинку, кролика, птицу, овцу, свинью, крупный рогатый скот, лошадь, кошку, обезьяну и шимпанзе, особенно предпочтительно, человека.

CAR по настоящему изобретению предпочтительно используют для *ex vivo* экспрессии на клеточной поверхности иммунокомпетентной клетки, собранной у пациента, страдающего злокачественным новообразованием, при лечении. В случае использования Т-клетки в качестве иммунокомпетентной клетки, примеры пептида, состоящего из трансмембранной области и области активации сигнальной трансдукции иммунокомпетентной клетки, слитой с С-концом трансмембранной области, в CAR по настоящему изобретению может конкретно включать пептид, состоящий из любой аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 185-187. Примеры CAR по настоящему изобретению могут конкретно включать CAR, содержащий одноцепочечное антитело, выбранное из группы, включающей одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3), одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3), одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3'-1), одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3'-2), одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3'-3), одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-1), одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-2), одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-3), и одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-4), и пептид, состоящий из любой аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 185-187, слитый с С-концом одноцепочечного антитела.

Конкретно, примеры CAR по настоящему изобретению могут включать:

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 185,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 186,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 187,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3'-1), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 185,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3'-1), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 186,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3'-1), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 187,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3'-2), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 185,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3'-2), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 186,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3'-2), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 187,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3'-3), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 185,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3'-3), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 186,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (1-3'-3), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 187,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 185,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 186,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 187,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-1), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 185,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-1), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 186,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-1), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 187,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-2), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 185,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-2), и пептид, состоящий из

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 186,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-2), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 187,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-3), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 185,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-3), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 186,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-3), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 187,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-4), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 185,

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-4), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 186, и

CAR, содержащий одноцепочечное антитело, как описано выше в (2-3'-4), и пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 187.

Иммунокомпетентная клетка по настоящему изобретению может быть любой иммунокомпетентной клеткой, экспрессирующей CAR. Поскольку CAR обычно не возникает естественным образом, иммунокомпетентная клетка экспрессирует чужеродный, а не эндогенный CAR. Иммунокомпетентная клетка по настоящему изобретению предпочтительно также экспрессирует IL-7 и/или CCL19. Если иммунокомпетентной клеткой является клетка, которая не экспрессирует IL-7 и/или CCL19, например, Т-клетка, или, если иммунокомпетентной клеткой является клетка, отличная от Т-клетки, которая экспрессирует IL-7 и/или CCL19 на низком уровне, то иммунокомпетентная клетка по настоящему изобретению предпочтительно экспрессирует чужеродный IL-7 и/или CCL19.

Иммунокомпетентная клетка по настоящему изобретению может быть получена путем введения вектора по настоящему изобретению, содержащего ген CAR по настоящему изобретению, и вектора, содержащего ген IL-7 и/или CCL19, в иммунокомпетентную клетку. Способ введения может быть любым способом введения ДНК в клетки млекопитающих. Примеры таких способов могут включать в себя, например, электропорацию (Cytotechnology, 3, 133 (1990)), метод с фосфатом кальция (японская патентная заявка № 2-227075, по которой не проводилась экспертиза), липофекция (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413 (1987)), и способы на основе инфицирования вируса. Примеры такого способа на основе инфицирования вируса могут включать способ, который включает трансфекцию упаковочной клетки, такой как клетка GP2-293 (производство Takara Bio Inc.), клетка Plat-GP (производство Cosmo Bio Co., Ltd.), клетка PG13 (ATCC CRL-10686) или клетка PA317 (ATCC CRL-9078) с вектором экспрессии CAR (международная публикация № WO 2016/056228) и упаковочной плазмиды для получения рекомбинантного вируса и инфицирования Т-клетки этим рекомбинантным вирусом.

Иммунокомпетентная клетка по настоящему изобретению может быть получена путем встраивания нуклеотида, кодирующего CAR по настоящему изобретению, и нуклеотида, кодирующего IL-7 и/или CCL19, в геном клетки методом редактирования генов, известным в данной области, с возможностью экспрессии нуклеотидов под контролем соответствующего промотора. Примеры методик редактирования генов, известных в данной области, включают методику с использованием эндонуклеазы, такой как нуклеаза цинковых пальцев, TALEN (эффektorная нуклеаза, подобная активатору транскрипции) или CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами)-система Cas.

Иммунокомпетентная клетка по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с дополнительным противоопухолевым средством. Примеры дополнительного противоопухолевого средства могут включать: алкилирующее лекарственное средство, такое как циклофосамид, бендамустин, ифосфамид и дакарбазин; антиметаболит, такой как пентостатин, флударабин, кладрибин, метотрексат, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин и эноцитабин; лекарственное средство для молекулярного нацеливания, такое как ритуксимаб, цетуксимаб и трастузумаб; ингибитор киназы, такой как иматиниб, гефитиниб, эрлотиниб, афатиниб, дазатиниб, сунитиниб и траметиниб; ингибитор протеасомы, такой как бортезомиб; лекарственное средство, ингибирующее кальциевый канал, такое как циклоспорин и такролимус; противораковый антибиотик, такой как идарубицин и доксорубицин мексоницин С; растительный алкалоид, такой как иринотекан и этопозид; лекарственное средство на основе платины, такое как цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин; гормонотерапевтическое средство, такое как тамоксифен и бикалутамид; и иммуносупрессивное лекарственное средство, такое как интерферон, ниволумаб и пембролизумаб.

Примеры способа "использования иммунокомпетентной клетки по настоящему изобретению в сочетании с дополнительным противоопухолевым средством" может включать в себя метод, использующий лечение дополнительным противоопухолевым средством с последующим применением иммунокомпетентной клетки по настоящему изобретению, способ, использующий иммунокомпетентную клетку по настоящему изобретению и дополнительное противоопухолевое средство одновременно, а также способ, использующий лечение иммунокомпетентной клеткой по настоящему изобретению с последующим применением дополнительного противоопухолевого средства. Применение иммунокомпетентной клетки по настоящему изобретению в сочетании с дополнительным противоопухолевым средством может

(9-1D) ген антители, содержащий: ген CDR1 Н-цепи, состоящий из нуклеотидных остатков 91-105 гена V-области Н-цепи, состоящего из нуклеотидных остатков SEQ ID NO: 143 (ген, кодирующий Н-цепь CDR1, как описано выше в (9-1)), или вариант, на основе вырожденности кодонов, гена CDR1 Н-цепи; ген CDR2 Н-цепи, состоящий из нуклеотидных остатков 148-198 гена V-области Н-цепи, состоящего из нуклеотидных остатков SEQ ID NO: 143 (ген, кодирующий Н-цепь CDR2, как описано выше в (9-1)), или вариант, на основе вырожденности кодонов, гена CDR2 Н-цепи; и ген CDR3 Н-цепи, состоящий из нуклеотидных остатков 298-330 гена V-области Н-цепи, состоящего из нуклеотидных остатков SEQ ID NO: 143 (ген, кодирующий Н-цепь CDR3, как описано выше в (9-1)), или вариант, на основе вырожденности кодонов, гена CDR3 Н-цепи; и ген CDR1 L-цепи, состоящий из нуклеотидных остатков 70-102 гена V-области L-цепи, состоящего из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 144 (ген, кодирующий CDR1 L-цепи, как описано выше в (9-1)), или вариант, на основе вырожденности кодонов, гена CDR1 L-цепи; ген CDR2 L-цепи, состоящий из нуклеотидных остатков 148-168 гена V-области L-цепи, состоящего из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 144 (ген, кодирующий CDR2 L-цепи, как описано выше в (9-1)), или вариант, на основе вырожденности кодонов, гена CDR2 L-цепи; и ген CDR3 L-цепи, состоящий из нуклеотидных остатков 265-291 гена V-области L-цепи, состоящего из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 144 (ген, кодирующий CDR3 L-цепи, как описано выше в (9-1)), или вариант, на основе вырожденности кодонов, гена CDR3 L-цепи.

(11-1D) ген антитела, содержащий: ген CDR1 Н-цепи, состоящий из нуклеотидных остатков 91-105 гена V-области Н-цепи, состоящего из нуклеотидных остатков SEQ ID NO: 151 (ген, кодирующий Н-цепь CDR1, как описано выше в (11-1)), или вариант, на основе вырожденности кодонов, гена CDR1 Н-цепи; ген CDR2 Н-цепи, состоящий из нуклеотидных остатков 148-198 гена V-области Н-цепи, состоящего из нуклеотидных остатков SEQ ID NO: 151 (ген, кодирующий Н-цепь CDR2, как описано выше в (11-1)), или вариант, на основе вырожденности кодонов, гена CDR2 Н-цепи; и ген CDR3 Н-цепи, состоящий из нуклеотидных остатков 295-324 гена V-области Н-цепи, состоящего из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 151 (ген, кодирующий Н-цепь CDR3, как описано выше в (11-1)), или вариант, на основе вырожденности кодонов, гена CDR3 Н-цепи.

(1-2D) ген антитела, содержащий ген варибельной области Н-цепи, состоящий из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 80% или выше идентична по последовательности нук-

выше, еще более предпочтительно 90% или выше, более предпочтительно 93% или выше, особенно предпочтительно 95% или выше, в частности, более предпочтительно 98% или выше, наиболее предпочтительно 100%.

В настоящем описании термин "идентичность" означает степень сходства полипептидных или полинуклеотидных последовательностей (эта степень определяется путем сопоставления искомой последовательности с другой последовательностью, предпочтительно того же типа (последовательность нуклеиновой кислоты или белка)). Примеры предпочтительного метода компьютерной программы для подсчета и определения "идентичности" включают, но не ограничиваются ими, GCG BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al. J. Mol. Biol. 1990, 215: 403-410; Altschul et al., Nucleic Acids Res. 1997, 25: 3389-3402; and Devereux et al., Nucleic Acid Res. 1984, 12: 387), BLASTN 2.0 (Gish W., <http://blast.wustl.edu>, 1996-2002), FASTA (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85: 2444-2448), и GCG GelMerge, которые определяют и выравнивает пары самых длинных перекрывающихся контигов (Wibur and Lipman, SIAM J. Appl. Math. 1984, 44: 557-567; и Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 1970, 48: 443-453).

