

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292970 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.13

(22) Дата подачи заявки
2021.04.23

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 15/87 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ПОМОЩЬЮ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ

(31) 63/014,831
(32) 2020.04.24
(33) US
(86) PCT/EP2021/060620
(87) WO 2021/214269 2021.10.28
(88) 2021.12.09
(71) Заявитель:
АСТРАЗЕНЕКА АБ (SE)

(72) Изобретатель:
Муди Гордон, Джардино Торкья
Мария Летиция, Оверстрит Майкл
Глен, Гилбрет Райан (US)

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

(57) Изобретение относится к композициям и способам лечения рака с применением армированных клеток с химерным антигенным рецептором.



202292970 A1

202292970 A1

**КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ПОМОЩЬЮ ХИМЕРНЫХ
АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ
ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее изобретение относится к лечению рака с применением Т-клеток с химерным антигенным рецептором.

Уровень техники

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

[0002] Терапия с использованием Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR) представляет собой специфическую форму иммунотерапии на основе клеток, в которой для борьбы с раком применяются сконструированные Т-клетки. При терапии с использованием Т-клеток с CAR Т-клетки собирают из крови пациента, конструируют *ex vivo* для экспрессии CAR, содержащих как антигенсвязывающие домены, так и домены, активирующие Т-клетки, увеличивают количество до более крупной популяции и вводят пациенту. Т-клетки с CAR действуют как лекарственное средство на основе живых клеток, связываясь с раковыми клетками и вызывая их разрушение. В случае успеха эффекты лечения Т-клетками с CAR имеют тенденцию быть длительными, о чем свидетельствует выявление персистенции и увеличения количества Т-клеток с CAR у пациентов спустя долгое время после клинической ремиссии.

2. *Структура и функция CAR*

[0003] Антигенсвязывающий домен CAR представляет собой внеклеточную область, которая нацелена на поверхностный антиген на опухолевых клетках. Подходящими целевыми антигенами могут быть белки, фосфорилированные белки, пептид-MHC, углеводы или молекулы гликолипидов. Идеальные целевые антигены в больших количествах экспрессируются на опухолевых клетках, что дает возможность нацеливаться на высокий процент раковых клеток. Идеальные кандидатные целевые антигены также обычно экспрессируются в минимальных количествах в нормальных тканях, что ограничивает внеопухолевую токсичность в мишени. Антигенсвязывающий домен CAR содержит нацеливающий фрагмент, такой как одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела (scFv), который направлен против целевого антигена.

[0004] Домен CAR, активирующий Т-клетки, является внутриклеточным и активирует Т-клетку в ответ на взаимодействие антигенсвязывающего домена с целевым антигеном. Домен, активирующий Т-клетки, может содержать один или несколько костимулирующих доменов, которые представляют собой внутриклеточные домены известных активирующих Т-клеточных рецепторов. Отбор и расположение костимулирующих

доменов в конструкции с CAR влияют на функцию и судьбу Т-клеток с CAR, поскольку костимулирующие домены по-разному влияют на кинетику Т-клеток с CAR, цитотоксическую функцию и профиль безопасности.

[0005] Внеклеточные антигенсвязывающие и внутриклеточные домены CAR, активирующие Т-клетки, связаны посредством трансмембранного домена, шарнира и необязательно спейсерной области. Шарнирный домен представляет собой короткий пептидный фрагмент, который обеспечивает конформационную свободу для облегчения связывания с целевым антигеном на опухолевой клетке. Его можно применять отдельно или в сочетании со спейсерным доменом, который проецирует scFv от поверхности Т-клетки. Оптимальная длина спейсера зависит от близости связывающего эпитопа к поверхности клетки.

[0006] Терапия с использованием Т-клеток с CAR против антигена В-лимфоцитов CD19 (Kymriah[®], Novartis) продемонстрировала многообещающие результаты при остром лимфоцитарном лейкозе у детей, и терапия с использованием Т-клеток с CAR против антигена созревания В-клеток ("bb2121," совместный проект Celgene[®] и bluebirdbio[®]) продемонстрировала многообещающие результаты в отношении рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломы. Более свежие данные свидетельствуют о том, что подход с CAR может быть эффективным против солидных опухолей. Терапия с использованием естественных Т-клеток-киллеров с CAR GD2 (NKT) продемонстрировала активность при нейробластоме (Heczey A, et al. Invariant NKT cells with chimeric antigen receptor provide a novel platform for safe and effective cancer immunotherapy. *Blood*; 124(18):2824–33, 2014) и мезотелин-содержащие Т-клетки с CAR с пембролизумабом продемонстрировали противоопухолевую активность при мезотелиоме. Однако необходимы дополнительные мишени для лечения солидных опухолей.

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

[0007] К сожалению, сложности, связанные с терапией на основе Т-клеток с CAR, могут приводить к нежелательным и небезопасным эффектам. Токсические эффекты, такие как нейротоксичность и острый респираторный дистресс-синдром, являются потенциальными побочными эффектами терапии с использованием Т-клеток с CAR и являются потенциально фатальными. Синдром высвобождения цитокинов (CRS) является наиболее распространенным проявлением острой токсичности, ассоциированной с Т-клетками с CAR. CRS возникает, когда лимфоциты сильно активируются и высвобождают избыточные количества воспалительных цитокинов. Случаи повышения содержания интерлейкина 2, интерлейкина 6, интерлейкина 1 бета, GM-CSF и/или С-реактивного белка в сыворотке крови иногда наблюдаются у пациентов с CRS при анализе этих

факторов. CRS классифицируется по степени тяжести и диагностируется как одна из степеней 1-4 (от легкой до тяжелой), при этом более серьезные случаи клинически характеризуются высокой температурой, гипотензией, гипоксией и/или полиорганной токсичностью у пациента. В одном исследовании сообщалось, что у 92% пациентов с острым лимфоцитарным лейкозом, получавших лечение посредством терапии с использованием Т-клеток с CAR для CD19, наблюдался CRS, и у 50% данных пациентов развились симптомы 3-4 степени (Fitzgerald *et al.*, *Crit Care Med.* 45(2): e124–e131 (2017)).

[0008] Еще одной сложной задачей для успешной иммунотерапии с использованием Т-клеток с CAR является иммуносупрессия, обусловленная характеристиками опухолевого микроокружения (TME) солидных опухолей. Опухолевое микроокружение (TME) солидных опухолей может быть метаболически неблагоприятным в отношении Т-клеток с CAR вследствие ограниченной доступности питательных веществ. Данные неблагоприятные условия приводят к конкуренции за питательные вещества, утрате метаболической приспособленности Т-клеток и снижению содержания кислорода (т. е. "гипоксии"). Гипоксия снижает уровень Т-клеточной активации и пролиферации, а также уровень выработки цитокинов и литических ферментов. Ключевым участником данных эффектов является индуцируемый гипоксией фактор-1 α (HIF-1 α), который представляет собой альфа-субъединицу фактора транскрипции, представляющего собой индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1). HIF-1 α является главным регулятором клеточного и системного гомеостатического ответа на гипоксию, что делает его ключевым фактором в гомеостазе кислорода. HIF-1 α также контролирует транскрипцию генов, участвующих в энергетическом обмене, ангиогенезе, апоптозе, а также других генов, которые облегчают метаболическую адаптацию к гипоксии. Кроме того, HIF-1 α играет важную роль в активации Т-клеток. Он заставляет Т-клетки проявлять полный эффекторный фенотип, который включает выработку цитокина и литических гранул, высокий уровень гликолиза, высокую метаболическую активность и выработку высокоактивных форм кислорода (ROS). Такой фенотип приводит к снижению количества эффекторных Т-клеток в участках опухоли, снижению способности к поддержанию эффекторных свойств и снижению персистенции. Было показано, что снижение уровня эффекторного фенотипа приводит к увеличению количества эффекторных клеток с повышенной активностью в участках опухоли и более высокой персистенции (Kishton, R. J., Sukumar, M., & Restifo, N. P. (2017). Metabolic Regulation of T Cell Longevity and Function in Tumor Immunotherapy. *Cell Metab*, 26(1), 94-109). Таким образом, иммуносупрессия, опосредованная HIF-1 α , также представляет собой значительное препятствие, которое необходимо преодолеть для

получения эффективной и устойчивой терапии с использованием Т-клеток с CAR для солидных опухолей.

4. Армирование

[0009] Новый подход к получению Т-клеток с CAR, которые являются более устойчивыми к опухолеассоциированной иммуносупрессии, называется "армированием". Армирование представляет собой молекулярную манипуляцию в отношении Т-клетки с CAR с экспрессированием одной или нескольких "армирующих молекул", которые могут противодействовать иммуносупрессии. Например, экспрессия армирующей молекулы доминантно-негативного HIF-1 α (HIF 1 α DN) в клетках рака поджелудочной железы, устойчивых к апоптозу, индуцируемому гипоксией и депривацией глюкозы, обусловленными HIF-1 α , делала клетки чувствительными к апоптозу и подавлению роста, индуциваемым гипоксией и депривацией глюкозы. (Che *et al.*, Dominant-Negative Hypoxia-Inducible Factor-1 α Reduces Tumorigenicity of Pancreatic Cancer Cells through the Suppression of Glucose Metabolism, *Am J Pathol*, **162**(4), 1283-1291 (2003)).

[0010] Следовательно, необходимы дополнительные виды терапии с использованием Т-клеток с CAR, чтобы расширить арсенал эффективных видов лечения рака. Такие виды терапии должны включать Т-клетки с CAR, которые обеспечивают эффективное лечение рака и одновременное сведение к минимуму риска развития опасных воспалительных ответных реакций, таких как CRS. Кроме того, такие виды терапии должны включать Т-клетки с CAR, которые могут персистировать в иммуносупрессивном ТМЕ солидных опухолей.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0011] В настоящем изобретении описаны композиции и способы применения Т-клеток с CAR для лечения рака. Как описано ниже, в первом аспекте предусмотрена выделенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая (a) химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит антигенсвязывающий домен, специфический в отношении антигена клеточной поверхности; и (b) армирующую молекулу, где армирующая молекула противодействует иммуносупрессии клетки в микроокружении опухоли при ее экспрессии на поверхности клетки.

[0012] В другом аспекте в настоящем изобретении описана клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), и армирующую молекулу HIF1 α DN, экспрессированную на поверхности клетки.

[0013] В дополнительном аспекте в настоящем изобретении описана клетка, содержащая химерный антигенный рецептор (CAR) для GPC3, предусматривающий антигенсвязывающий домен, где антигенсвязывающий домен содержит антитело, Fab или

scFv, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), где VH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, и где VL содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 44, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 45; и армирующую молекулу HIF1 α DN.

[0014] В еще одном аспекте в настоящем изобретении описан способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, клетки, где клетка содержит (a) химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении антигена клеточной поверхности, и (b) армирующую молекулу, где армирующая молекула противодействует иммуносупрессии клетки в опухолевом микроокружении рака.

[0015] Эти и другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут более понятны из следующего подробного описания, взятого вместе с прилагаемой формулой изобретения. Следует отметить, что объем формулы изобретения определяется приведенными в ней формулировками, а не конкретным обсуждением признаков и преимуществ, изложенных в настоящем описании.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0016] Сопроводительные графические материалы включены для обеспечения дальнейшего понимания способов и композиций по настоящему изобретению. Графические материалы иллюстрируют один или несколько вариантов осуществления настоящего изобретения и вместе с описанием служат для пояснения принципов и действия настоящего изобретения.

[0017] **Фиг. 1. Армирование Т-клеток с CAR для GPC3 с помощью HIF1 α DN.** Схематическое изображение структуры HIF1 α DN.

[0018] **Фиг. 2А-2С. HIF1 α DN сверхэкспрессирован по сравнению с эндогенным HIF1 α .**

Нетрансдуцированные (UT) клетки, неармированные Т-клетки с CAR для GPC3 и Т-клетки с CAR для GPC3 HIF1 α DN размножали в условиях с нормальным содержанием кислорода (20% O₂) или в условиях гипоксии (1% O₂). **2А.** На графике показана экспрессия mRNA эндогенного HIF1 α для каждого образца, выраженная в виде кратности индукции по сравнению с UT, размножавшимися при (20% O₂). **2В.** Экспрессия эндогенного белка HIF1 α в нетрансдуцированных клетках, неармированных Т-клетках с

CAR для GPC3 и Т-клетках с CAR для GPC3 HIF1 α DN в условиях с нормальным содержанием кислорода (20% O₂) и в условиях гипоксии (1% O₂). β -актин применяли в качестве контроля нагрузки. **2С.** Кратность индукции HIF1 α DN по сравнению с экспрессией mRNA эндогенного HIF1 α в нетрансдуцированных клетках (UT), Т-клетках с CAR для GPC3 и Т-клетках с CAR для GPC3 HIF1 α DN, размножавшихся в условиях с нормальным содержанием кислорода (20% O₂) и в условиях гипоксии (1% O₂).

[0019] **Фиг. 3. CAR-Т, экспрессирующие HIF1 α DN, являются менее дифференцированными.** Дифференцировку нетрансдуцированных клеток (UT), Т-клеток с CAR для GPC3 и Т-клеток с CAR для GPC3 HIF1 α DN в условиях с нормальным содержанием кислорода или в условиях гипоксии анализировали посредством проточной цитометрии. На столбиковой диаграмме представлена частота встречаемости эффекторных Т-клеток памяти CD62L^{low} CD45RO^{high} (T_{EM}), которую оценивали посредством проточной цитометрии.

[0020] **Фиг. 4. Анализ стволовости в Т-клетках с CAR HIF1 α DN с помощью Nanostring.** Экспрессия генов, ассоциированных со стволовостью (стрелка в верхней части) и эффекторной функцией (нижняя часть). Гены экспрессированы как GPC3 HIF1 α DN по сравнению с GPC3.

[0021] **Фиг. 5. GPC3-CAR-модифицированные Т-клетки, экспрессирующие доминантно-негативный HIF1 α , демонстрируют усиление окислительного фосфорилирования при острой активации.** (А) На верхней панели показана OCR для GPC3-CAR-модифицированных и GPC3-CAR-модифицированных Т-клеток с доминантно-негативным HIF1 α при стандартных условиях культивирования и в ответ на активирующие гранулы, покрытые антителами к CD3/CD28, и олигомицин. На нижней панели показана стандартная OCR и повышение OCR после острой активации покоящихся Т-клеток. Данные показаны в виде средних значений \pm SD. (В) На верхней панели показана ECAR для GPC3-CAR-модифицированных и GPC3-CAR-модифицированных Т-клеток с доминантно-негативным HIF1 α при стандартных условиях культивирования и в ответ на активирующие гранулы, покрытые антителами к CD3/CD28, и экзогенную глюкозу. На нижней панели показана стандартная ECAR и повышение ECAR после острой активации покоящихся Т-клеток. Данные показаны в виде средних значений \pm SD. (**P < 0,01, ***P < 0,001; знаковый ранговый критерий Уилкоксона для согласованных пар).

[0022] **Фиг. 6. Т-клетки с CAR HIF1 α DN дегранулируют при встрече с антигеном.** Анализ UT, Т-клеток с CAR для GPC3, Т-клеток с CAR для GPC3 HIF1 α DN посредством проточной цитометрии в отношении экспрессии CD107a, маркера дегрануляции и

токсичности, в присутствии клеток Нер3В (GPC3⁺) или SNU182 (GPC3⁻) после размножения Т-клеток с CAR при культивировании в условиях с нормальным содержанием кислорода (слева) и в условиях гипоксии (справа). Т-клетки с CAR дегранулируют *in vitro* в ответ на встречу с антигеном даже при размножении в условиях гипоксии. Т-клетки с CAR HIF1 α DN эффективно дегранулируют, даже если они активированы в меньшей степени и дифференцированы в покоящемся состоянии.

[0023] **Фиг. 7. Т-клетки с CAR HIF1 α DN вырабатывают меньше IFN и IL-2, но сходное количество TNF α при встрече с антигеном.** Концентрация IFN γ , IL-2 и TNF α в надосадочной жидкости культуры UT, Т-клеток с CAR для GPC3 и Т-клеток с CAR для GPC3 HIF1 α DN, размножавшихся в условиях с нормальным содержанием кислорода или в условиях гипоксии, через 24 ч после встречи с антигеном (GPC3) в условиях с нормальным содержанием кислорода.

[0024] **Фиг. 8 Эктопический доминантно-негативный HIF1 α обеспечивает получение полифункциональных Т-клеток при стимуляции в условиях с низким содержанием кислорода. (А)** Репрезентативные графики проточной цитометрии для внутриклеточного окрашивания цитокинов IFN- γ , IL-2, TNF- α GPC3-CAR–модифицированных и GPC3-CAR–модифицированных Т-клеток с доминантно-негативным HIF1 α после стимуляции с помощью PMA и иономицина в течение 6 ч. **(В)** Столбиковые диаграммы, изображающие качество цитокинового ответа для CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, как определено с помощью булевой комбинации вентиляей, идентифицирующих IFN- γ ⁺, IL-2⁺ и TNF- α ⁺ клетки. Числа на оси Y обозначают процентные доли клеток.

[0025] **Фиг. 9. Т-клетки с CAR HIF1 α DN быстро и эффективно уничтожают клетки-мишени.** Нацеливание и уничтожение посредством цитолиза клеток-мишеней Нер3В нетрансдуцированными клетками (UT), Т-клетками с CAR для GPC3 и Т-клетками с CAR для GPC3 HIF1 α DN измеряли в условиях с нормальным содержанием кислорода и в условиях гипоксии. Импедансный анализ уничтожения в режиме реального времени (RTCA) xCelligence® применяли для измерения % цитолиза клеток Нер3В с течением времени. Клетки UT имели минимальный цитолитический эффект в отношении клеток-мишеней, в то время как Т-клетки с CAR для GPC3, так и Т-клетки с CAR HIF1 α DN имели значительный цитолитический эффект. Неожиданно, Т-клетки с CAR HIF1 α DN демонстрировали более быстрое уничтожение клеток-мишеней по сравнению с неармированными Т-клетками с CAR как в условиях с нормальным содержанием кислорода, так и в условиях гипоксии. Данные неожиданные результаты демонстрируют, что армирование Т-клеток с CAR с помощью HIF1 α DN обеспечивает дополнительные преимущества для Т-клеток с CAR помимо устойчивости к гипоксии, и позволяют

предположить, что HIF1 α DN может быть применим для улучшения эффективности других Т-клеток с CAR независимо от целевого антигена CAR.

[0026] **Фиг. 10. Скорость и эффективность цитолиза клеток-мишеней в зависимости от соотношения Е:Т в условиях с нормальным содержанием кислорода и в условиях гипоксии.** Цитолитическая способность UT, Т-клеток с CAR для GPC3 и Т-клеток с CAR для GPC3 HIF1 α DN, размножавшихся в условиях с нормальным содержанием кислорода (слева) и в условиях гипоксии (справа), в отношении клеток Нер3В при различных соотношениях эффектора и мишени (Е:Т). Показатели измеряли посредством импедансного анализа уничтожения в режиме реального времени (RTCA) xCelligence® и выражали в виде КТ80 (времени, необходимого для уничтожения 80% мишени).

[0027] **Фиг. 11. Визуализация цитолиза клеток-мишеней Нер3В.** Микрофотографии цитолиза клеток-мишеней Нер3В клетками UT, Т-клетками с CAR для GPC3 и Т-клетками с CAR для GPC3 HIF1 α DN через 3 часа после введения клеток (нижние панели) в условиях с нормальным содержанием кислорода. На верхних панелях показаны Т-клетки при отсутствии клеток-мишеней.

[0028] **Фиг. 12. Цитолиз клеток-мишеней.** Цитолиз клеток-мишеней HUH7 и PLC-PRF15 клетками UT, Т-клетками с CAR для GPC3 и Т-клетками с CAR для GPC3 HIF1 α DN в условиях с нормальным содержанием кислорода при Е:Т, составляющем 1:1. Т-клетки с CAR для GPC3 и Т-клетки с CAR для GPC3 HIF1 α DN демонстрировали сходные показатели скорости цитолиза для каждого типа клеток.

[0029] **Фиг. 13. Клеточная пролиферация в присутствии целевого антигена.** Антигензависимая клеточная пролиферация, измеренная с помощью разбавлений сукцинимидилового сложного эфира диацетата карбоксифлуоресцеина (CFSE).

[0030] **Фиг. 14. Экспрессия HIF1 α DN повышает эффективность CAR-T *in vivo* (HUH7).** Мышей NSG инокулировали клетками HUH7 подкожно и, когда объем опухоли достигал примерно 150 мм³, осуществляли внутривенную инфузию 7 x 10⁶ UT, Т-клеток с CAR для GPC3 или Т-клеток с CAR для GPC3 HIF1 α DN. Объем опухоли измеряли два раза в неделю.

[0031] **Фиг. 15. Экспрессия HIF1 α DN повышает эффективность CAR-T *in vivo* (Нер3В).** Мышей NSG инокулировали клетками Нер3В подкожно и, когда объем опухоли достигал примерно 150 мм³, осуществляли внутривенную инфузию 7 x 10⁶ UT, Т-клеток с CAR для GPC3 или Т-клеток с CAR для GPC3 HIF1 α DN. Объем опухоли измеряли два раза в неделю.

[0032] **Фиг. 16. Экспрессия HIF1 α DN повышает способность CAR-T инфильтрировать солидные опухоли.** Мышей NSG инокулировали клетками Her3B подкожно и, когда объем опухоли достигал примерно 175 мм³, осуществляли внутривенную инфузию 7×10^6 UT, Т-клеток с CAR для GPC3 или Т-клеток с CAR для GPC3 HIF1 α DN. Частоту встречаемости и количество Т-клеток в опухоли оценивали посредством проточной цитометрии через 7 дней после инфузии.

[0033] **Фиг. 17. Высокий уровень IFN γ в сыворотке крови мышей, получавших обработку CAR-T HIF1 α DN.** Концентрация IFN- γ , выявленная в сыворотке крови мышей, несущих опухоли Her3B и получавших инфузию нетрансдуцированных Т-клеток, неармированных или армированных Т-клеток с CAR для GPC3.