В настоящем описании "аминокислотная последовательность, которая по меньшей мере на 80% или более идентична по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: X", другими словами, представляет собой, "аминокислотную последовательность, полученную из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: X путем делеции, замены, вставки и/или добавления 0, 1 или нескольких аминокислотных остатков" и имеет функции, эквивалентные функциям аминокислотной последовательности SEQ ID NO: X. В этом контексте "аминокислотная последовательность, полученная путем делеции, замены, вставки и/или добавления 1 или нескольких аминокислотных остатков" означает аминокислотную последовательность, в которой аминокислотные остатки были удалены, замещены, вставлены и/или добавлены, например, в пределах 1-30 остатков, предпочтительно в пределах 1-20 остатков, более предпочтительно в пределах 1-15 остатков, еще более предпочтительно в пределах 1-10 остатков, еще более предпочтительно в пределах 1-5 остатков, еще более предпочтительно в пределах 1-3 остатков, еще более предпочтительно в пределах 1 или 2 остатков. Мутационная обработка этих аминокислотных остатков может быть выполнена произвольным способом, известным специалистам в данной области, таким как химический синтез, подход генной инженерии или мутагенез.

Промотор в векторе по настоящему изобретению может представлять собой любую область, которая запускает транскрипцию мРНК, кодируемую геном антитела по настоящему изобретению, и расположенную ниже промотора. Промотор обычно содержит сайт начала транскрипции (TSS).

Тип промотора или вектора в векторе по настоящему уровню может быть соответствующим образом выбран в соответствии с типом клетки-хозяина (или организмом-хозяином), в которую вводится вектор по настоящему изобретению.

Клетка-хозяин может экспрессировать антитело по настоящему изобретению путем транскрипции гена антитела по настоящему изобретению или может экспрессировать CAR по настоящему изобретению путем транскрипции мРНК гена CAR по настоящему изобретению. В случае введения "вектора, содержащего антитело по настоящему изобретению" в качестве вектора по настоящему изобретению, дрожжи, клетки млекопитающих, клетки насекомых или клетки растений, приведенные ниже, могут использоваться в качестве клетки-хозяина. В случае введения "вектора, содержащего ген CAR по настоящему изобретению" в качестве вектора по настоящему изобретению, в качестве клетки-хозяина может использоваться иммунокомпетентная клетка.

В случае использования дрожжей (например, *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*) в качестве клетки-хозяина примеры вектора по настоящему могут включать вектор, такой как YEP13 (ATCC37115), YEP24 (ATCC37051) и YCP50 (ATCC37419), и любой вектор, полученный из этого вектора.

Примеры промотора могут включать промотор гена гликолиза (например, гена гексокиназы), промотор PNO5, промотор PGK, промотор GAP, промотор ADH, промотор gal1, промотор gal10, промотор белка теплового шока, промотор MF α 1 и промотор CUP1.

В случае использования клетки млекопитающего (например, клетки Namalwa, выделенной из человека, клетки COS, выделенной из обезьяны, клетки CHO яичника китайского хомячка и Т-клетки человека или мыши), в качестве клетки-хозяина, и в случае использования вектора, содержащего ген антитела, в качестве вектора по настоящему изобретению, примеры вектора по настоящему изобретению могут включать вектор, такой как pcDNA1, pcDM8 (производство Funakoshi Co., Ltd.), pAGE107 (публикация японской патентной заявки № 3-22979, по которой не проведена экспертиза; и Cytotechnology, 3, 133 ((1990)), pAS3-3 (публикация японской патентной заявки № 2-227075, по которой не проведена экспертиза), pCDM8 (Nature, 329, 840, (1987)), pcDNA1/Amp (производство Invitrogen Corp.), pREP4 (производство Invitrogen Corp.), pAGE103 (J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)) и pAGE210, и любому вектору, полученный из этого вектора. С другой стороны, в случае использования клетки млекопитающего (например, иммунокомпетентной клетки человека, описанной выше) в качестве клетки-хозяина и использования вектора, содержащего ген CAR, в качестве вектора по настоящему изобретению, примеры вектора по настоящему изобретению могут включать ретровирусный вектор, такой как вектор pMSGV (Tamada k et

al., Clin Cancer Res 18: 6436-6445 (2002)) и вектор pMSCV (производство Takara Bio Inc.) и любой вектор, полученный из этого вектора.

Примеры промотора в векторе по настоящему изобретению могут включать промотор гена IE цитомегаловируса (CMV) (предданный), ранний промотор SV40, ретровирусный промотор, промотор металлотионеина, промотор теплового шока, промотор SRa, промотор NFAT и промотор HIF.

В случае использования клетки насекомого (например, клетки Sf9 и клетки Sf21, которые являются клетками яичника *Spodoptera frugiperda*, и клетки High5, которая является клеткой яичника *Trichoplusia ni*) в качестве клетки-хозяина, примеры вектора по настоящему изобретению могут включать вектор переноса для применения в способах получения рекомбинантного бакуловируса, в частности вектор, такой как pVL1392, pVL1393 и pBlueBacIII (все произведены Invitrogen Corp.), и любой вектор, полученный из этого вектора. Примеры промотора могут включать полиэдриновый промотор и p10-промотор.

В случае использования клетки растения (например, клеток табака, картофеля, томата, моркови, сои, рапса, люцерны, риса, пшеницы и ячменя) в качестве клетки-хозяина примеры вектора экспрессии могут включать вектор, такой как Ti-вектор и вектор вируса табачной мозаики, и любой вектор, полученный из этого вектора. Примеры промотора могут включать 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV) и промотор 1 актина риса.

Вектор по настоящему изобретению предпочтительно также содержит нуклеотидные последовательности энхансерной области и сайта связывания рибосомы (RBS) для дополнительного повышения эффективности экспрессии генов и также содержит ген устойчивости к лекарственным средствам (например, ген устойчивости к спектиномицину, ген устойчивости к хлорамфениколу, устойчивость к тетрациклину) гена, гена устойчивости к канамицину, гена устойчивости к ампициллину, гена устойчивости к пуромицину, гена устойчивости к гигромицину, гена устойчивости к бластидину и гена устойчивости к генетицину), подходящих для типа клетки-хозяина для скрининга на клетку-хозяин по настоящему изобретению. Энхансерная область обычно располагается выше промотора, а RBS обычно располагается между промотором и геном по настоящему изобретению. Нуклеотидная последовательность гена антигена по настоящему изобретению, которую вводят в вектор по настоящему изобретению факту, может быть подвергнута оптимизации последовательности кодонов в зависимости от клетки-хозяина для экспрессии. Вектор по настоящему изобретению может быть получен способом, известным в данной области, используя методику генной рекомбинации.

Клетка-хозяин по настоящему изобретению может быть получена путем введения вектора по настоящему изобретению в клетку-хозяин (трансфекция клетки-хозяина) методом, подходящим для типа клетки-хозяина.

В случае использования дрожжей, описанных выше, в качестве клетки-хозяина, способ введения вектора по настоящему изобретению в дрожжи может быть любым способом введения ДНК в дрожжи. Примеры включают способ, такой как электропорация (Methods Enzymol., 194, 182 (1990)), метод сферопластов (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 1929 (1978)), и способ с ацетатом лития (J. Bacteriology, 153, 163 (1983)).

В случае использования клеток млекопитающих, описанных выше, в качестве клетки-хозяина, способ введения вектора по настоящему изобретению в клетки млекопитающего может быть любым способом введения ДНК в клетки млекопитающего. Примеры включают метод, такой как электропорация (Cytotechnology, 3, 133 (1990)), метод с фосфатом кальция (публикация японской патентной заявки № 2-227075, находящейся на рассмотрении), липофекция (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413 (1987)) и способ вирусной инфекции, как указано выше. Примеры такого способа вирусной инфекции могут включать способ, который включает трансфекцию упаковочной клетки, такой как клетка GP2-293 (производство Takara Bio Inc.), клетка Plat-GP (производство Cosmo Bio Co., Ltd.), клетка PG13 (ATCC CRL-10686) или клетка PA317 (ATCC CRL-9078), вектором экспрессии CAR (Международная публикация WO 2016/056228) и упаковочную плазмиду для получения рекомбинантного вируса, и инфицирование T-клетки рекомбинантным вирусом, как указано выше.

В случае использования клеток насекомых, описанных выше, в качестве клетки-хозяина, примеры способа введения вектора по настоящему изобретения в клетки насекомых включают способ, который включает в себя котрансфекцию клеток насекомого с помощью вектора по настоящему изобретению (вектор переноса) и полученную из бакуловируса геномную ДНК для получения рекомбинантного бакуловируса согласно методу, описанному в "Current Protocols in Molecular Biology", "Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York (1992)", "Bio/Technology, 6, 47 (1988)", и тому подобное. Примеры такого способа котрансфекции могут включать способ, такой как способ с фосфатом кальция (публикация японской патентной заявки № 2-227075, находящейся на рассмотрении) и липофекция (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413 (1987)).

В случае использования растительных клеток, описанных выше, в качестве клетки-хозяина, примеры способа введения вектора по настоящему изобретению в растительные клетки могут включать в себя способ, такой как способ, использующий *Agrobacterium* (публикации японских патентных заявок № 59-140885 и 50-70080, находящихся на рассмотрении; и Cytotechnology, 3, 133 ((1990)), pAS3-3 (публикация японской патентной заявки № 60-251887, находящейся на рассмотрении) и способ с использованием

пушки для частиц (генная пушка) (патенты Японии № 2606856 и 2517813).

Антитело по настоящему изобретению может быть получено путем культивирования клетки-хозяина по настоящему изобретению, полученной указанным выше способом, в культуральном растворе, подходящем для клетки-хозяина.

Трансгенное животное, такое как мышь, крупный рогатый скот, коза, овца, курица или свинья, в которое был введен ген антитела по настоящему изобретению (вектор по настоящему изобретению), получают с использованием методики препаратов трансгенного животного, и антитело, полученное из гена антитела по настоящему числу, также может быть получено в большом количестве из крови, молока или тому подобного трансгенного животного.

Животных, исключая человека (например, мыши и крысы) иммунизируют веществом, содержащим полипептид GPC3 человека, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 155 (полипептидный антиген GPC3). Фаговую библиотеку генов scFv получают способом фагового дисплея. scFv по настоящему изобретению может быть получен способом биопэннинга с использованием полипептидного антигена GPC3 и/или клеточной линии, экспрессирующей полипептидный антиген GPC3 (предпочтительно клеточной линии, не экспрессирующей эндогенный GPC3), и, кроме того, предпочтительно, конкурентный C-концевой полипептид GPC3, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 159. Из животных, исключая человека, иммунизированных антигеном получают гибридомы, продуцирующие антитела, используя способ слияния клеток. Культуральный супернатант, содержащий антитело по настоящему изобретению, также может быть получен путем скрининга ELISA с использованием планшета, в котором антиген иммобилизован на твердой фазе. Антитело по настоящему изобретению может быть отделено и очищено от культурального супернатанта, используя способ очистки антител, известный в данной области.