[0034] **Фиг. 18. CAR-T HIF1 α DN поддерживают менее дифференцированный фенотип на периферии.** Частота встречаемости CD70⁺CD27⁻ Т-клеток с CAR в селезенке мышей, несущих опухоли Her3B и получавших инфузию нетрансдуцированных Т-клеток, неармированных или армированных Т-клеток с CAR для GPC3.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

1. Определения

[0035] Если не определено иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют значение, обычно понятное специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Следующие литературные источники обеспечивают специалиста в данной области общим определением многих терминов, применяемых в настоящем изобретении: Singleton, et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger, et al. (eds.), Springer Verlag (1991) и Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Как применяется в данном документе, следующие термины имеют значения, приписываемые им ниже, если не указано иначе.

[0036] Применяемые в данном документе термины "содержать" и "включать" и их варианты (например, "содержит", "содержащий", "включает" и "включающий") следует понимать как обозначающие включение указанного компонента, признака, элемента, или стадии, или группы компонентов, признаков, элементов или стадий, но не исключение любого другого компонента, признака, элемента, или стадии, или группы компонентов, признаков, элементов или стадий. Любой из терминов "содержащий", "состоящий по сути из" и "состоящий из" могут заменяться любым из двух других терминов, сохраняя при этом их обычные значения.

[0037] Применяемые в данном документе формы единственного числа включают формы множественного числа, если в контексте явно не указано иное.

[0038] Процентные значения, раскрытые в данном документе, могут варьироваться в пределах ± 10 , 20 или 30% от раскрытых значений и остаются в рамках предусмотренного раскрытия.

[0039] Если не указано иное или иное не очевидно из контекста и не понимается специалистом обычной квалификации в данной области техники, то значения в данном документе, которые выражены в виде диапазонов, могут принимать любое конкретное значение или поддиапазон в пределах указанных диапазонов в различных вариантах осуществления настоящего изобретения, вплоть до десятых долей единицы нижнего предела диапазона, если контекст явно не предусматривает иное.

[0040] Применяемые в данном документе диапазоны и количества могут быть выражены как "приблизительно" конкретное значение или диапазон. Термин "приблизительно" также включает точное количество. Например, "приблизительно 5%" означает "приблизительно 5%", а также "5%". Термин "приблизительно" также может относиться к $\pm 10\%$ от заданного значения или диапазона значений. Следовательно, приблизительно 5% также означает, например, 4,5-5,5%. Если иное не очевидно из контекста, все числовые значения, представленные в данном документе, модифицированы с помощью термина "приблизительно".

[0041] Применяемые в данном документе термины "или" и "и/или" могут описывать несколько компонентов в комбинации или за исключением друг друга. Например, "x, y, и/или z" может относиться только к "x", только к "y", только к "z", "x, y и z", "(x и y) или z" "x или (y и z)" или "x, или y, или z".

[0042] Применяемый в данном документе термин "полипептид" относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любой цепи или цепям из двух или более аминокислот. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок", "аминокислотная цепь" или любой другой термин, применяемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот, включены в определение "полипептида", и термин "полипептид" можно применять вместо любого из этих терминов или взаимозаменяемо с любым из них.

[0043] Применяемый в данном документе термин "белок" может относиться к отдельному полипептиду, т. е. отдельной аминокислотной цепи, как определено выше, но также может относиться к двум или более полипептидам, которые связаны, например, с

помощью дисульфидных связей, водородных связей или гидрофобных взаимодействий с образованием мультимерного белка.

[0044] "Выделенное" вещество, например, выделенная нуклеиновая кислота, представляет собой вещество, которое не находится в своем естественном окружении, хотя оно не обязательно является очищенным. Например, выделенная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая не вырабатывается или не находится в своем нативном или естественном окружении, таком как клетка. Выделенное вещество может быть отделено, фракционировано или по меньшей мере частично очищено с помощью любой подходящей методики.

[0045] Применяемые в данном документе термины "антитело" и "его антигенсвязывающий фрагмент" относятся к по меньшей мере минимальной части антитела, способной связываться с конкретным антигеном, на который нацелено антитело, например, с по меньшей мере некоторыми из определяющих комплементарность областей (CDR) переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL) в контексте типичного антитела, вырабатываемого В-клеткой. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой поликлональные, моноклональные, человеческие, гуманизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитопсвязывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, Fv с дисульфидными связями (sdFv), фрагменты, содержащие домен VL или VH либо отдельно, либо в сочетании с частью противоположного домена (например, всего домена VL и частичного домена VH с одной, двумя или тремя CDR) и фрагменты, полученные с помощью экспрессионной библиотеки Fab. Молекулы scFv известны из уровня техники и описаны, например, в патенте США № 5892019. Молекулы антител, охватываемые настоящим изобретением, могут быть получены из любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина.

[0046] Применяемый в данном документе термин "полинуклеотид" включает одну нуклеиновую кислоту, а также несколько нуклеиновых кислот и относится к выделенной молекуле или конструкции нуклеиновой кислоты, например, матричной РНК (mRNA) или плазмидной ДНК (pDNA). Термин "нуклеиновая кислота" включает любой тип нуклеиновой кислоты, такой как ДНК или РНК.

[0047] Применяемый в данном документе термин "вектор" может относиться к молекуле нуклеиновой кислоты, введенной в клетку-хозяина, в результате чего образуется трансформированная клетка-хозяин. Вектор может содержать последовательности

нуклеиновой кислоты, которые обеспечивают его репликацию в клетке-хозяине, такие как точка начала репликации. Вектор также может содержать один или несколько генов селективируемых маркеров и другие генетические элементы, известные из уровня техники. Конкретные типы векторов, рассматриваемых в данном документе, могут быть ассоциированы с вирусами или включены в них для облегчения трансформации клеток.

[0048] "Трансформированная" клетка или "клетка-хозяин" представляет собой клетку, в которую с помощью методик молекулярной биологии была введена молекула нуклеиновой кислоты. Все методики, с помощью которых молекула нуклеиновой кислоты может быть введена в такую клетку, включая трансфекцию вирусными векторами, трансформацию плазмидными векторами и введение "оголенной" ДНК с помощью электропорации, липофекции и ускорения частиц генной пушкой, предусмотрены в данном документе.

[0049] Применяемый в данном документе термин "аффинность" относится к мере силы связывания антигена или мишени (такой как эпитоп) с его когнатным связывающим доменом (таким как паратоп). Применяемый в данном документе, термин "авидность" относится к общей стабильности комплекса между популяцией эпитопов и паратопов (т. е. антигенов и антигенсвязывающих доменов).

[0050] Применяемые в данном документе термины "лечить", "лечение" или "лечение чего-либо" при применении в контексте лечения рака относятся к ослаблению патологических изменений при заболевании, ослаблению или устранению симптомов заболевания, повышению показателей выживаемости и/или уменьшению дискомфорта. Например, лечение может относиться к способности терапевтического препарата при введении субъекту ослаблять симптомы, признаки или причины заболевания. Лечение также относится к смягчению или уменьшению интенсивности по меньшей мере одного клинического симптома, и/или к подавлению либо задержке прогрессирования состояния, и/или к предупреждению либо задержке начала проявления заболевания или болезни.

[0051] Применяемые в данном документе термины "субъект", "индивидуум" или "пациент" относятся к любому субъекту, в частности, к субъекту-млекопитающему, для которого требуются диагноз, прогноз или терапия. Субъекты-млекопитающие включают, например, людей, приматов, отличных от человека, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот, медведей и т. д.

[0052] Применяемый в данном документе термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" вводимого терапевтического вещества, такого как Т-клетки с CAR, представляет собой количество, достаточное для достижения конкретно заявленной или предполагаемой цели, такой как осуществление лечения или

лечение рака. "Эффективное количество" в отношении поставленной задачи можно определить эмпирическим обычным способом.

2. *Общий обзор*

[0053] Настоящее изобретение направлено на композиции и способы лечения рака с применением терапии с использованием клеток с химерными антигенными рецепторами (CAR). Более конкретно, настоящее изобретение относится к видам терапии с использованием клеток с CAR, где трансформированные клетки, такие как Т-клетки, экспрессируют CAR, которые, например, нацелены на глипикан-3 (GPC3). Конструкции с CAR, трансформированные клетки, экспрессирующие указанные конструкции, и виды терапии с использованием трансформированных клеток, раскрытые в данном документе, могут обеспечить надежные способы лечения рака с минимальным риском синдрома высвобождения цитокинов (CRS) или неизбирательного высвобождения цитокинов в неспецифических GPC3-экспрессирующих клетках.

[0054] Без ограничения какой-либо теорией считается, что GPC3 является жизнеспособной раковой мишенью во многих модальностях, включая биспецифические активаторы Т-клеток, клетки с CAR, а также моноклональные антитела и конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC). Онкофетальный антиген GPC3 представляет собой GPI-связанный протеогликан сульфата гепарина. GPC3 стабилизирует взаимодействие Wnt-Fzd, стимулируя передачу сигналов Wnt. GPC3 конкурирует с Patched за связывание с Hh, ослабляя подавление Smoothed и индуцируя разрушение GPC3. Было показано, что оба пути стимулируют рост гепатоцеллюлярной карциномы (HCC). И было показано, что уровни экспрессии GPC3 коррелируют со стадией и степенью HCC.

[0055] Кроме того, считается, что GPC3 представляет собой перспективную мишень для терапии с использованием клеток с CAR. Следовательно, антитела и конструкции с CAR, полученные от этих антител, были разработаны, как описано в данном документе.

[0056] Дополнительный аспект настоящего изобретения включает Т-клетки с CAR, например, таковые, нацеленные на GPC3, и другие, которые являются армированными с помощью HIF1 α DN для защиты Т-клеток с CAR от иммуносупрессии, ассоциированной с гипоксическим опухолевым микроокружением (TME), например, солидных опухолей.

3. *Схема конструкции с CAR*

[0057] Конструкции с CAR по настоящему изобретению могут иметь несколько компонентов, многие из которых могут быть отобраны на основе требуемой или уточненной функции конструкции с CAR, получаемой в результате. В дополнение к антигенсвязывающему домену конструкции с CAR могут иметь спейсерный домен,

шарнирный домен, домен сигнального пептида, трансмембранный домен и один или несколько костимулирующих доменов. Отбор одного компонента по сравнению с другим (т. е. отбор конкретного костимулирующего домена из одного рецептора по сравнению с костимулирующим доменом из другого рецептора) может влиять на клиническую эффективность и профили безопасности.

4. Антигенсвязывающий домен

[0058] Предусмотренные в данном документе антигенсвязывающие домены могут включать антитела или один или несколько их антигенсвязывающих фрагментов. Одна предусмотренная конструкция с CAR, нацеленная на GPC3, содержит одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий переменные области легкой и тяжелой цепей из одного или нескольких антител, специфических в отношении GPC3, которые либо непосредственно связаны друг с другом, либо связаны друг с другом посредством гибкого линкера (например, повтора GGGGS, имеющего 1, 2, 3 и больше повторов).

[0059] Раскрытый в данном документе антигенсвязывающий домен CAR может варьировать по своей аффинности связывания в отношении целевого белка. Взаимосвязь между аффинностью связывания и эффективностью может быть более тонкой в контексте CAR по сравнению с антителами, для которых обычно требуется более высокая аффинность. Например, доклинические исследования рецептора, представляющего собой тирозинкиназоподобный орфанный рецептор 1 (ROR1)-CAR, полученного из высокоаффинного scFv (с константой диссоциации 0,56 нМ), привели в результате к увеличению терапевтического индекса по сравнению с низкоаффинным вариантом. И наоборот, сообщалось о других примерах того, что конструирование scFv для снижения аффинности улучшает распознавание среди клеток с различной плотностью антигена. Это может быть применимо для улучшения терапевтической специфичности антигенов, дифференциально экспрессируемых в опухолевых тканях по сравнению с нормальными.

[0060] Для определения аффинности связывания антигенсвязывающего домена можно применять различные способы. В некоторых вариантах осуществления можно применять методики, которые исключают эффекты avidности. Эффекты avidности включают несколько антигенсвязывающих сайтов, одновременно взаимодействующих с несколькими эпитопами-мишенями, часто в мультимерных структурах. Таким образом, avidность функционально представляет собой накопленную силу множественных взаимодействий. Примером методологии, исключающей эффекты avidности, является любой подход, в котором один или оба взаимодействующих белка являются мономерными/моновалентными, поскольку множественные одновременные

взаимодействия невозможны, если один или оба партнера содержат только один участок взаимодействия.

5. Спейсерный домен

[0061] Конструкция с CAR по настоящему изобретению может содержать спейсерный домен для обеспечения конформационной свободы для облегчения связывания с целевым антигеном на клетке-мишени. Оптимальная длина спейсерного домена может зависеть от близости связывающего эпитопа к поверхности клетки-мишени. Например, для ближних эпитопов могут потребоваться более длинные спейсеры, а для дальних эпитопов могут потребоваться более короткие. Помимо стимулирования связывания CAR с целевым антигеном, достижение оптимального расстояния между клеткой с CAR и раковой клеткой может также помогать обеспечивать стерическую окклюзию более крупных ингибирующих молекул из иммунологического синапса, образованного между клеткой с CAR и раковой клеткой-мишенью. CAR может иметь длинный спейсер, промежуточный спейсер или более короткий спейсер. Длинные спейсеры могут включать домен CH2CH3 (приблизительно 220 аминокислот) иммуноглобулина G1 (IgG1) или IgG4 (либо нативного, либо с модификациями, обычными для терапевтических антител, такими как мутация S228P), тогда как область CH3 может применяться сама по себе для конструирования промежуточного спейсера (приблизительно 120 аминокислот). Более короткие спейсеры могут быть получены из сегментов (< 60 аминокислот) CD28, CD8 α , CD3 или CD4. Короткие спейсеры также могут быть получены из шарнирных областей молекул IgG. Эти шарнирные области могут быть получены из любого изотипа IgG и могут содержать или не содержать мутации, обычные для терапевтических антител, такие как упомянутая выше мутация S228P.

6. Шарнирный домен

[0062] CAR также может иметь шарнирный домен. Гибкий шарнирный домен представляет собой короткий пептидный фрагмент, который обеспечивает конформационную свободу для облегчения связывания с целевым антигеном на опухолевой клетке. Его можно применять отдельно или в сочетании со спейсерной последовательностью. Термины "шарнир" и "спейсер" часто применяются взаимозаменяемо, например, последовательности IgG4 можно считать как "шарнирными", так и "спейсерными" последовательностями (т. е. шарнирными/спейсерными последовательностями).

[0063] CAR может дополнительно включать последовательность, содержащую сигнальный пептид. Сигнальные пептиды побуждают клетку перемещать CAR к клеточной мембране. Примеры включают сигнальный полипептид тяжелой цепи IgG1,

сигнальные пептиды легкой цепи Ig каппа или лямбда, сигнальный пептид рецептора 2 гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSFR2 или CSFR2), сигнальный полипептид CD8 α или сигнальный пептид CD33.

7. *Трансмембранный домен*

[0064] CAR может дополнительно включать последовательность, содержащую трансмембранный домен. Трансмембранный домен может включать гидрофобную α -спираль, которая охватывает клеточную мембрану. Свойства трансмембранного домена не были изучены столь тщательно, как другие аспекты конструкций с CAR, однако они потенциально могут влиять на экспрессию CAR и связывание с эндогенными мембранными белками. Трансмембранные домены могут быть получены, например, из CD4, CD8 α или CD28.

8. *Костимулирующий домен*

[0065] CAR может дополнительно включать одну или несколько последовательностей, которые образуют костимулирующий домен. Костимулирующий домен представляет собой домен, способный усиливать или модулировать ответную реакцию иммунных эффекторных клеток. Костимулирующие домены могут включать последовательности, например, из одного или нескольких CD3-дзета (или CD3z), CD28, 4-1BB, OX-40, ICOS, CD27, GITR, CD2, IL-2R β и MyD88/CD40. Выбор костимулирующего домена влияет на фенотип и метаболическую сигнатуру клеток с CAR. Например, костимуляция CD28 дает высокоактивный, но недолговечный эффектор-подобный фенотип с высокими уровнями цитолитической способности, секреции интерлейкина-2 (IL-2) и гликолиза. Напротив, T-клетки, модифицированные с помощью CAR, несущих костимуляторные домены 4-1BB, имеют тенденцию к увеличению количества и сохранению *in vivo* дольше, имеют повышенный окислительный метаболизм, менее склонны к истощению и имеют повышенную способность создавать T-клетки центральной памяти.

9. *Клетки*

[0066] Виды терапии на основе клеток с CAR могут применяться с различными типами клеток, такими как лимфоциты. Конкретные типы клеток, которые можно применять, включают T-клетки, естественные клетки-киллеры (NK), естественные T-клетки-киллеры (NKT), инвариантные естественные T-клетки-киллеры (iNKT), альфа-бета-T-клетки, гамма-дельта-T-клетки, вирусоспецифические T-клетки (VST), цитотоксические T-лимфоциты (CTL) и регуляторные T-клетки (Treg). В одном варианте осуществления клетки с CAR для лечения субъекта являются аутологичными. В других вариантах осуществления клетки с CAR могут происходить от генетически сходного, но неидентичного донора (аллогенного).

10. *Получение клеток с CAR*

[0067] Конструкции с CAR по настоящему изобретению могут включать некоторую комбинацию модульных компонентов, описанных в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конструкция с CAR содержит антигенсвязывающий домен scFv для GPC3. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен scFv для GPC3-2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конструкция с CAR содержит сигнальный пептид CSFR2. В некоторых вариантах осуществления конструкция с CAR содержит шарнирный/спейсерный IgG4P, несущий мутацию S228P. В некоторых вариантах осуществления конструкция с CAR содержит трансмембранный CD28.

[0068] В конструкциях с CAR по настоящему изобретению могут использоваться различные костимулирующие домены. В некоторых вариантах осуществления конструкция с CAR содержит костимулирующий домен из внутриклеточного домена CD3z. В некоторых вариантах осуществления конструкция с CAR содержит костимулирующий домен CD28. В некоторых вариантах осуществления конструкция с CAR содержит костимулирующий домен 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления конструкция с CAR содержит костимулирующие домены из CD3z и CD28. В некоторых вариантах осуществления конструкция с CAR содержит костимулирующие домены из CD3z и 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления конструкция с CAR содержит костимулирующие домены из всех CD3z, CD28 и 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления конструкция с CAR содержит костимулирующие домены из ICOS, OX-40 и/или GITR.

11. *Оценка конструкции с CAR*

[0069] Конструкции по настоящему изобретению сравнивали и оценивали исходя из безопасности, а также персистенции и обеспечения центральной памяти. scFv с более низкой аффинностью (высокой скоростью диссоциации), GPC3, оценивался положительно из-за его повышенной безопасности. Костимулирующие домены 4-1BB и CD3z (оба в одной и той же конструкции) оценивались положительно на основании их вклада в улучшенную персистенцию и благоприятный фенотип *in vivo* (более центральная память).

12. *Варианты осуществления CAR*

[0070] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который содержит антигенсвязывающий домен, специфический в отношении поверхностного антигена на опухолевой клетке. В

некоторых вариантах осуществления антиген клеточной поверхности представляет собой белок, фосфорилированный белок, пептид-МНС, углевод или молекулу гликолипида.

[0071] Примеры предусмотренных антигенов клеточной поверхности включают CD10, CD16, CD19, CD20, CD22, CD123, CD30, CD34, CD47, CD56, CD80, CD86, CD117, CD133, CD138, CD171, CD37, CD38, CD5, CD7, CD79, 5T4, AFP, AXL, BCMA, B7H3, CDH3, CDH6, CLDN6, CLDN18, CLL-1, CMV, CS1, DLL3, DR5, FBP, GD2, GFRA1, GPA33, GPC3, IL-1-RAP, IL17RA, ITGB7, EBV, ERBB1/EGFR, ERBB2/Her-2, ERBB3, ERBB4, cMet, EGFR vIII, FAP, FOLR1, CEA, CEACAM6, EphA2, HSV-1, HSV-2, HTLV, HPV16-E6, HPV16-E7, IL13Ra2, цепь Igk, LGR5, LMP1, LeY, LRP8, MG7, MR1, NRCAM, PMEL, лиганд NKG2D, PRAME, PRLR, PVR, ROR1, ROR2, SSX2, STEAP1, STEAP2, TACI, TIM3, TRBC1, VEGFR-2, EPCAM1, VCAM1, VIPR2, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, мезотелин (MSLN), MUC1, MUC16, NY-ESO-1, WT1, PDL1, CAIX, CD70, PSMA и PSCA. Другие антигены клеточной поверхности также предусмотрены в данном документе.

[0072] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает выделенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), который содержит антигенсвязывающий домен, специфический в отношении глипикана 3 (GPC3). Антигенсвязывающий домен характеризуется равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей приблизительно 100 наномоль/л (нМ) или меньше, и конструкция с CAR не индуцирует выработку цитокинов в клетках GPC3. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Антигенсвязывающий домен может представлять собой Fab или одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой scFv, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

[0073] В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно включает трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен. Трансмембранный домен может представлять собой трансмембранный домен CD28. Костимулирующий домен может представлять собой один или несколько из костимулирующих доменов CD3-дзета (или CD3z), CD28, 4-1BB, OX-40, ICOS, CD27, GITR, CD2, IL-2R β и MyD88/CD40. В одном конкретном варианте осуществления костимулирующий домен представляет собой один или несколько из костимулирующих доменов CD28, 4-1BB и CD3-дзета. Сигнальный домен может представлять собой последовательность, кодирующую сигнальный пептид CSFR2.

[0074] В некоторых вариантах осуществления выделенная последовательность нуклеиновой кислоты может включать шарнирный/спейсерный домен.

Шарнирный/спейсерный домен может представлять собой шарнирный/спейсерный IgG4P.

[0075] В некоторых конкретных вариантах осуществления выделенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный антигенный рецептор (CAR), может иметь последовательность под SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 26.

[0076] В других вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает химерный антигенный рецептор (CAR) для GPC3, включающий антигенсвязывающий домен. Антигенсвязывающий домен может представлять собой антитело, Fab или scFv, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL). В некоторых вариантах осуществления VH может иметь CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления VL может иметь CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 44, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 45.