Способом детекции по настоящему изобретению может быть любой способ, включающий стадию детекции GPC3, расположенного на клеточной мембране (заякоренного на клеточной мембране) в образце (например, крови, ткани и моче), используя антитело по настоящему изобретению. Конкретные примеры способа детекции могут включать иммунофлуоресцентное окрашивание, вестерн-блоттинг и ELISA, используя антитело по настоящему изобретению.

Набор для детекции по настоящему изобретению представляет собой набор, содержащий антитело по настоящему изобретению или его меченную форму, и он ограничен целью "для обнаружения GPC3". Набор, как правило, содержит компоненты, обычно используемые в наборе такого типа, например, носитель, буфер для pH и стабилизатор, а также прилагаемый документ, такой как руководство и инструкция по детекции GPC3.

Виды организмов GPC3, которые должны быть обнаружены в способе детекции по настоящему изобретению, могут представлять собой животное, исключая человека, такое как мышь или крыса, и, как правило, человека.

Примеры метки для получения меченной формы антитела по настоящему изобретению могут включать: фермент, такой как пероксидаза (например, пероксидаза хрена [HRP]), щелочная фосфатаза, β -D-галактозидаза, глюкозооксидаза, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, пенициллиназа, каталаза, апо-глюкозооксидаза, уреазы, люциферазы и ацетилхолинэстеразы; флуоресцентный материал, такой как изотиоцианат флуоресцеина, фикобилипротейн, хелаты редкоземельных металлов, дансилхлорид и изотиоцианат тетраметилпродамина; белок флуоресценции, такой как белок зеленой флуоресценции (GFP), белок голубой флуоресценции (CFP), белок голубой флуоресценции (BFP), белок желтой флуоресценции (YFP), белок красной флуоресценции (RFP) и люцифераза; радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{125}I и ^{131}I ; биотин; авидин; и хемилюминесцентный агент.

Ссылки, например на научную литературу, патенты и патентные заявки, цитированные в настоящем документе, включены в настоящее изобретение в качестве ссылки в полном объеме в той же степени, как если бы каждая отдельная ссылка была конкретно описана. Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании японской патентной заявки № 2017-001732 (подана 10 января 2017 г.), содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В настоящем описании настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на примеры. Однако технический объем настоящего изобретения не ограничен этими примерами.

Примеры

Пример 1. Получение нового анти-GPC3-антитела, распознающего N-концевой полипептид GPC3 человека.

Протокол.

В качестве животных для иммунизации с целью получения анти-GPC3 антитела человека использовали мышей SKG/Jcl, и в качестве иммунизирующего антигена использовали полноразмерный белок GPC3 человека. Мыши SKG/Jcl представляют собой модель аутоиммунного заболевания у мышей, у которых спонтанно развивается ревматоидный артрит, и у которых, как известно, продуцируются антитела в ответ даже на собственные компоненты в зависимости от возраста или внешних условий. Между тем, GPC3 является высоко гомологичным у человека и мыши и, как правило, с меньшей вероятностью вызывает индукцию антител даже при иммунизации нормальных мышей. Поэтому, в качестве животных для

иммунизации использовали мышей SKG/Jcl. Фаговую библиотеку scFv получали из кДНК, полученной из В-клеток мышей, иммунизированных GPC3, и анти-GPC3 антитело человека выделяли методом фагового дисплея.

Хотя антисыворотка иммунизированных мышей содержит много типов антител, необходимо провести селекцию мышей, продуцирующих антитела, обладающие специфичностью к N-концевому полипептиду GPC3, путем исключения мышей, продуцирующих антитела с низкой специфичностью к GPC3 или антител, распознающих С-концевой полипептид GPC3. Соответственно, мышей, у которых отмечали продукцию антител, специфически связывающихся с N-концевым полипептидом GPC3, отбирали с помощью ELISA и FCM. В частности, кДНК синтезировали реакцией обратной транскрипции из общей РНК В-клеток, полученных от иммунизированных мышей, и гены антител амплифицировали для получения библиотеки генов антител. Из библиотеки генов антител конструировали библиотеку фагов scFv, и клетки E.coli инфицировали библиотекой так, что они экспрессировали scFv, а затем осуществляли биопаннинг с помощью рекомбинантного GPC3, GPC3-экспрессирующей клеточной линии и С-концевого полипептида GPC3 для обогащения фагов, экспрессирующих целевой scFv, то есть антител против N-концевого полипептида GPC3. Для дальнейшего анализа полученного scFv на специфичность связывания с GPC3 в клетках, то есть GPC3, локализованного на (связанного с) клеточной мембраной (мембраносвязанный GPC3) посредством якоря GPI (гликозилфосфатидилинозитол), проводили проверку, используя клеточный ELISA и FCM. Кроме того, нуклеотидные последовательности вариабельных областей Н-цепи и L-цепи клонов, обладающих специфичностью связывания, секвенировали, и на основе этих последовательностей определяли нуклеотидные последовательности анти-GPC3 антител, продуцируемых В-клетками иммунизированных мышей. Наконец, метод дисплея млекопитающих, который предусматривал экспрессию N-концевого полипептидного фрагмента и С-концевого полипептидного фрагмента GPC3 на клеточной поверхности, использовали для подтверждения того, что эпитоп для scFv является N-концевым полипептидным фрагментом GPC3. В настоящем описании будет представлено подробное описание методов и результатов.

1-1. Материалы и методы.

Культура клеток.

Клеточную линию JHH7, клеточную линию HepG2 и клеточную линию SK-Hep-1, активированные на экспрессию полноразмерного GPC3 человека (в описании, также обозначена как "клеточная линия, экспрессирующая GPC3"), использовали в качестве GPC3-экспрессирующих клеток для осуществления биопаннинга и скрининга анти-GPC3 антител. Клеточная линия JHH7 представляет собой клеточную GPC3-экспрессирующую линию, полученную из гепатоцеллюлярной карциномы, и ее клетки конститутивно экспрессируют GPC3, связанный с клеточной мембраной (мембраносвязанный GPC3) через якорь GPI (гликозилфосфатидилинозитол). С другой стороны, клеточная линия HepG2 является GPC3-экспрессирующей линией клеток гепатоцеллюлярной карциномы, как и клеточная линия JHH7, но представляет собой клеточную линию, в которой экспрессия секреторного GPC3, не связанного с клеточной мембраной, преобладает над экспрессией мембраносвязанного GPC3. Клеточная линия Sk-Hep-1 представляет собой линию клеток гепатоцеллюлярной карциномы, не экспрессирующую GPC3. Следовательно, клеточная линия, экспрессирующая только мембраносвязанный полноразмерный GPC3 или мембраносвязанный GPC3 частичной длины с дефицитом экзонов, может быть получена путем принудительной экспрессии.

Культивирование 4-х типов клеточных линий (клеточная линия JHH7, клеточная линия HepG2, клеточная линия, экспрессирующая GPC3, и клеточная линия 293T, полученная из эпителия эмбриональной почки человека) проводили в условиях 37°C и 5% CO₂ в культуре DMEM (производство Sigma-Aldrich Co. LLC), содержащей 10% FBS (производство Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc.) и 1% пенициллин-стрептомицин (производство Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc.) (в описании, просто обозначен как "культуральный раствор DMEM"). Культивирование клеточной линии CHO-K1 проводили в условиях 37°C и 5% CO₂ в культуральном растворе Ham's F12 (производство Sigma-Aldrich Co. LLC), содержащем 10% FBS (производство Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc.).

Иммунизирующий антиген.

С-концевой 6xHis-меченный рекомбинантный GPC3 (производство R&D Systems Inc.) доводили до 0,1 мг/мл с помощью PBS и смешивали с искусственным адъювантом TiterMax Gold (производство TiterMax USA, Inc.) или CFA (полный адъювант Фрейнда) (F5881, производство Sigma-Aldrich Co. LLC) в равных количествах с получением эмульсии, которую затем использовали в качестве исходного иммунизирующего антигена. Рекомбинантный GPC3 доводили до концентрации 10-100 мкг/мл с помощью PBS и использовали в качестве второго или более позднего иммунизирующего антигена.

Получение GPC3-экспрессирующей клеточной линии.

Ген, кодирующий полноразмерный GPC3 человека, состоящий из SEQ ID NO: 157 (полноразмерный ген GPC3 человека, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 160), встраивали в вектор pcDNA3.1 (производство Thermo Fisher Scientific Inc.) с получением вектора экспрессии GPC3. Клеточную линию SK-Hep-1 трансфицировали вектором экспрессии GPC3 стандартным способом и затем культивировали в культуральном растворе DMEM, содержащем G418 (производство Roche Diagnos-

tics KK), с получением клеточной линии SK-Hep-1, стабильно экспрессирующей полноразмерный GPC3 (GPC3-экспрессирующая клеточная линия).

Иммунизация мыши.

Мышей SKG/Jcl (CLEA Japan, Inc., 8-недельная самка, SPF) использовали в качестве животных для иммунизации и иммунизировали рекомбинантным GPC3 в общей сложности 4 раза с 1-недельными интервалами в подушечку стопы. Через 5 недель после начала иммунизации кровь собирали и получали сыворотку в соответствии со стандартным методом и использовали в качестве образца для подтверждения титра антител.

Титр сывороточных антител в антисыворотке, используя ELISA.

Для подтверждения ответа иммунизированных мышей с продукцией анти-GPC3 антител, титр сывороточного антитела измеряли с использованием иммуноферментного ELISA. В 96-и луночный микропланшет (производство Nalge Nunc International) добавляли 0,5 или 2 мкг/мл рекомбинантного GPC3 в количестве 50 мкл/лунка, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа или при 4°C в течение 12 часов. Затем добавляли 2% Block ACE (производство DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) в количестве 200 мкл/лунка для блокирования. Сыворотку мышей, иммунизированных GPC3, серийно 100-160-и кратно разводили 0,1% раствором Block ACE/PBS. Каждый разведенный образец сыворотки добавляли в количестве 50 мкл/лунка, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов для осуществления реакции антиген-антитело. После промывки лунок раствором PBS, содержащим Tween 20 (PBST), добавляли козий анти-мышинный IgG (производство Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.), конъюгированный с 2 мкг/мл пероксидазы, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов для второй реакции антитела. После пятикратного промывания лунки раствором PBST, влагу удаляли и добавляли субстрат TMB (производство Thermo Fisher Scientific Inc.) в количестве 50 мкл/лунка для реакции окрашивания. Через 15 минут реакцию окрашивания останавливали, добавляя 0,18 М серной кислоты в количестве 50 мкл/лунка, а затем измеряли оптическую плотность при 450 нм и 540 нм, используя планшет-ридер (производство Bio-Rad Laboratories, Inc.). Количественное определение проводили с использованием скорректированного значения, полученного вычитанием значения, измеренного при 540 нм из значения, измеренного при 450 нм.