[0077] В некоторых вариантах осуществления VH может представлять собой аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 29, и VL может представлять собой аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно может содержать трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен.

[0078] В некоторых конкретных вариантах осуществления CAR для GPC3 может иметь аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 25.

[0079] В других вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR). Последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14,

SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

[0080] В других вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, содержащую вектор, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

[0081] В других вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит антигенсвязывающий домен, специфический в отношении глипикана 3 (GPC3), где антигенсвязывающий домен характеризуется равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей приблизительно 100 наномоль (нМ) или меньше, и при этом конструкция с CAR не индуцирует выработку цитокинов в клетках GPC3. Например, последовательность нуклеиновой кислоты может представлять собой SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.

[0082] В других вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор (CAR) для GPC3 на своей внеклеточной поверхности. CAR может содержать антигенсвязывающий домен, который может представлять собой антитело, Fab или scFv, каждый из которых содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL). VH может включать CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39. VL может включать CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 44, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 45.

[0083] В некоторых вариантах осуществления VH может иметь аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 29. В некоторых вариантах осуществления VL может иметь аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 30. CAR может дополнительно включать трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен. Клетка экспрессирует CAR, имеющий

аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 25.

[0084] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает Т-клетку, естественную клетку-киллер (NK), цитотоксический Т-лимфоцит (CTL) и/или регуляторную Т-клетку, которые экспрессируют CAR на своей внеклеточной поверхности, и CAR может иметь аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 25. Такие клетки могут проявлять противоопухолевый иммунитет при контакте с опухолевой клеткой, экспрессирующей GPC3.

13. *Лечение видов рака с помощью CAR*

[0085] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает клетки с CAR для лечения рака. Композиции (например, антитела, конструкции с CAR и клетки с CAR) и способы их применения, описанные в данном документе, особенно применимы для подавления роста или распространения неопластических клеток. В некоторых аспектах они особенно применимы для подавления роста неопластических клеток, где GPC3 играет роль.

[0086] Новообразования, поддающиеся лечению с помощью композиций по настоящему изобретению, включают солидные опухоли, например, опухоли печени, легкого или яичника. Тем не менее, виды рака, перечисленные в данном документе, не предназначены для ограничения. Например, типы рака, которые предусмотрены для лечения в данном документе, включают, например, NSCLC, солидные злокачественные образования на поздней стадии, новообразования желчевыводящих путей, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, новообразования пищевода, плоскоклеточную карциному пищевода, обширную стадию мелкоклеточного рака легкого, аденокарциному желудка, рак желудка, рак желудочно-пищеводного перехода, рак головы и шеи, плоскоклеточную карциному головы и шеи, гепатоцеллюлярную карциному, лимфому Ходжкина, рак легкого, меланому, мезотелиому, метастатическую светлоклеточную карциному почки, метастатическую меланому, метастатическую некожную меланому, множественную миелому, новообразования носоглотки, неходжкинскую лимфому, рак яичника, рак маточной трубы, перитонеальные новообразования, мезотелиому плевры, новообразования предстательной железы, рецидивирующий или метастатический PD-L1, положительный или отрицательный SCCHN, рецидивирующий плоскоклеточный рак легкого, почечно-

клеточный рак, почечно-клеточную карциному, SCCHN, гипофарингеальную плоскоклеточную карциному, плоскоклеточную карциному гортани, мелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточную карциному головы и шеи, плоскоклеточную карциному легкого, TNBC, переходно-клеточную карциному, неоперабельную или метастатическую меланому, уротелиальный рак и уротелиальную карциному.

[0087] В одном варианте осуществления предусмотренные для лечения виды рака включают любые виды рака, которые экспрессируют GPC3 на клеточных поверхностях раковых клеток. В одном конкретном примере виды рака, предусмотренные для лечения в данном документе, включают гепатоцеллюлярную карциному, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника и плоскоклеточную карциному легкого.

14. Армирование

[0088] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает "армированные" клетки, такие как Т-клетки с CAR, которые имеют одну или несколько генетических модификаций, которые усиливают или оптимизируют функцию клетки посредством защиты клетки от неблагоприятного воздействия окружающей среды, такого как иммуносупрессивный цитокин или иммуносупрессивное ТМЕ. Генетические модификации включают без ограничения усиление секреции цитокинов, экспрессию лигандов, которые взаимодействуют с иммунными клетками, такими как Т-клетка, макрофаги и регуляторные Т-клетки, или изменение функциональных характеристик. Специалисту в данной области будет понятно, что армирование клетки, такой как Т-клетка, может обеспечивать множество дополнительных преимуществ, не описанных в данном документе, которые обеспечивают возможность выживания Т-клетки в иммуносупрессивном ТМЕ.

[0089] В некоторых вариантах осуществления клетка может включать химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий опухолеспецифический антигенсвязывающий домен, где антигенсвязывающий домен предусматривает антитело, Fab или scFv, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL); и армирующую молекулу, представляющую собой доминантно-негативный индуцируемый гипоксией фактор 1 α (HIF-1 α) (HIF 1 α DN).

[0090] В некоторых вариантах осуществления армированная клетка может включать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит антигенсвязывающий домен, специфический в отношении глипикана 3 (GPC3), где антигенсвязывающий домен характеризуется равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей приблизительно 100 наномоль (нМ) или

меньше, где конструкция с CAR не индуцирует выработку цитокинов в клетках GPC3, и где клетка экспрессирует армирующую молекулу HIF1 α DN.

[0091] В некоторых вариантах осуществления армированная клетка может включать химерный антигенный рецептор (CAR) для GPC3, содержащий антигенсвязывающий домен, где антигенсвязывающий домен предусматривает антитело, Fab или scFv, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), где VH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, и где VL содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 44, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 45; армирующую молекулу HIF1 α DN.

15. Способы лечения

[0092] CAR-модифицированные клетки по настоящему изобретению, такие как T-клетки с CAR, можно вводить отдельно или в виде фармацевтической композиции с разбавителем и/или другими компонентами, ассоциированными с цитокинами или клеточными популяциями. Вкратце, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут включать, например, T-клетки с CAR, описанные в данном документе, с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный солевой раствор, забуференный солевой раствор и т. п.; сульфаты; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки, полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как EDTA или глутатион; адьюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть адаптированы для лечения (или профилактики).

[0093] CAR-модифицированные клетки также можно вводить в сочетании с одним или несколькими дополнительными видами терапии. В одном варианте осуществления дополнительные виды терапии могут включать применение антител к цитокинам. Например, одно или несколько антител к TNF α можно применять для ослабления токсичности и повышения противоопухолевой активности при более высоких дозах T-клеток с CAR, что может быть связано с CRS-подобными симптомами и потерей веса.

[0094] Количество клеток с CAR, вводимых на дозу, количество доз и частота введения доз будет зависеть от различных параметров, таких как возраст, вес пациента, результаты клинического обследования, тип опухоли, опухолевая нагрузка и/или другие факторы, в том числе мнение лечащего врача. Предусмотрен любой приемлемый путь введения, такой как без ограничения внутривенный (например, внутривенная инфузия), парентеральный или подкожный путь введения.

[0095] В конкретном варианте осуществления предусмотренная схема лечения может включать один или несколько биологических компонентов, таких как Т-клетка с CAR и противораковое антитело и/или химиотерапевтический компонент. Например, предусмотренная схема лечения может дополнительно включать ингибитор иммунных контрольных точек (ICI), например, такой, который нацелен на ось PD-1/PD-L1 (PDX), и другие иммуноонкологические (ИО) виды лечения, такие как применение агонистов иммунной системы.

[0096] Предусмотренные антитела включают антитело к PD-L1, такое как дурвалумаб (MEDI4736), авелумаб, атезолизумаб, KNO35, антитело к PD-1, такое как ниволумаб, пембролизумаб, REGN2810, SHR1210, IBI308, PDR001, антитело к PD-1, BGB-A317, BCD-100 и JS001 и антитело к CTLA4, такое как тремелиумаб или ипилиумаб. В данном документе также предусмотрены дополнительные антитела. В данном документе также предусмотрены любые терапевтически эффективные части антител.

[0097] Информацию, касающуюся дурвалумаба (или его фрагментов) для применения в способах, предусмотренных в данном документе, можно найти в патентах США №№ 8779108, 9493565 и 10400039, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В конкретном аспекте дурвалумаб или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способах, предусмотренных в данном документе, содержат последовательности CDR варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи антитела 2.14H9OPT, как описано в вышеупомянутых патентах США.

[0098] Информацию, касающуюся тремелиумаба (или его антигенсвязывающих фрагментов) для применения в способах, предусмотренных в данном документе, можно найти в патенте США № 6682736 (в котором тремелиумаб обозначен как 11.2.1), раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0099] Дополнительные терапевтические средства (химиотерапевтические или биологические средства), предусмотренные в данном документе, включают без ограничения цисплатин/гемцитабин или метотрексат, винбластин, ADRIAMYCIN™

(доксорубин), цисплатин (MVAC), схему на основе карбоплатина или таксан или гемцитабин в виде отдельного средства, темозоломид или дакарбазин, винфлунин, доцетаксел, паклитаксел, наб-паклитаксел, вемурафениб, эрлотиниб, афатиниб, цетуксимаб, бевацизумаб, эрлотиниб, gefитиниб и/или пеметрексед. Дополнительные примеры включают лекарственные средства, нацеленные на системы восстановления повреждений ДНК, такие как ингибиторы поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 (PARP1), и терапевтические средства, ингибирующие активность протеинкиназы WEE1, активность протеинкиназы ATR, активность протеинкиназы ATM, активность протеинкиназы Auroга В и активность ДНК-РК.

[00100] Любые терапевтические композиции или способы, предусмотренные в данном документе, можно комбинировать с одной или несколькими из любых других терапевтических композиций и способов, предусмотренных в данном документе.

[00101] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества клетки, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR) для GPC3, содержащий антигенсвязывающий домен, и армирующую молекулу, которая противодействует иммуносупрессии клетки в микроокружении опухоли при ее экспрессии на поверхности клетки. В другом аспекте в настоящем изобретении описан антигенсвязывающий домен, который может представлять собой антитело, Fab или scFv, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL). VH может включать CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39. VL может включать CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 44, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно подавляет рост опухоли, индуцирует регрессию опухоли и/или увеличивает продолжительность выживания субъекта.

[00102] В некоторых вариантах осуществления армирующая молекула представляет собой HIF1 α DN.

[00103] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аутологичную клетку. Например, аутологичная клетка может быть выбрана из группы,

состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (НК), цитотоксического Т-лимфоцита (CTL) и регуляторной Т-клетки.

[00104] В некоторых вариантах осуществления рак, подлежащий лечению указанным способом, представляет собой солидную опухоль. Например, рак может представлять собой гепатоцеллюлярную карциному, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника и/или плоскоклеточную карциному легкого. В конкретном варианте осуществления рак представляет собой гепатоцеллюлярную карциному.

[00105] Следует понимать, что конкретные аспекты описания, описанные в данном документе, не ограничены конкретными представленными вариантами осуществления и могут варьироваться. Также следует понимать, что применяемая в данном документе терминология предназначена только для цели описания конкретных аспектов, и если она специально не определена в данном документе, то не предназначена для ограничения. Кроме того, раскрытые в данном документе конкретные варианты осуществления могут быть объединены с другими раскрытыми в данном документе вариантами осуществления, что признавалось бы специалистом в данной области техники, без ограничения.

ПРИМЕРЫ

[00106] Следующие примеры являются иллюстративными для конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения и различных вариантов их применения. Они изложены исключительно в пояснительных целях и не должны истолковываться как каким-либо образом ограничивающие объем настоящего изобретения. Описание терминов представлено в таблице 1.

Таблица 1. Описание терминов

Термин	Описание
GPC3-1	scFv антитела к GPC3 (более низкая аффинность)
GPC3-2	scFv антитела к GPC3 (более высокая аффинность)
GPC3-4	scFv антитела к GPC3 из предшествующего уровня техники
GPC3-3	scFv антитела к GPC3 из предшествующего уровня техники
BZ	Внутриклеточный домен CAR с двумя костимулирующими доменами 4-1BB и CD3-дзета
TZ	Внутриклеточный домен CAR с укороченным сигнальным доменом CD3-дзета (действующим как сигнальный некомпетентный контроль)
28Z	Внутриклеточный домен CAR с двумя костимулирующими доменами CD28 и CD3-дзета

28BZ	Внутриклеточный домен CAR с тремя костимулирующими доменами CD28, 4-1BB и CD3-дзета
HIF1 α DN	Молекула доминантно-негативного HIF-1 α
BZ GPC3-1	CAR с scFv для GPC3, сигнальным пептидом CSFR2, шарнирной областью IgG4P и костимулирующими доменами 4-1BB и CD3z
BZ GPC3-2	CAR с scFv для GPC3-2, сигнальным пептидом CSFR2, шарнирной областью IgG4P и костимулирующими доменами 4-1BB и CD3z
aCART-H	T-клетка с CAR с scFv для GPC3, сигнальным пептидом CSFR2, шарнирной областью IgG4P и костимулирующими доменами 4-1BB и CD3z и армированная с помощью HIF1 α DN
CSFR2	Сигнальный пептид, применяемый во всех конструкциях с CAR
IgG4P	Шарнирная последовательность, применяемая во всех конструкциях с CAR
Нер3В	Модель гепатоцеллюлярной карциномы
HUH7	Модель резистентной гепатоцеллюлярной карциномы (HCC)

Пример 1. Армирование Т-клетки с CAR для GPC3 с помощью HIF1 α DN обеспечивает получение менее дифференцированных клеток

Краткое описание

[00107] В настоящем примере изучали армирование Т-клеток с CAR BZ GPC3 с помощью молекулы доминантно-негативного HIF-1 α (HIF1 α DN) в качестве потенциального способа защиты Т-клеток с CAR от ассоциированной с гипоксией иммуносупрессии для улучшения эффекторной функции и контроля опухоли для Т-клеток с CAR.

Способы

[00108] **Фиг. 1.** HIF1 α DN. Молекулы доминантно-негативного HIF-1 α получали посредством усечения белка HIF1 α дикого типа как на N-, так и на C-конце таким образом, чтобы в белке отсутствовал ДНК-связывающий домен, домен кислородозависимого разрушения и трансактивирующие домены. (Chen J, Zhao S, Nakada K, et al. Dominant-negative hypoxia-inducible factor-1 alpha reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism. Am J Pathol. 2003;162(4):1283-1291. doi:10.1016/s0002-9440(10)63924-7). Усеченная последовательность HIF1 α DN (SEQ ID NO: 49) соответствует остаткам 30-389 последовательности HIF1 α дикого типа. Армированные Т-клетки с CAR: Т-клетки с CAR

BZ GPC3 армировали с помощью HIF1 α DN посредством экспрессирования HIF1 α DN в виде C-концевого слияния с CAR BZ GPC3, при этом пептид T2A разделяет CAR BZ GPC3 и HIF1 α DN. В конструкции CAR-T GPC3BZ, армированной с помощью HIF1 α DN, сигнальный пептид CD33 применяли для управления секрецией CAR, и CAR модифицировали с помощью N-концевой эпитопной метки HA для облегчения выявления экспрессии CAR на поверхности клетки.

[00109] **Фиг. 2.** Т-клетки оставляли нетрансдуцированными (UT) или трансдуцировали с помощью конструкций GPC3-1 или GPC3-1 HIF1 α DN и размножали в течение 11 дней в условиях с нормальным содержанием кислорода (20% O₂) или в условиях гипоксии (1% O₂). **Фиг. 2А и 2С.** mRNA экстрагировали из замороженных пеллет с помощью RNeasy Mini Kit (Qiagen) согласно инструкции производителя и подвергали обратной транскрипции в cDNA. Эндогенный или доминантно-негативный HIF1 α амплифицировали посредством ПЦР в режиме реального времени и выражали в виде кратности индукции, рассчитанной посредством сравнительного метода C(T) (Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008; 3(6):1101–1108). **Фиг. 2В.** Экспрессию эндогенного HIF1 α выявляли посредством вестерн-блоттинга. Клетки размножали, как описано на фигуре 2А и 2С, и подвергали лизису в буфере RIPA, содержащем ингибиторы протеаз и фосфатаз.

[00110] **Фиг. 3.** Частоту встречаемости эффекторных Т-клеток памяти CD62L^{low}CD45RO^{hi} анализировали посредством проточной цитометрии на поверхности UT, Т-клеток с CAR GPC3-1 или GPC3-1 HIF1 α DN, размножавшихся в условиях с нормальным содержанием кислорода (20% O₂) или в условиях гипоксии (1% O₂), через 7 дней после трансдукции.

[00111] **Фиг. 4.** UT, Т-клетки с CAR GPC3-1 или GPC3-1 HIF1 α DN размножали в условиях с нормальным содержанием кислорода в течение 11 дней. mRNA клеток экстрагировали из замороженных клеточных пеллет с помощью RNeasy Mini Kit (Qiagen). Анализ экспрессии генов выполняли с помощью Nanostring CAR-T Characterization Panel согласно инструкции производителя. На графике изображена экспрессия генов в виде Log₂ кратности изменения по сравнению с UT.

[00112] **Фиг. 5.** Модифицированные с помощью GPC3-CAR Т-клеточные продукты повторно суспендировали в бессывороточной безбуферной среде DMEM с добавлением L-глутамина (200 мМ) и NaCl (143 мМ) для гликолизного стресс-теста или D-глюкозы (25 мМ) и пирувата натрия (1 мМ) для митохондриального стресс-теста. Затем клетки высевали в клеточные планшеты Seahorse (1 × 10⁶ клеток на лунку), покрытые с помощью Cell-Tak (Corning) для облегчения прикрепления Т-клеток. Гликолизный стресс-тест

выполняли посредством измерения ECAR (мрН/мин) в равновесном состоянии и после последовательной инъекции гранул с антителами к CD3/CD28 (при соотношении клеток и гранул 1:1) с последующим добавлением D-глюкозы (10 мМ). Митохондриальный стресс-тест выполняли посредством измерения OCR (пмоль/мин) в равновесном состоянии и после последовательной инъекции гранул с антителами к CD3/CD28 (при соотношении клеток и гранул 1:1) с последующим добавлением олигомицина (0,5 мкМ). В экспериментах с системой Seahorse использовали следующие условия анализа: смешивание 2 мин; ожидание 2 мин и измерение 3 мин.

Результаты

[00113] Экспрессию доминантно-негативного HIF1 α подтверждали посредством ПЦР в режиме реального времени, в то время как экспрессию эндогенного HIF1 α изучали посредством вестерн-блоттинга. Доминантно-негативный HIF1 α был сверхэкспрессирован по сравнению с эндогенным HIF1 α . Более того, экспрессия DN не изменяла индуцируемую гипоксией стабилизацию эндогенного HIF1 α , выявляемую посредством вестерн-блоттинга (**фиг. 2**).

[00114] Приспособленность и персистенция Т-клеток в микроокружении опухоли связаны со статусом их дифференцировки (Kishton, R. J., Sukumar, M., & Restifo, N. P. (2017). Metabolic Regulation of T Cell Longevity and Function in Tumor Immunotherapy. *Cell Metab*, 26(1), 94-109.). Для изучения эффекта экспрессии HIF1 α DN в отношении дифференцировки Т-клеток авторы анализировали частоту встречаемости эффекторных Т-клеток памяти CD62L^{low}CD45RO^{hi} среди CAR-T GPC3-1 или GPC3-1 HIF1 α DN через 6 дней размножения в условиях с нормальным содержанием кислорода (20% O₂) или в условиях гипоксии (1% O₂). У клеток GPC3-1 HIF1 α DN поддерживался менее дифференцированный фенотип, о чем позволяло судить снижение частоты встречаемости T_{EM} как в условиях гипоксии, так и в условиях с нормальным содержанием кислорода по сравнению с неармированными CAR-T (см. **фиг. 3**). Следует отметить, что клетки, размножавшиеся в условиях гипоксии, были более дифференцированными, чем клетки, размножавшиеся в условиях с нормальным содержанием кислорода, тем не менее экспрессия HIF1 α DN даже в данных условиях обеспечивала менее дифференцированный фенотип, напоминающий таковой для Т-клеток UT.

[00115] HIF1 α является не только главным регулятором ответа на гипоксию, но также ключевым промежуточным звеном активации Т-клеток в условиях с нормальным содержанием кислорода, и он связан с регуляцией множества путей передачи сигнала и обмена веществ. Для получения полного представления о генетических изменениях, индуцируемых экспрессией HIF1 α DN, авторы выполняли анализ Nanostring с

использованием очищенных CAR-T GPC3-1 или GPC3-1 HIF1 α DN, размножавшихся в условиях с нормальным содержанием кислорода (20% O₂). Т-клетки с CAR HIF1 α DN характеризуются повышенной экспрессией генов, ассоциированных со стволовостью, и сниженной экспрессией генов, ассоциированных с эффекторной функцией, по сравнению с неармированными Т-клетками с CAR. Таким образом, данный результат подтверждает, что экспрессия HIF1 α DN ассоциирована с менее активированным и дифференцированным фенотипом (см. **фигуру 4**).

[00116] У покоящихся Т-клеток используется энергосберегающий окислительный метаболизм, но происходит переключение на метаболизм с высоким уровнем гликолиза при стимуляции роста или после встречи с патогеном (Michalek, R. D., & Rathmell, J. C. (2010). The metabolic life and times of a T-cell. *Immunol Rev*, 236, 190-202.). Для изучения эффекта экспрессии HIF1 α DN в отношении метаболического статуса Т-клеток с CAR авторы оценивали уровень гликолиза посредством анализа скорости внеклеточной ацидификации (ECAR) и митохондриального окислительного фосфорилирования на основе скорости потребления кислорода (OCR) посредством анализа в режиме реального времени с использованием живых клеток (Seahorse XF) в стандартных условиях и после воздействия антигена. В стандартных условиях Т-клетки с CAR HIF1 α DN демонстрировали более низкую OCR и более высокую ECAR, что указывало на то, что они характеризовались более высоким уровнем гликолиза. Напротив, после воздействия антигена OCR клеток HIF1 α DN увеличилась на 60% по сравнению с лишь 20% для неармированных клеток. И наоборот, повышение ECAR после активации для неармированных клеток составляло 340%, в то время как для армированных CAR-T оно составляло 100%. Таким образом, экспрессия HIF1 α DN перестраивает клеточный метаболизм и наделяет CAR-T способностью отвечать на повышение потребности в энергии при стрессе (см. **фигуру 5**).