Специфичность антитела в антисыворотке с использованием FCM.

Для дополнительного подтверждения специфического связывания антисыворотки против мембраносвязанного GPC3 у иммунизированных мышей, сыворотку мыши 100 кратно разводили и 5×10^5 клеток линии GPC3-экспрессирующих клеток смешивали и инкубировали в течение 30 минут на льду. К раствору добавляли буфер FACS (1% раствор BSA/PBS), и смесь центрифугировали для удаления супернатанта. Затем в качестве второго антитела добавляли 100 мкл 1 мкг/мл козьего анти-мышинного IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (производство Thermo Fisher Scientific Inc.), и смесь инкубировали в течение 30 минут на льду для осуществления второй реакции антитела.

Детекцию Alexa Fluor 488 и измерение уровня флуоресценции проводили, используя проточный цитометр (FACSCanto) (производство BD Biosciences).

Получение фаговой библиотеки scFv.

Общую РНК, полученную из В-клеток, экстрагировали стандартной методикой в случае мышей, для которых было показано, что они продуцируют антитело, связывающееся с мембраносвязанным GPC3, методом, описанным выше в разделе [Проточный цитометр]. Проводили ОТ-ПЦР с общей РНК в качестве матрицы по стандартному протоколу получения кДНК. Гены варибельной области Н-цепи и L-цепи антитела амплифицировали с помощью ПЦР. Нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок scFv с варибельными областями Н-цепи и L-цепи, связанными посредством гибкого линкера, и белок оболочки g3p (ср3) фиброзного бактериофага M13 встраивали в сайт мультиклонирования фагмидинового вектора pTZ19R с получением вектора экспрессии scFv. Размер библиотеки scFv рассчитывали по эффективности трансформации штамма E.coli DH12S (производство Invitrogen Corp.). Трансформированный штамм DH12S инфицировали фагом-помощником M13KO7 (производство Invitrogen Corp.) с получением фаговой библиотеки, экспрессирующей scFv.

Биопэннинг и клонирование фага scFv.

Осуществляли биопэннинг фага scFv комбинацией рекомбинантного GPC3, иммобилизованного на магнитных шариках Dynabeads His-Tag Isolation & Pulldown (производство VERITAS Corp.) с помощью 6xHis-тага, и GPC3-экспрессирующей клеточной линией, в качестве приманки, согласно способу, описанному в документе "J Mol Biol. 1991 Dec 5; 222 (3): 581-97", "J Med Virol. 2007 Jun; 79 (6): 852-62", "Proc Natl Acad Sci USA. 2008 May 20; 105 (20): 7287-92", or "JOURNAL OF VIROLOGY, Apr. 2004, p. 3325-3332 Vol. 78, No. 7". В каждом раунде (стадии) биопэннинга, состоящего из 5 типов серий (серии A-E) (см. фиг. 1), отбирали аликвоту поликлональных фаговых антител. Для подтверждения специфичности связывания scFv, проводили ELISA с иммобилизованным антигеном, по методу, описанному выше в разделе [Титр антитела в сыворотке, используя ELISA] (метод с использованием культурального супернатанта E. coli, содержащего фаг вместо сыворотки), и ELISA на основе клеток проводили по методу, описанному ниже в разделе [Скрининг scFv с помощью ELISA на основе клеток]. Каждая стадия биопэннинга была разработана без селекции связывание фага scFv с той же частью, что и C-концевой эпитоп

GPC3, распознаваемый существующими антителами, путем предварительного связывания существующих анти-GPC3 антител GC33 (производство Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) и GC199 (производство Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) для приманки. Конкретно, этот конкурентный метод позволяет осуществлять селективный биоэппинг нового антитела, распознающего эпитоп GPC3, отличный эпитопов существующих анти-GPC3 антител. DH12S E.coli трансформировали фагами, обогащенными с помощью биоэппинга, и инокулировали в агарозную среду LB для разделения на отдельные колонии. E.coli затем культивировали в жидкой среде LB небольшого масштаба, а затем экстрагировали и очищали плазмиды. Очищенные плазмиды подвергали секвенированию ДНК для определения нуклеотидных последовательностей варибельных областей Н-цепи и L-цепи scFv.

Скрининг scFv с помощью FCM.

100 мкл культурального супернатанта, в котором секретировались фаги scFv, добавляли к клеточной линии, GPC3-экспрессирующей (5×10^5 клеток на образец), и смешивали, а затем смесь инкубировали в течение 30 минут на льду. К смеси добавляли буфер FACS (1% раствор BSA/PBS), и смесь центрифугировали для удаления супернатанта. Затем в качестве второго антитела добавляли 1 мкг/мл антимышиное антитело-Alexa 488 (производство Thermo Fisher Scientific Inc.), и смесь инкубировали в течение 30 минут на льду. Затем измеряли флуоресцентное окрашивание клеток с использованием проточного цитометра (FACSCanto, производство BD Biosciences).

Скрининг scFv с помощью ELISA на основе клеток.

После удаления культурального раствора DMEM из 96-и луночного микропланшета, в каждой лунке которого были прикреплены 2×10^5 GPC3-экспрессирующих клеток, добавляли 2% раствор BSA-PBS для предотвращения неспецифического связывания scFv с клетками или планшетом, и планшет инкубировали в течение 30 минут на льду. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл культурального супернатанта E. coli, в котором были секретированы фаги scFv, и планшет инкубировали в течение 45 минут на льду. Затем добавляли 5 мкг/мл кроличьего анти-cr3-антитела (производство Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.) против cr3, слитого на С-концевой стороне scFv, при 100 мкл на лунку, и планшет инкубировали еще 45 минут на льду. HRP-меченное анти-кроличье IgG антитело (производство Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.), в 500 кратном разведении добавляли в количестве 100 мкл/лунка в качестве третьего антитела для детекции анти-cr3 антитела, и планшет инкубировали 45 мин на льду. Затем в качестве субстратов HRP для реакции окрашивания добавляли о-фенилендиамин (OPD) и перекись водорода. Количественную оценку проводили, используя числовое значение, полученное вычитанием оптической плотности при 620 нм в качестве фона из оптической плотности при 492 нм. Если проводили клеточное ELISA, используя антитело, уже преобразованное в антитело типа IgG, а не scFv, то использовали HRP-меченное антимышиное IgG антитело (производства Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.), в 2000-кратном разведении в качестве второго антитела для обнаружения антитела типа IgG вместо анти-cr3 антитела и HRP-меченное анти-кроличье IgG антитело, в условиях, описанных выше.

Определение последовательностей генов варибельной области scFv.

Последовательности гена варибельной области фагового scFv, связывающегося с мембраносвязанным GPC3, декодировали на секвенаторе (SEQ2000XL, производство Beckman Coulter, Inc.), используя праймер T7 (праймер, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 176), который представляет собой универсальный праймер, и праймер cr3R (праймер, состоящий из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 177) в качестве прямого праймера для декодирования V-области Н-цепи (VH) и обратного праймера для декодирования V-области (VL) L-цепи, соответственно.

Получение клеточной линии для картирования эпитопа антитела.

Для идентификации эпитопа клонированного scFv использовали метод дисплея млекопитающих. Ген, состоящий из экзонов 1-7 GPC3 человека и кодирующий N-концевой фрагмент GPC3 (полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 155), и ген, состоящий из экзонов 8 и 9 GPC3 человека и кодирующий С-концевой фрагмент GPC3 (полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 156), амплифицировали ПЦР, и каждый встраивали в сайт мультиклонирования (MSC) экспрессирующего вектора pDisplay (производство Thermo Fisher Scientific Inc.). Вектор экспрессии pDisplay представляет собой вектор экспрессии, способный конденсировать трансмембранный домен рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) и С-конец белка-мишени и представлять эту слитую конструкцию на клеточной поверхности произвольных клеток млекопитающих. Кроме того, вектор экспрессии pDisplay сконструирован для прибавления HA-тага к N-концу мишеневого белка и мус-тага к С-концу PDGFR. Осуществляли генный перенос с помощью вектора экспрессии pDisplay для экспрессии N-концевого фрагмента GPC3 или С-концевого фрагмента GPC3 в клеточную линию SK-Nер-1 или клеточную линию 293Т, и клеточную линию, экспрессирующую N-концевой фрагмент GPC3 или С-концевой фрагмент GPC3 на поверхности клетки (клеточная линия, экспрессирующая N-концевой фрагмент GPC3, и клеточная линия, экспрессирующая С-концевой фрагмент GPC3) выделяли и использовали для картирования эпитопа scFv.

Картирование эпитопа антитела с помощью FCM.

Клеточную линию, экспрессирующую N-концевой фрагмент GPC3, клеточную линию, экспресси-

рующую С-концевой фрагмент GPC3, и клеточную GPC3-экспрессирующую линию (в каждом случае 5×10^5 клеток на образец), смешивали с 100 мкл культурального супернатанта, в котором фаги scFv секретировали, и смесь инкубировали в течение 30 мин на льду. К смеси добавляли буфер

FACS (1% раствор BSA/PBS), и смесь центрифугировали и промывали. Затем в качестве второго антитела добавляли 1 мкг/мл антимышиное антитело-Alexa 488 (производство Thermo Fisher Scientific Inc.), и смесь инкубировали в течение 30 мин на льду. Затем измеряли флуоресцентное окрашивание клеток с использованием проточного цитометра (FACSCanto, производство BD Biosciences).

Конструирование рекомбинантного вектора экспрессии IgG.

Для преобразования scFv в IgG использовали вектор экспрессии системы Mammalian PowerExpress (производство Toyobo Co., Ltd.). Нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок вариабельной области Н-цепи scFv и константную область Н-цепи IgG2a мыши, встраивали в MSC вектора pEH1.1 (pEH1.1-H). Кроме того, нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок вариабельной области L-цепи scFv и константную область L-цепи IgG2a мыши, встраивали в MSC вектора pELX2.2 (pEH2.2-L). Затем полинуклеотидный фрагмент промотора, начиная с EF1 α до гена L-цепи, вырезали из pEH2.2-L с помощью ферментов рестрикции (BglII и Sall) и лигировали в pEH1.1-H, обработанным ферментами рестрикции (BglII и Sall) с получением вектора для одновременной экспрессии Н-цепи и L-цепи антитела.

Экспрессия рекомбинантного IgG.

32,6 мкг вектора для одновременной экспрессии Н-цепи и L-цепи антитела, полученного способом, как описано выше в [Конструирование рекомбинантного вектора экспрессии IgG], разбавляли 1,6 мл opti-MEM (производство Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc.) и смешивали с 65 мкл реагента для трансфекционной трансфекции (производство Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.), разбавленного 1,6 мл opti-MEM, и смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Затем смесь смешивали с клетками CHO-K1 (1×10^7 клеток), суспендированными в 10 мл культурального раствора DMEM, а затем культивировали. Через 4 часа к смеси добавляли бессывороточную среду (среда Free Style expression CHO [производство Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc.]), и смесь дополнительно культивировали в течение 4-6 дней для извлечения супернатанта культуры, содержащего рекомбинантное антитело.

Аффинная очистка антитела.

Пустую колонку (производство Bio-Rad Laboratories, Inc.) заполняли протеином G Sepharose 4 Fast Flow (производство GE Healthcare Japan Corp.) или Bipo Resin Protein L (производство Protein Express) с объемом слоя 1 мл. Затем полимер колонки промывали PBS в количестве, в 10 раз превышающем объем слоя. Культуральный супернатант, отфильтрованный через фильтр 0,22 микрона, добавляли в колонку так, чтобы антитело захватывалось белком G или белком L внутри колонки. Затем колонку промывали PBS в количестве, в 10 раз превышающем объем слоя, чтобы смыть неспецифически адсорбированные загрязнения. Антитело элюировали, используя раствор 100 мМ глицин-HCl (pH 2,7), и pH элюата нейтрализовали 1 М Tris-HCl (pH 8,5). Измеряли поглощение при 280 нм с помощью измерителя поглощения nanoDrop (производство Thermo Fisher Scientific Inc.) и рассчитывали концентрацию антитела. Векторы экспрессии конструировали и получали тем же способом, что и выше, что и для антитела GC33 и антитела GC199, используемых в качестве конкурентных антител.

1-2 Результаты.

Оценка антисыворотки иммунизированной мыши.

У мышей SKG/Jcl, иммунизированных четыре раза рекомбинантным GPC3, собирали кровь, и подтверждали продукцию анти-GPC3 антитела в сыворотке. В результате антитело, обладающее связывающей активностью в отношении GPC3, было обнаружено в экспериментах ELIS с рекомбинантным GPC3 и FCM на GPC3-экспрессирующих клетках. Две мыши с особенно высоким титром антител (под номерами 1413 #2 и 1413 #3) среди мышей использовали в качестве источников для получения библиотеки антител.

Конструирование фаговой библиотеки.

Количество членов библиотеки scFv, рассчитанное путем по эффективности трансформации, составило $5,8 \times 10^7$ для мыши 1413 #2 и $4,3 \times 10^8$ для мыши 1413 #3. Библиотека иммуноглобулинов, полученная в этом примере, представляла собой библиотеку, полученную у мышей, у которых была обнаружена продукция антител в ответ на антиген-мишень при иммунизации антигеном GPC3. Следовательно, особенностью этой библиотеки является высокая вероятность содержания гена мишеневого антитела, даже учитывая небольшой размер библиотеки. Другое преимущественно библиотеки является содержание антитела, которое образует правильную конформацию in vivo по сравнению со случайной библиотекой синтетических антител.

Классификация клона с помощью анализа последовательности моноклонального scFv.

Анализ последовательности ДНК выделенного моноклонального scFv проводили для классификации клонов, исключая перекрытие. В результате клоны-кандидаты были идентифицированы как 7 типов серии D библиотеки мыши 1413 #2, 5 типов серии E той же библиотеки, 3 типа из серии D библиотеки

ки мыши 1413 #3 и 9 типов серии Е той же библиотеки. Нуклеотидные последовательности вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи этих клонов-кандидатов анализировали для исключения перекрывающихся идентичных клонов. В результате было идентифицировано в общей сложности 18 типов клонов scFv, то есть 9 типов клонов scFv, полученных из библиотеки мыши 1413 #2, и 9 типов клонов scFv, полученных из библиотеки мыши 1413 #3.

Анализ картирования эпитопа клона анти-GPC3 scFc] 18 типов клонов scFv, идентифицированных методом, описанным выше в разделе [Классификация клонов с помощью анализа последовательности моноклонального scFv], использовали для анализа связывания с каждым GPC3 с помощью FCM, используя 3 типа клеточных линий (клеточная линия, экспрессирующая N-концевой фрагмент GPC3, клеточная линия, экспрессирующая С-концевой фрагмент GPC3, и клеточная линия, экспрессирующая GPC3). В результате среди 18 типов клонов scFv 14 типов (TF1413-02d028, 02d030, 02d039, 02e004, 02e014, 02e030, 02e040, 03e001, 03e004, 03e005, 03e015, 03e019, 03e027 и 03e034) связывались с полноразмерным GPC3 и N-концевым фрагментом GPC3 (полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 155), но не связывались с С-концевым фрагментом GPC3 (полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 156) (см. фиг. 2). С другой стороны, существующие анти-GPC3-антитела GC33 (производство Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) и GC199 (производство Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) связывались с полноразмерным GPC3 и С-концевым фрагментом GPC3, но не связывались с N-концевым фрагментом GPC3.

По результатам было идентифицировано 14 типов новых клонов scFv, описанных выше, распознающих N-концевой эпитоп GPC3, отличный от С-концевого эпитопа GPC3, для существующих анти-GPC3 антител (GC33 и GC199).

Из 14 типов клонов scFv, идентифицированных таким образом, были выбраны 11 лучших клонов scFv (TF1413-02d028, 02d039, 02e004, 02e014, 02e030, 02e040, 03e001, 03e004, 03e005, 03e015 и 03e034), обладающих особенно высокой силой связывания. В табл. 1 показано соответствие SEQ ID NO V-области Н-цепи и L-цепи этих 11 типов клонов scFv. В табл. 2 показано соответствие SEQ ID NO CDR1-CDR3 Н-цепи этих 11 типов клонов scFv. В табл. 3 показано соответствие SEQ ID NO CDR1-CDR3 L-цепи этих 11 типов клонов scFv.

Таблица 1

Название scFv клона и V-области		SEQ ID NO
TF1413-02d028	V-область Н-цепи	7
TF1413-02d039	V-область Н-цепи	17
TF1413-02e004	V-область Н-цепи	27
TF1413-02e014	V-область Н-цепи	37
TF1413-02e030	V-область Н-цепи	47
TF1413-02e040	V-область Н-цепи	57
TF1413-03e001	V-область Н-цепи	67
TF1413-03e004	V-область Н-цепи	77
TF1413-03e005	V-область Н-цепи	87
TF1413-03e015	V-область Н-цепи	97
TF1413-03e034	V-область Н-цепи	107
TF1413-02d028	L chain V region	8
TF1413-02d039	L chain V region	18
TF1413-02e004	L chain V region	28
TF1413-02e014	L chain V region	38
TF1413-02e030	L chain V region	48
TF1413-02e040	L chain V region	58
TF1413-03e001	L chain V region	68
TF1413-03e004	L chain V region	78
TF1413-03e005	L chain V region	88
TF1413-03e015	L chain V region	98
TF1413-03e034	L chain V region	108

Таблица 2

Название клона и CDR		SEQ ID NO
TF1413-02d028	CDR1 Н-цепи	1
	CDR2 Н-цепи	2
	CDR3 Н-цепи	3
TF1413-02d039	CDR1 Н-цепи	11
	CDR2 Н-цепи	12
	CDR3 Н-цепи	13
TF1413-02e004	CDR1 Н-цепи	21
	CDR2 Н-цепи	22
	CDR3 Н-цепи	23
TF1413-02e014	CDR1 Н-цепи	31
	CDR2 Н-цепи	32
	CDR3 Н-цепи	33
TF1413-02e030	CDR1 Н-цепи	41
	CDR2 Н-цепи	42
	CDR3 Н-цепи	43
TF1413-02e040	CDR1 Н-цепи	51
	CDR2 Н-цепи	52
	CDR3 Н-цепи	53
TF1413-03e001	CDR1 Н-цепи	61
	CDR2 Н-цепи	62
	CDR3 Н-цепи	63
TF1413-03e004	CDR1 Н-цепи	71
	CDR2 Н-цепи	72
	CDR3 Н-цепи	73
TF1413-03e005	CDR1 Н-цепи	81
	CDR2 Н-цепи	82
	CDR3 Н-цепи	83
TF1413-03e015	CDR1 Н-цепи	91
	CDR2 Н-цепи	92
	CDR3 Н-цепи	93
TF1413-03e034	CDR1 Н-цепи	101
	CDR2 Н-цепи	102
	CDR3 Н-цепи	103

Таблица 3

Название клона и CDR		SEQ ID NO
TF1413-02d028	CDR1 L-цепи	4
	CDR2 L-цепи	5
	CDR3 L-цепи	6
TF1413-02d039	CDR1 L-цепи	14
	CDR2 L-цепи	15
	CDR3 L-цепи	16
TF1413-02e004	CDR1 L-цепи	24
	CDR2 L-цепи	25
	CDR3 L-цепи	26
TF1413-02e014	CDR1 L-цепи	34
	CDR2 L-цепи	35
	CDR3 L-цепи	36
TF1413-02e030	CDR1 L-цепи	44
	CDR2 L-цепи	45
	CDR3 L-цепи	46
TF1413-02e040	CDR1 L-цепи	54
	CDR2 L-цепи	55
	CDR3 L-цепи	56
TF1413-03e001	CDR1 L-цепи	64
	CDR2 L-цепи	65
	CDR3 L-цепи	66
TF1413-03e004	CDR1 L-цепи	74
	CDR2 L-цепи	75
	CDR3 L-цепи	76
TF1413-03e005	CDR1 L-цепи	84
	CDR2 L-цепи	85
	CDR3 L-цепи	86
TF1413-03e015	CDR1 L-цепи	94
	CDR2 L-цепи	95
	CDR3 L-цепи	96
TF1413-03e034	CDR1 L-цепи	104
	CDR2 L-цепи	105
	CDR3 L-цепи	106

Преобразование scFv анти-GPC3 антитела в IgG и его способность связываться.