Вывод

[00117] Характеристики Т-клеток, которые применяются для формирования противоракового иммунного ответа, являются критическим фактором в определении клинического исхода. В частности, лечение рака с применением Т-клеток с характеристиками, представляющими собой увеличение продолжительности жизни клеток, ассоциировано с улучшением противоопухолевого ответа (Kishton, R. J., Sukumar, M., & Restifo, N. P. (2017). Metabolic Regulation of T Cell Longevity and Function in Tumor Immunotherapy. *Cell Metab*, 26(1), 94-109). Гипоксия и путь передачи сигнала HIF влияют на судьбу и функцию иммунных клеток, включая повышение экспрессии генов гликолиза. В результате гипоксия направляет клетки в сторону более дифференцированного статуса,

который ассоциирован с короткой персистенцией в опухоли и неблагоприятным исходом. (Kishton, R. J., Sukumar, M., & Restifo, N. P. (2017). Metabolic Regulation of T Cell Longevity and Function in Tumor Immunotherapy. *Cell Metab*, 26(1), 94-109.; Krzywinska, E., & Stockmann, C. (2018). Hypoxia, Metabolism and Immune Cell Function. *Biomedicines*, 6(2)). Данные, полученные авторами, демонстрируют, что у CAR-T, экспрессирующих HIF1 α DN, поддерживается наивный и менее активированный фенотип по сравнению с неармированными T-клетками с CAR, как показано посредством анализа поверхностных маркеров, экспрессии генов и митохондриальной функции. Данные наблюдения указывают на то, что T-клетки с CAR HIF1 α DN являются хорошо адаптированными, чтобы переносить иммуносупрессивные эффекты, ассоциированные с жестким гипоксическим TME солидных опухолей.

Пример 2 Функциональные ответы T-клеток с CAR HIF1 α DN при воздействии мишени

Краткое описание

[00118] В настоящем примере определяли дегрануляцию, цитотоксичность, выработку эффекторных цитокинов, уничтожение *in vitro* и пролиферативные ответы для T-клеток с CAR HIF1 α DN в связи с воздействием целевого антигена GPC3.

Способы

[00119] **Фиг. 6.** Дегрануляция T-клеток с CAR в ответ на GPC3. Указанные T-клетки с CAR культивировали совместно с Her3B или A375 в течение 6 часов в присутствии Golgi Stop и антитела к маркеру дегрануляции CD107a, непосредственно меченного флуорохромом. Взаимодействие с мишенью индуцирует дегрануляцию T-клеток с CAR и последующее связывание флуоресцентно меченного антитела к CD107, присутствующего в культуральной среде. Накопление CD107, выявляемое с помощью проточной цитометрии, является прямо пропорциональным степени дегрануляции и свидетельствует о лизисе клетки-мишени. Через 6 часов после инкубации клетки анализировали посредством проточной цитометрии.

[00120] **Фиг. 7.** Выработка эффекторных цитокинов T-клетками с CAR HIF1 α DN в ответ на GPC3. 5×10^4 T-клеток с CAR культивировали совместно с клетками-мишенями при соотношении 1:1 в RPMI с 10% FCS. Через 24 часа собирали надосадочную жидкость и анализировали цитокины с помощью Meso Scale Discovery 4-plex Kit.

[00121] **Фиг. 8.** T-клетки с CAR-T GPC3-1 или GPC3-1 HIF1 α DN подвергали воздействию клеток-мишеней, экспрессирующих GPC3, при гипоксии или в условиях с нормальным содержанием кислорода. Внутриклеточное окрашивание цитокинов для GPC3-CAR-модифицированных и GPC3-CAR-модифицированных T-клеток с

доминантно-негативным HIF1 α выполняли после 6-часового культивирования в присутствии PMA и иономицина. Затем клетки окрашивали с помощью фиксируемого синего красителя Live/Dead и антител к CD3 с последующей фиксацией и пермеабиллизацией с помощью BD Fixation and Permeabilization Buffer (eBioscience) согласно протоколу производителя. Затем клетки последовательно инкубировали с антителами к IFN- γ , IL-2 и TNF- α (eBioscience) в течение 30 минут при 4°C. Данные анализа посредством проточной цитометрии корректировали и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (TreeStar). Применяемые антитела: антитела к CD3 (SK7), антитела к IL-2 (MQ1-17H12), антитела к IFN- γ (4S.B3), антитела к TNF α (MAb11), приобретенные у eBioscience.

[00122] **Фиг. 9.** Уничтожение клеток, экспрессирующих мишень, Т-клетками с CAR. Исследования цитотоксичности выполняли с помощью технологии осуществления контроля клеточного сопротивления (xCELLigence). Высевали 3×10^4 клеток-мишеней и через 24 часа добавляли Т-клетки с CAR, культивированные в условиях гипоксии и в условиях с нормальным содержанием кислорода, при указанном соотношении эффектор:мишень (Е:Т). Процентные показатели цитолиза и КТ80 рассчитывали с помощью программного обеспечения RTCA Pro. Изображения получали с помощью RTCA eSight (устройство xCELLigence с возможностью визуализации клеток в режиме реального времени). Применяемые клетки-мишени: Hep3В: GPC3^{high}, HUH7: GPC3^{med}, PLC-PRF-15: GPC3^{low}, SNU-182 GPC3⁺.

[00123] **Фиг. 10.** Время уничтожения 80 (КТ) рассчитывали с помощью программного обеспечения RDCА Pro на основе данных исследований, выполненных, как показано на фиг. 9, при указанном соотношении Е:Т в условиях с нормальным содержанием кислорода или в условиях гипоксии.

[00124] **Фиг. 11.** Полученные посредством светлопольной микроскопии изображения наблюдения в режиме реального времени CAR-Т-опосредованной цитотоксичности во время совместного культивирования с GPC3+ клетками опухоли. Изображения получали через 3 часа совместного культивирования. Признаки апоптоза уже являются четко выраженными в присутствии армированных Т-клеток с CAR. На верхних изображениях представлены Т-клетки при отсутствии клеток-мишеней.

[00125] **Фиг. 12.** Процентный показатель цитолиза, рассчитанный с помощью программного обеспечения RDCА Pro на основе данных исследований цитотоксичности, выполненных, как показано на фиг. 9, с использованием указанных клеток-мишеней (HUH7 и PLC/PRF/5).

[00126] **Фиг. 13.** CAR-T метили с помощью CFSE согласно инструкции производителя и инкубировали с указанной линией клеток. Через 3 дня разбавление CFSE анализировали посредством проточной цитометрии.

[00127] **Фиг. 14.** Клетки HUH7 имплантировали в бок мышей NSG (10 мышей/группа). Когда опухоли достигали среднего объема 150 мм^3 , мышам вводили 7 миллионов указанных CAR-T. На графиках представлен объем опухоли, измеренный в указанное время.

[00128] **Фиг. 15.** Клетки Hep3B имплантировали в бок мышей NSG (9 мышей/группа). Когда опухоли достигали среднего объема 150 мм^3 , мышам вводили 7 миллионов указанных CAR-T. На графиках представлен объем опухоли, измеренный в указанное время.

Результаты

[00129] Т-клетки с CAR HIF1 α DN характеризуются менее дифференцированным и активированным фенотипом, следовательно, авторы хотели проверить, обладали ли они способностью формировать эффективный антигенспецифический иммунный ответ. Т-клетки с CAR для GPC3-1, размножившиеся в условиях с нормальным содержанием кислорода, дегранулировали сразу после воздействия GPC3⁺ Hep3B, и степень дегрануляции была незначительно снижена, если клетки размножали в условиях гипоксии. Т-клетки с CAR HIF1 α DN, размножившиеся в условиях с нормальным содержанием кислорода, были способны дегранулировать подобно неармированным CAR-T; однако снижения дегрануляции не наблюдалось, если они размножались в условиях гипоксии. Дегрануляция являлась антигенспецифической, как показано посредством отсутствия CD107⁺ клеток после инкубации с SNU-182. Данный результат показал, что Т-клетки с CAR HIF1 α DN могут эффективно и специфично дегранулировать в ответ на встречу с антигеном, даже если они размножались в условиях гипоксии (см. **фигуру 6**).

[00130] Секреция цитокинов является отличительным признаком активации Т-клеток; таким образом, авторы хотели изучить влияние экспрессии HIF1 α DN на антигензависимую выработку эффекторных цитокинов. Т-клетки с CAR HIF1 α DN вырабатывают меньше IFN γ и IL-2, но сходные количества TNF- α при воздействии GPC3 по сравнению с неармированными Т-клетками с CAR в условиях с нормальным содержанием кислорода и в условиях гипоксии. Эти данные демонстрируют, что даже если Т-клетки с CAR HIF1 α DN характеризуются менее дифференцированным фенотипом, они могут секретировать существенное количество эффекторных цитокинов антигензависимым путем. См. **фигуру 7**.

[00131] Т-клетки, которые вырабатывают несколько цитокинов, так называемые "полифункциональные" Т-клетки, обеспечивают более эффективный иммунный ответ, чем клетки, которые вырабатывают только один цитокин. Частота встречаемости неармированных и армированных CD4 и CD8 Т-клеток, вырабатывающих три основных эффекторных цитокина $IFN-\gamma^+/IL-2^+/TNF\alpha^+$ при стимуляции антигеном, была сходной среди неармированных и армированных клеток, если клетки подвергались воздействию антигена в условиях с нормальным содержанием кислорода. Стимуляция в условиях гипоксии значительно снижала частоту встречаемости неармированных полифункциональных Т-клеток. Напротив, гипоксия оказывала лишь незначительное влияние на частоту встречаемости полифункциональных CAR-Т HIF1 α DN (см. **фигуру 8**), что позволяло предположить, что экспрессия HIF1 α DN защищает CAR-Т от управляемой гипоксией иммуносупрессии.

[00132] Уничтожение клеток-мишеней является наиболее важным признаком Т-клеток с CAR; таким образом, авторы анализировали способность Т-клеток с CAR для GPC3 HIF1 α DN уничтожать клетки-мишени, экспрессирующие различные уровни GPC3. Экспрессия HIF1 α DN ассоциирована с менее дифференцированным фенотипом; таким образом, авторами была предложена гипотеза, что клетки с HIF1 α DN будут персистировать более длительно, чем их неармированные аналоги, однако также будут уничтожать клетки-мишени более медленно. Неожиданно, Т-клетки с CAR HIF1 α DN либо в условиях с нормальным содержанием кислорода, либо в условиях гипоксии уничтожали клетки Нер3В быстрее, чем неармированные Т-клетки с CAR. Клетки-мишени Нер3В демонстрировали явную и выраженную преапоптотическую картину спустя лишь 3 часа после воздействия Т-клеток с CAR HIF1 α DN (см. **фигуры 9-11**). Способность Т-клеток с CAR для GPC3 HIF1 α DN уничтожать другие линии GPC3⁺ клеток с более низким уровнем экспрессии GPC3, HUH7 и PLC-PRF15, была сходной по сравнению с неармированным аналогом, как показано на **фигуре 12**. Данные результаты демонстрируют, что Т-клетка с CAR для GPC3 HIF1 α DN уничтожает клетки, экспрессирующие высокий уровень GPC3, с более высокой скоростью, чем неармированная Т-клетка с CAR.