Вариабельные области Н-цепи и L-цепи 11 типов клонов scFv, выбранных, как описано выше, связывали с константными областями IgG мыши, и полноразмерные рекомбинантные антитела были экспрессированы с использованием вектора экспрессии рекомбинантного IgG и аффинно-очищены. Способность этих антител IgG связываться с N-концевым фрагментом GPC3 анализировали с использованием линии клеток, экспрессирующих N-концевой фрагмент GPC3. По результатам, 9 типов клонов IgG (TF1413-02d028, 02d039, 02e004, 02e014, 02e030, 02e040, 03e004, 03e005 и 03e034) сохраняли активность связывания против N-концевого фрагмента GPC3, а у остальных двух типов клонов IgG (TF1413-03e001 и 03e015) активность связывания против N-концевого фрагмента GPC3 отсутствовала (см. фиг. 3). Описанные выше 9 типов клонов IgG не связывались с C-концевым фрагментом GPC3 (см. фиг. 3).

Эти результаты показывают, что среди 11 типов клонов scFv 9 типов (TF1413-02d028, 02d039, 02e004, 02e014, 02e030, 02e040, 03e004, 03e005 и 03e034) могут быть преобразованы в тип IgG. В табл. 3 показано соответствие SEQ ID NO CDR1-CDR3 Н-цепей и L-цепи этих 11 типов клонов IgG.

Таблица 4

Имя клона IgG и область		SEQ ID NO
TF1413-02d028	Н-цепь	9
TF1413-02d039	Н-цепь	19
TF1413-02e004	Н-цепь	29
TF1413-02e014	Н-цепь	39
TF1413-02e030	Н-цепь	49
TF1413-02e040	Н-цепь	59
TF1413-03e001	Н-цепь	69
TF1413-03e004	Н-цепь	79
TF1413-03e005	Н-цепь	89
TF1413-03e015	Н-цепь	99
TF1413-03e034	Н-цепь	109
TF1413-02d028	Л-цепь	10
TF1413-02d039	Л-цепь	20
TF1413-02e004	Л-цепь	30
TF1413-02e014	Л-цепь	40
TF1413-02e030	Л-цепь	50
TF1413-02e040	Л-цепь	60
TF1413-03e001	Л-цепь	70
TF1413-03e004	Л-цепь	80
TF1413-03e005	Л-цепь	90
TF1413-03e015	Л-цепь	100
TF1413-03e034	Л-цепь	110

Пример 2.

2. Связывающая активность нового анти-GPC3 антитела против GPC3, обработанного EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота), трипсином или коллагеназой.

Получение клеток, обработанных EDTA или трипсином.

Клеточную линию SK-Ner-1, активированную на экспрессию GPC3, культивировали в двух колбах Т-75. Культуральный супернатант каждой колбы отсасывали, и колбу промывали 3 мл PBS.

Затем в каждую колбу добавляли 3 мл 0,02% раствора EDTA/PBS (в настоящем описании, указан просто как "EDTA") или 0,05% раствора трипсина (в описании, указан просто как "трипсин"). Каждую колбу инкубировали при 37°C в течение 5 минут (EDTA) или 2 минут и 30 секунд (трипсин) для снятия клеток с колбы. Затем в каждую колбу добавляли 7 мл культурального раствора DMEM. После пипетирования суспензию клеток собирали в каждую коническую пробирку объемом 50 мл. Каждую колбу затем промывали 10 мл культурального раствора DMEM. Затем полученные промывки также возвращали в коническую пробирку объемом 50 мл, содержащую каждую клеточную суспензию, а затем центрифугировали (1500 об/мин, 4°C, 4 мин). После аспирации супернатанта из каждой конической пробирки к осадку добавляли 10 мл культурального раствора DMEM и подсчитывали количество клеток, диссоциированных с помощью EDTA или трипсина.

Клетки, обработанные EDTA или трипсином, доводили до 2×10^5 клеток/пробирка и проводили анализ FACS (EC800). В анализе FACS использовали 3 типа антител (флуоресцентно APC-меченное анти-мышинное IgG антитело [5 мкг/пробирка; производство BioLegend, Inc.], антитело GC33 [1,0 мкг/пробирка; производство Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.], Life Science] и антитело клона scFv [TF1413-02d028], описанное выше [1,0 мкг/пробирка]).

Получение клеток, обработанных EDTA или трипсином] В коническую пробирку объемом помещали 50 мл 1×10^6 клеток, диссоциированных с помощью EDTA, как описано выше, и центрифугировали (1500 об/мин, 4°C, 4 мин), и супернатант отсасывали с получением клеточной массы (осадок). К осадку добавляли 5 мл раствора коллагеназы Р, и смесь инкубировали при 37°C в течение 30 минут с получением клеточной суспензии. Затем клеточную суспензию пропускали через 100 мкм-вое сито для клеток, промывая 30 мл культурального раствора DMEM. Суспензию клеток снова пропускали через 100 мкм-овое сито для клеток и центрифугировали (300 г, 4°C, 10 минут), и супернатант отсасывали. Осадок промывали, добавляя 20 мл PBS, а затем центрифугировали (300 г, 4°C, 5 минут), и супернатант отсасывали. Клетки суспендировали, добавляя 5 мл культурального раствора DMEM. Затем подсчитывали количество клеток и 2×10^5 клеток/пробирка анализировали FACS (EC800). В анализе FACS использовали 3 типа

антител (флуоресцентно APC-меченное антимышиное IgG антитело [5 мкг/пробирка; производство Bio-Legend, Inc.], антитело GC33 [1,0 мкг/пробирка; производство Medical & Biological Laboratories Co., Ltd). Life Science] и scFv клон [антитело [TF1413-02d028], описанное выше [1,0 мкг/пробирка]), как в случае клеток, обработанных EDTA или трипсином. Результаты показаны на фиг. 4. На фиг. 4, правый пик на оси абсцисс указывает на то, что антитело GC33 или клон scFv [TF1413-02d028] связываются с белком GPC3.

Результаты.

Как показано на фиг. 4, активность связывания антитела по настоящему изобретению (TF1413-02d028) с белком GPC3, обработанного трипсином или коллагеназой, была заметно ниже. Эти результаты показывают, что антитело по настоящему изобретению специфически распознает конформацию белка GPC3, что позволяет предположить, что антитело по настоящему изобретению обладает высокой специфичностью *in vivo*.

Пример 3

3. Разработка GPC3 CAR-T-клеток, используя новое анти-GPC3 антитело.

Протокол.

GPC3 представляет собой молекулу на клеточной поверхности, экспрессия которой не отмечается в тканях взрослого человека, кроме плаценты, но наблюдается в тканях различных видов рака, таких как гепатоцеллюлярная карцинома, меланома, аденокарцинома прозрачных клеток яичников и плоскоклеточный рак легких. Таким образом, GPC3 может служить мишенивой молекулой при CAR-T-клеточной терапии, используя рецептор химерного антигена (CAR). Соответственно, GPC3 CAR-T клетки получали, используя 11 типов клонов scFv, полученных в примере 1, и анализировали на цитотоксическую активность при злокачественном новообразовании и способность продуцировать интерферон γ (IFN- γ).

Получение вектора GPC3 CAR.

scFv с последовательностью VH-линкер-VL конструировали для 11 типов клонов scFv (TF1413-02d028, 02d039, 02e004, 02e014, 02e030, 02e040, 03e001, 03e004, 03e005, 03e015 и 03e034), полученных в примере 1, на основе их соответствующих аминокислотных последовательностей VH и VL (см. табл. 5). Использовали линкер, состоящий из 15 аминокислотных остатков с 3 повторами полипептида "GGGGS". К N-концу VH добавляли сигнальную последовательность Н-цепи иммуноглобулина человека SEQ ID NO: 188.

Таблица 5-1

SEQ ID NO:165: TF1413-02d028 scFv
<u>QVQLKESGPELEKPGASVKISCKASGYSTGYNMNWKQSNQKSLWIGNIDPYYGGTSYNQKF</u> <u>KGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARGDYRAYYFDYWGQGTTLTVS</u> <u>GGGGSGGGGS</u> <u>GGGGS</u> <u>DIQMTQSPKFMSTSVGDRVSITCKASQNVRTAVAWYQQKPGQSPKALIYLASNRHTGVP</u> <u>DRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCLQHWNYPLTFGAGTKLELKR</u>
SEQ ID NO:166: TF1413-02d039 scFv
<u>EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLWVAYISSGGGSTYYPDYTK</u> <u>GRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDYAMYYCARRGLRRAMDYWGQGSVTVS</u> <u>GGGGSGGGGS</u> <u>GGGS</u> <u>DYVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLLQKPGQSPKLLIYKVSNR</u> <u>SGVYDRFSGSGSGTDFTLTKISRVAEADLGYYFCQSTHVPPLTFGAGTKLELKR</u>
SEQ ID NO:167: TF1413-02e004 scFv
<u>QVQLQQSGAELVKPGAPVKLSCKASGYTFTSYWMNWKQRPGRGLEWIGRIDPSDSETHYNQK</u> <u>FKDEATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCARGYYAMDYWGQGSVTVS</u> <u>GGGGSGGGSGG</u> <u>GGG</u> <u>DIVLTQSPKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYASRYRTGVPDRFT</u> <u>GSGSGTDFFTISSVQAEDLAVYYCQHHYSTPTFGGCTKLEIKR</u>
SEQ ID NO:168: TF1413-02e014 scFv
<u>QVQLKQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYMHVWKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTTEYAPKF</u> <u>QGKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCNAGYYDYDGYAMDYWGQGSVTVS</u> <u>GGGGSGG</u> <u>GGSGGGGS</u> <u>DIVLTQSPKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTG</u> <u>VPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPLTFGGGCTKLEIKR</u>
SEQ ID NO:169: TF1413-02e030 scFv
<u>EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYMHVWKQRPEQGLEWIGWIDPENGTIYDPKF</u> <u>QGKASITADTSSNTAYLQLSSLTSEDYAVYYCAISTMITLDYWGQGTTLTVS</u> <u>GGGGSGGGSGG</u> <u>GGG</u> <u>DIQMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYVFASTRE</u> <u>SGVPDRFIFGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHHYSTPLTFGAGTKLELKR</u>
SEQ ID NO:170: TF1413-02e040 scFv
<u>EVMLVESGPPELVKPGASMKISCKASGYSTGYTMNWKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTSYNQN</u> <u>FKGKATLTVDKSSSTAYMELLSTSEDSAVYYCARGYYGRFDYWGQGTTLTVS</u> <u>GGGGSGGGSGG</u> <u>GGGS</u> <u>DILLTQSPKFMSTSVGDRVSITCKASQNVRTAVAWYQQKPGQSPKALIYLASNRHTGVPDR</u> <u>FTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCLQHWNYPLTFGAGTKLELKR</u>

Таблица 5-2

SEQ ID NO:171: TF1413-03e001 scFv
QVQLKQSGPELVKPGASVKISCKASGYSTGYMHVVKQSHVKSLEWIGRINPYNGATSYNQNF
KDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCARNYGYFDYWGGGTTLTVS
GGGGSGGGSGGG
GGSDIKMTQSPKFMSTSVGDRVSVTCEASQNVNNDVWYQQKPGQSPKALIYSASYRSGVPDR
FTGSGSGTDFLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLEIKR
SEQ ID NO:172: TF1413-03e004 scFv
QVQLKQSGAEIVKPGAPVKLSCKASGYTFTSYWMNVVKQRPGRGLEWIGRIDPSDSETHYNQK
FKDKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCARGYYGSNYWGQGTTLTVS
GGGGSGGGSGGG
CSDIKMTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNAVWYQQKPGQSPKALIYSASYRSGVPDRF
TGSGSGTDFLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLELKR
SEQ ID NO:173: TF1413-03e005 scFv
QVQLKESGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYMHVVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTYAPKF
QGKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCNAFYDYDGYAMDYWGQGTSTVTVS
GGGGSGGG
GGGGGGSDIVMTQTPSSLSASLGERVSLTCRASQEQISGYLSWLQKPKDGTIKRLIYAATLDSG
VPKRFSGSRSGDYSLTISSEDFADYYCLQYASYPLTFGAGTKLELKR
SEQ ID NO:174: TF1413-03e015 scFv
EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTGYTMNVVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTSYNQK
FKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARGDYPPYAMDYWGQGTSTVTVS
GGGGSGGG
GGGGGGSDIVMSQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNAVWYQQKPGQSPKPLIYSASYRSG
VPRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLAEYFCQQYNRYPPLTFGVGKLEIKR
SEQ ID NO:175: TF1413-03e034 scFv
EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSTGYNMNVVKQSNKGSLEWIGNIDPYGGTSYNQKF
KGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARGNYGYAMDYWGQGTSTVTVS
GGGGSGGGG
SGGGGSDIVMSQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVRTAVAWYQQKPGQSPKALIYASNRHTGV
PDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFCLQHWNYPLTFGAGTKLELKR

В таблицах, линкер показан в рамке из двойной линии, VH подчеркнут одной линией, а VL подчеркнут двумя линиями.

Нуклеотидную последовательность, кодирующую каждый scFv анти-GPC3 из табл. 5, синтезировали путем оптимизации для кодонов человека и встраивали в вектор экспрессии CAR. Используемый ген CAR имел ген, кодирующий слитый пептид (пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 185), состоящий из трансмембранной области CD8 человека и области активации сигнальной трансдукции иммунными клетками CD28/4-1BB/CD3 дзета, саморасщепляющейся последовательности 2A, ген IL-7 человека, саморасщепляющейся последовательности 2A, гена CCL19 человека, саморасщепляющейся последовательности 2A и гена HSV-TK, расположенного в направлении 5'-3' гена scFv, и все это было включено в ретровирусный вектор MSGV1 (см. международную публикацию WO 2016/056228).

Получение GPC3 CAR-T клеток.

Векторы CAR GPC3, полученные из 11 типов клонов scFv, описанных выше, каждый временно вводили в упаковочные клетки GP2 с получением ретровирусных векторов. Т-клетки инфицировали этими векторами для переноса гена с целью индукции GPC3 CAR-T-клеток. Соотношение CARC-экспрессирующих GPC3 клеток к ген-переносимым Т-клеткам изменялось от 5,3 до 39,2%. Соответственно, следующий функциональный анализ осуществляли с использованием клеток CAR-T GPC3, полученных из 5 типов клонов scFv (TF1413-02d028, TF1413-02d039, TF1413-02e014, TF1413-02e030 и TF1413-03e005) с соотношением 25% или более.

Разрушающая активность GPC3 CAR-T-клеток в отношении GPC3-экспрессирующей клеточной линии.

Для изучения разрушающей активности GPC3 CAR-T-клеток в отношении злокачественных клеток проводили анализ одновременного культивирования GPC3 CAR-T-клеток и GPC3-экспрессирующей клеточной линии, то есть линии Sk-HEP-1 клеток гепатоцеллюлярной карциномы, активированной на экспрессию GPC3 (клеточная линия GPC3 Sk-HEP-1), или клеточную линию, не экспрессирующую GPC3 (ложная клеточная линия Sk-HEP-1). GPC3 CAR-T-клетки смешивали со злокачественными клетками-мишенями (линия клеток GPC3 Sk-HEP-1 или линия ложных клеток Sk-HEP-1) в пропорции 1:1 (1×10^5 клеток/лунка) и культивировали в 24-луночном планшете. Через 48 часов клетки восстанавливали, окрашивали анти-CD45 антителом и анализировали FCM с CD45-позитивными клетками в качестве GPC3 CAR-T-клеток и CD45-негативными клетками в качестве остальных злокачественных клеток [клетки GPC3 Sk-HEP-1]. По результатам, все GPC3 CAR-T-клетки, полученные из 5 типов клонов scFv, описанных выше, почти полностью уничтожали клетки GPC3 Sk-HEP-1, но не проявили разрушающей активности в отношении ложных клеток Sk-HEP-1 (см. фиг. 5 и 6). При использовании клеток, неинфицированных вирусным вектором (клетки без генного переноса ["Не инфицированы" на фиг. 5 и 6]), в качестве отрицательного контроля для GPC3 CAR-T-клеток, эти клетки не проявляли разрушающей активности

ни в отношении Sk-HEP-1 GPC3 клеток, ни в отношении ложных клеток Sk-HEP-1.

На основании этих результатов было показано, что GPC3 CAR-T-клетки, полученные из выбранных 5 типов клонов scFv против GPC3 (TF1413-02d028, TF1413-02d039, TF1413-02e014, TF1413-02e030 и TF1413-03e005), проявляют специфическую цитотоксическую активность против злокачественных GPC3-экспрессирующих клеток.

Способность GP-3 CAR-T-клеток продуцировать IFN- γ при распознавании клеток, экспрессирующих GPC3.

Кроме разрушающей активности в отношении GPC3-экспрессирующих (позитивных) злокачественных клеток, анализировали способность GPC3 CARC-T-клеток продуцировать IFN- γ . GPC3 CAR-T-клетки смешивали со злокачественными клетками-мишенями (клеточная линия GPC3 Sk-HEP-1 или ложная клеточная линия Sk-HEP-1) в пропорции 1:1 (1×10^5 клеток/лунка) и культивировали в течение 48 часов в 24-луночном планшете, и измеряли концентрацию IFN- γ , продуцируемого в культуральном супернатанте, с помощью ELSIA. В результате все GPC3 CAR-T-клетки, полученные из 5 типов клонов scFv, описанных выше, проявляли способность продуцировать IFN- γ зависимым от экспрессии GPC3 способом. В частности, GPC3 CAR-T-клетки, полученные из клона TF1413-02d028, продемонстрировали самую высокую способность продуцировать IFN- γ (см. фиг. 7).

Пример 4.

4. Получение гуманизированного антитела.

Гуманизированные антитела scFv конструировали на основе двух типов клонов scFv (TF1413-02d028 и 02d039), полученных в примере 1 (см. табл. 6). Использовали линкер, состоящий из 15 аминокислотных остатков с 3 повторами полипептида "GGGGS". К N-концу VH добавляли сигнальную последовательность Н-цепи иммуноглобулина человека SEQ ID NO: 188.

Таблица 6

SEQ ID NO:178: #5 VH1-15-VL1 (TF1413-02d028 scFv гуманизированное антитело 1)
<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYNMNWVRQAPGGGLEWIGNIDPYYGGTSYNQK</u> <u>FKGRATLTVDSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGDYRAYYFDYWGGGTTVTVSS</u> <u>GGGGSGGG</u> <u>GGGGGS</u> <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVRTAVAWYQQKPGKAPKALILASNRHTGV</u> <u>PSRFGSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHWNYPLTFGGGKTKVEIK</u>
SEQ ID NO:179: #5 VH2-15-VL1 (TF1413-02d028 scFv гуманизированное антитело 2)
<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYNMNWVRQAPGGGLEWIGNIDPYYGGTSYNQK</u> <u>FKGRVTLTVDSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGDYRAYYFDYWGGGTTVTVSS</u> <u>GGGGSGGG</u> <u>GGGGGS</u> <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVRTAVAWYQQKPGKAPKALILASNRHTGV</u> <u>PSRFGSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHWNYPLTFGGGKTKVEIK</u>
SEQ ID NO:180: #5 VH3-15-VL1 (TF1413-02d028 scFv гуманизированное антитело 3)
<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYNMNWVRQAPGGGLEWIGNIDPYYGGTSYNQK</u> <u>FKGRVTLTVDSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGDYRAYYFDYWGGGTTVTVSS</u> <u>GGGGSGGG</u> <u>GGGGGS</u> <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVRTAVAWYQQKPGKAPKALILASNRHTGV</u> <u>PSRFGSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQHWNYPLTFGGGKTKVEIK</u>
SEQ ID NO:181: #6 VH1-15-VL1 (TF1413-02d039 scFv гуманизированное антитело 1)
<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGSTYYPDIVK</u> <u>GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLRRAMDYWGQGTMTVTVSS</u> <u>GGGGSGGGGS</u> <u>GGGGGS</u> <u>DIVMTQSPSLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNR</u> <u>SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPLTFGGGKTKVEIK</u>
SEQ ID NO:182: #6 VH1-15-VL2 (TF1413-02d039 scFv гуманизированное антитело 2)
<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGSTYYPDIVK</u> <u>GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLRRAMDYWGQGTMTVTVSS</u> <u>GGGGSGGGGS</u> <u>GGGGGS</u> <u>DIVMTQSPSLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSSGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNR</u> <u>SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPLTFGGGKTKVEIK</u>
SEQ ID NO:183: #6 VH2-15-VL1 (TF1413-02d039 scFv гуманизированное антитело 3)
<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKRLWVAYISSGGGSTYYPDIVK</u> <u>GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLRRAMDYWGQGTMTVTVSS</u> <u>GGGGSGGGGS</u> <u>GGGGGS</u> <u>DIVMTQSPSLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNR</u> <u>SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPLTFGGGKTKVEIK</u>

В таблицах линкер показан в рамке из двойной линии, VH подчеркнут одной линией, а VL подчеркнут двумя линиями.

Промышленная применимость

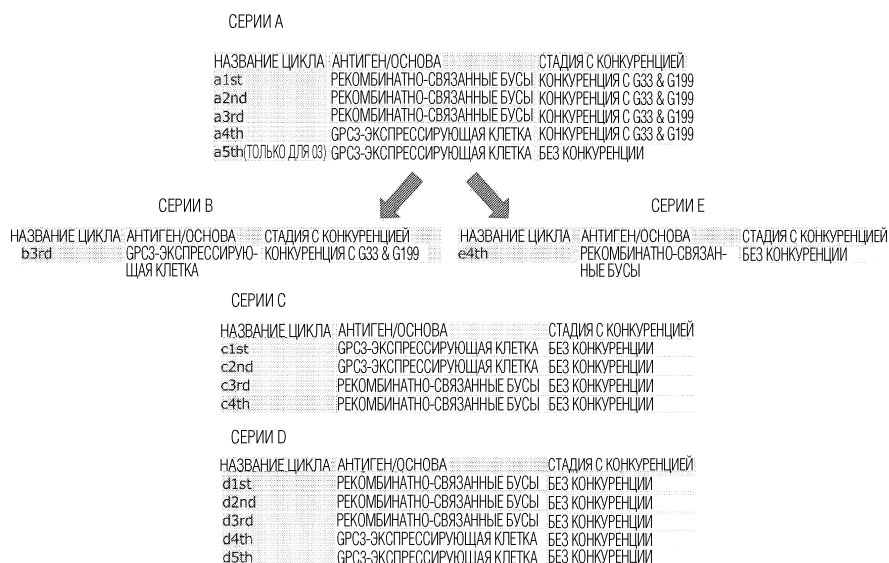
Настоящее изобретение вносит вклад в область иммунотерапии злокачественных опухолей.

CDR3 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6.

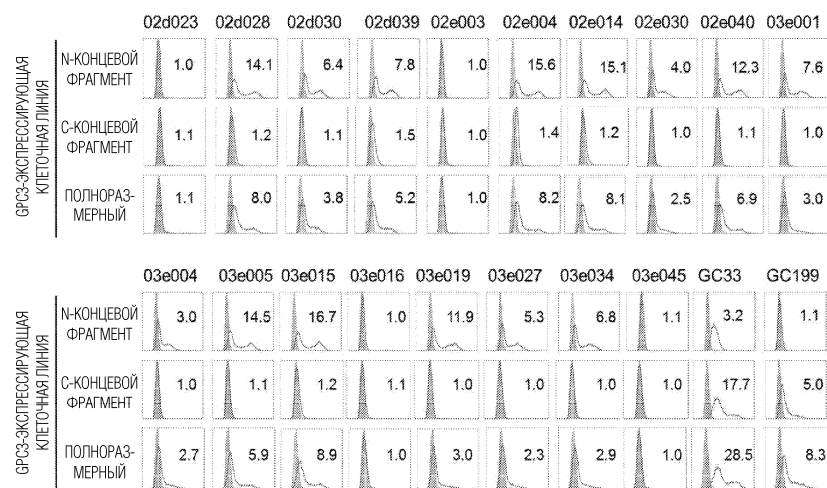
CDR3 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16.

содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% или больше идентична по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 183, или

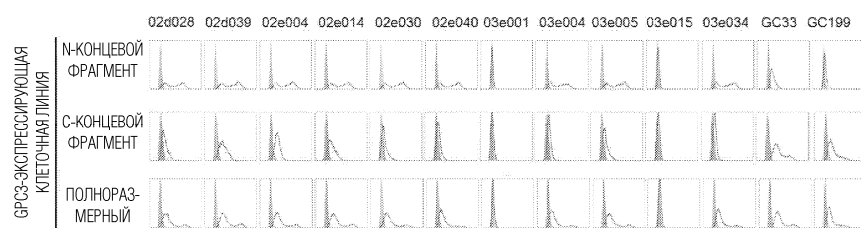
12. Антитело по п.7 или 8, где антитело содержит тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80% или больше идентична по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80% или больше идентична по последовательности аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20.
13. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий антитело по любому из пп.3-5 и 9-11, трансмембранную область, слитую с карбоксильным концом антитела, и область активации сигнальной трансдукции иммунокомпетентной клетки, слитую с карбоксильным концом трансмембранной области.
14. CAR по п.13, содержащий любую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 185-187.
15. Ген, кодирующий CAR по п.13 или 14.
16. Иммунокомпетентная клетка, экспрессирующая CAR по п.13 или 14, в которую введен ген по п.15.
17. Иммунокомпетентная клетка по п.16, в которую дополнительно введен ген интерлейкина 7 (IL-7) и лиганда хемокина 19 (CCL19).
18. Ген, кодирующий антитело по любому из пп.1-12.
19. Вектор, содержащий промотор и ген по п.15, где ген функционально связан с промотором, расположенным ниже в сигнальном пути.
20. Иммунокомпетентная клетка, экспрессирующая CAR по п.13 или 14, в которую дополнительно введен вектор по п.19.
21. Иммунокомпетентная клетка по п.20, в которую введен ген интерлейкина 7 (IL-7) и лиганда хемокина 19 (CCL19).
22. Вектор, содержащий промотор, и ген по п.18, где ген функционально связан с промотором, расположенным ниже в сигнальном пути.
23. Клетка-хозяин, в которую введен вектор по п.19 или 22.
24. Применение антитела по любому из пп.1-12 для детекции GPC3 (глипикан-3).
25. Набор для детекции GPC3 (глипикан-3), отличающийся тем, что содержит антитело по любому из пп.1-12 или его меченный вариант.



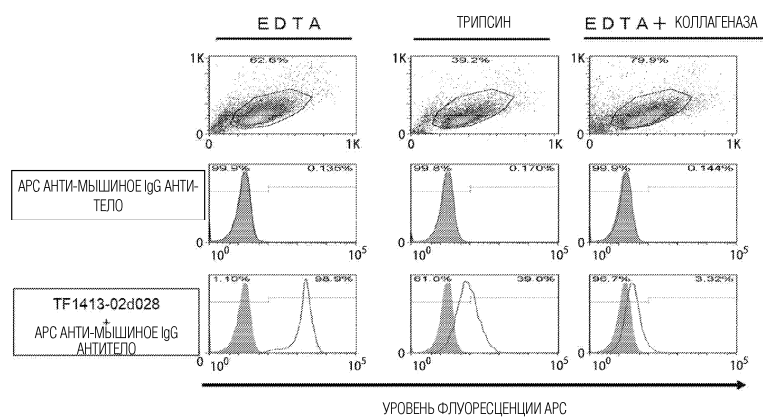
Фиг. 1



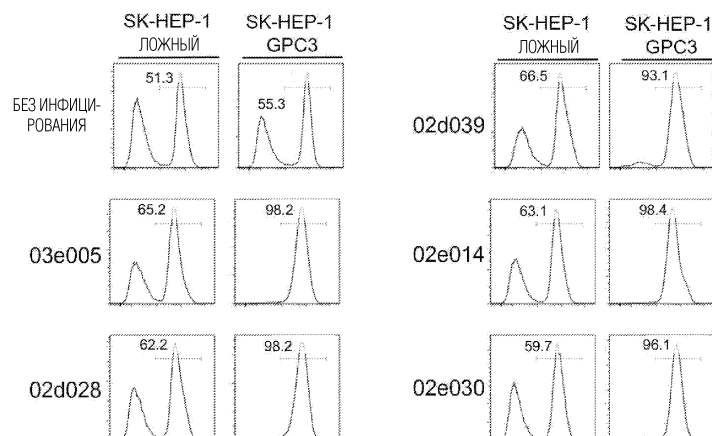
Фиг. 2



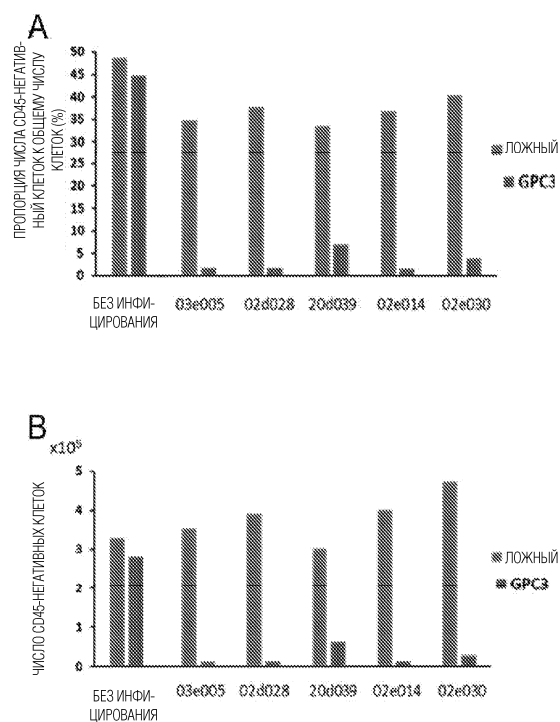
Фиг. 3



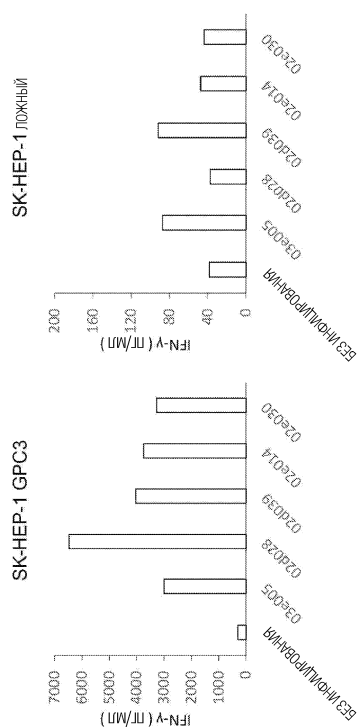
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2