[00133] HIF1 α стабилизируется в Т-клетках при распознавании антигена и он является важным медиатором активации Т-клеток, таким образом, у авторов возник вопрос, приводит ли экспрессия DN к изменению пролиферации Т-клеток. Меченные с помощью CFSE UT, Т-клетки с CAR для GPC3 и Т-клетки с CAR для GPC3 HIF1 α DN оставляли без стимулирования или культивировали совместно с Нер3В или HUH7. CFSE постепенно разбавляется в дочерних клетках после деления каждой клетки, при этом разбавление является пропорциональным степени пролиферации. Анализ посредством

проточной цитометрии через 3 дня показал, что Т-клетки с CAR HIF1 α DN пролиферировали подобно немодифицированным Т-клеткам с CAR в ответ на клетки-мишени, экспрессирующие высокие и низкие уровни GPC3. Экспрессия HIF1 α DN возвращает неспецифическую пролиферацию немодифицированных Т-клеток с CAR при отсутствии антигена наряду с их менее дифференцированным фенотипом. Данный результат показывает, что блокирование пути HIF1 α с помощью эктопической экспрессии доминантно-негативной молекулы не нарушает индуцируемую антигеном пролиферацию Т-клеток с CAR (см. **фигуру 13**).

Вывод

[00134] Т-клетки с CAR HIF1 α DN были способны уничтожать GPC3⁺ раковые клетки при одновременном поддержании менее активного и более наивного фенотипа. Более того, экспрессия HIF1 α DN частично защищала Т-клетки с CAR от индуцируемой гипоксией утраты полифункциональности. Неожиданно, Т-клетки с CAR HIF1 α DN демонстрировали повышенную способность уничтожать определенные клетки-мишени по сравнению с неармированными Т-клетками с CAR *in vitro* как в условиях с нормальным содержанием кислорода, так и в условиях гипоксии. Данные неожиданные результаты указывают на то, что армирование Т-клеток с CAR с помощью HIF1 α DN может обеспечивать повышение цитолитической эффективности для Т-клеток с CAR способом, не связанным с обеспечением устойчивости к гипоксии.

ПРИМЕР 3. Экспрессия HIF1 α DN повышала эффективность CAR-T *in vivo*

Краткое описание

[00135] В настоящем примере эффективность Т-клеток с CAR, армированных с помощью HIF1 α DN, в отношении GPC3⁺ клеток опухоли определяли *in vivo* на двух разных ксенотрансплантатных моделях.

Способы

[00136] Гепатоцеллюлярную карциному Huh7 применяли для проверки эффективности Т-клеток с CAR, армированных с помощью HIF1 α DN, *in vivo* в отношении уменьшения объема опухоли. Опухолевые клетки имплантировали в бок мышей NSG (10 мышей/группа). Когда опухоли достигали среднего объема 150 мм³, мышам вводили 7 x 10⁶ указанных CAR-T или 7 миллионов нетрансдуцированных Т-клеток, и измеряли опухоли один раз в две недели (см. **фиг. 14**).

[00137] Гепатоцеллюлярную карциному Hep3B применяли для проверки эффективности Т-клеток с CAR, армированных с помощью HIF1 α DN, *in vivo* в отношении уменьшения объема опухоли. Опухолевые клетки имплантировали в бок мышей NSG (10 мышей/группа). Когда опухоли достигали среднего объема 150 мм³, мышам вводили

7 x 10⁶ указанных CAR-T или 7 миллионов нетрансдуцированных T-клеток, и измеряли опухоли один раз в две недели (см. **фиг. 15**).

[00138] Анализ *ex vivo* выполняли с использованием мышей, несущих опухоль Huh7, которым вводили 7 x 10⁶ CAR-T. Через четыре дня после инфузии опухоли собирали от 5 мышей на группу. Количество CD45⁺ клеток рассчитывали посредством проточной цитометрии с применением AccuCheck Counting Beads. (См. **фигуру 16**).

[00139] Мышам, несущим опухоли Her3B, вводили 7 x 10⁶ T-клеток с CAR. Для анализа IFN γ кровь собирали в небольших объемах через семь дней после инфузии CAR-T и сыворотку крови отделяли с применением BD Microtainer Serum Separator Tubes. Уровни IFN γ определяли с применением анализов MSD (см. **фигуру 17**).

[00140] Мышам, несущим опухоли Her3B, вводили 7 x 10⁶ T-клеток с CAR. Через четыре дня после инфузии селезенку и опухоли собирали, и оценивали экспрессию CD27 и CD70 посредством окраски для проточной цитометрии. (См. **фигуру 18**).

Результаты

[00141] T-клетки с CAR для GPC3 HIF1 α DN были способны более эффективно контролировать HUH7 и индуцировали регрессию опухоли Her3B быстрее, чем их неармированные аналоги (см. **фигуры 14 и 15**). Авторами была предложена гипотеза, что экспрессия HIF1 α DN обеспечивает T-клеткам с CAR повышенную способность инфильтрировать солидные опухоли с низким содержанием кислорода. Анализ опухолей Her3B через четыре дня после инфузии T-клеток действительно показал в 2-3 раза большее количество T-клеток у мышей, получавших обработку с помощью HIF1 α DN, что позволяет предположить, что экспрессия HIF1 α DN обеспечивает T-клеткам с CAR возможность лучше инфильтрировать и пролиферировать в солидных опухолях (см. **фигуру 16**). Наряду с увеличением количества клеток в опухоли авторы также выявили более высокий уровень IFN- γ в сыворотке крови мышей, получавших инфузию T-клеток с CAR для GPC3, армированных с помощью HIF1 α DN. Следует отметить, что в то время как в опухоли армированные и неармированные T-клетки с CAR проявляли CD70⁺ активированный фенотип, клетки с HIF1 α DN были активированы в меньшей степени в селезенке с недоступным показателем экспрессии CD70, сходным с таковым для клеток UT.

[00142] **Вывод** T-клетки с CAR для GPC3, экспрессирующие HIF1 α DN, индуцировали более быструю регрессию опухоли, чем неармированные T-клетки с CAR для GPC3. Регрессия опухоли была ассоциирована со значительным повышением способности клеток инфильтрировать и пролиферировать в опухоли. Более того, хотя армированные клетки были полностью активированы в опухоли, они экспрессировали меньше CD70, чем

неармированные Т-клетки с CAR в селезенке, что позволяет предположить, что они могут поддерживать менее активированный статус даже *in vivo*. В целом, данные наблюдения указывают на то, что блокирование пути HIF1 α посредством экспрессии доминантно-негативного HIF1 α повышает эффективность Т-клеток с CAR *in vivo* с одновременным сохранением менее активированного и дифференцированного фенотипа.

[00143] Варианты осуществления, описанные в данном документе, могут применяться на практике в отсутствие какого-либо элемента или элементов, ограничения или ограничений, которые конкретно не раскрыты в данном документе. Используемые термины и выражения применяются как описательные, а не ограничительные термины, и нет намерения, чтобы при применении таких терминов и выражений исключались какие-либо эквиваленты показанных и описанных признаков или их частей, однако при этом признается, что возможны различные модификации в пределах объема заявленных вариантов осуществления. Таким образом, следует понимать, что хотя настоящее описание было конкретно раскрыто вариантами осуществления, специалисты в данной области техники могут прибегать к необязательным признакам, модификациям и вариациям концепций, раскрытых в данном документе, и что такие модификации и вариации учтены в объеме этих вариантов осуществления, как определено описанием и прилагаемой формулой изобретения. Хотя некоторые аспекты настоящего раскрытия могут быть идентифицированы в данном документе как особенно выгодные, предполагается, что настоящее изобретение не ограничено этими конкретными аспектами настоящего изобретения.

[00144] Формула изобретения или описание, в которых содержится "или" между одним или несколькими представителями группы, считаются удовлетворенными, если один, более одного или все представители группы присутствуют в указанном продукте или способе, используются в нем или иным образом имеют отношение к нему, если не указано противоположное или иное не очевидно из контекста. Настоящее изобретение включает варианты осуществления, в которых ровно один представитель группы присутствует в указанных продукте или способе, используется в них или иным образом имеет отношение к ним. Настоящее изобретение включает варианты осуществления, в которых более одного представителя или все представители группы присутствуют в указанном продукте или способе, используются в нем или иным образом имеют отношение к нему.

[00145] Кроме того, настоящее изобретение охватывает все варианты, комбинации и перестановки, в которых одно или несколько из ограничений, элементов, пунктов и описательных терминов из одного или нескольких перечисленных пунктов формулы изобретения вводятся в другой пункт формулы. Например, любой пункт формулы

изобретения, зависимый от другого пункта формулы, может быть изменен для включения одного или нескольких ограничений, обнаруженных в любом другом пункте формулы изобретения, который зависит от того же основного пункта формулы. Если элементы представлены в виде перечней, например, в формате группы Маркуша, то также раскрыта каждая подгруппа элементов, и при этом любой(-ые) элемент(-ы) можно удалить из группы.

[00146] В целом, следует понимать, что если настоящее изобретение или аспекты настоящего изобретения обозначается/обозначаются как содержащее/содержащие конкретные элементы и/или признаки, то определенные варианты осуществления настоящего изобретения или аспекты настоящего изобретения состоят или по сути состоят из таких элементов и/или признаков. Для целей упрощения, такие варианты осуществления не были конкретно изложены в данном документе в тех же выражениях.

[00147] Все патенты и публикации, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждый независимый патент и публикация были специально и отдельно указаны как включенные посредством ссылки. Цитирование или определение любого литературного источника в каком-либо разделе настоящей заявки не должно рассматриваться как признание того, что такой литературный источник доступен в качестве предшествующего уровня техники по отношению к настоящему изобретению.

Таблица 5. Последовательности, применяемые в примерах.

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

SEQ ID NO: 15	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для BZ GPC3-2
SEQ ID NO: 16	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для TZ GPC3-2
SEQ ID NO: 17	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для 28Z GPC3-2
SEQ ID NO: 18	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для 28BZ GPC3-2
SEQ ID NO: 19	Аминокислотная последовательность CAR для BZ GPC3-3
SEQ ID NO: 20	Аминокислотная последовательность CAR для 28BZ GPC3-3
SEQ ID NO: 21	Аминокислотная последовательность CAR для BZ GPC3-4
SEQ ID NO: 22	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для BZ GPC3-3
SEQ ID NO: 23	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для 28BZ GPC3-3
SEQ ID NO: 24	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для GPC3-4
SEQ ID NO: 25	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для BZ GPC3 (с удаленным WPRE)
SEQ ID NO: 26	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для BZ GPC3 (с удаленным WPRE)
SEQ ID NO: 27	VH GPC3
SEQ ID NO: 28	VL GPC3
SEQ ID NO: 29	VH GPC3-2
SEQ ID NO: 30	VL GPC3-2
SEQ ID NO: 31	Аминокислотная последовательность scFv к GPC3-3
SEQ ID NO: 32	Аминокислотная последовательность scFv к GPC3-4
SEQ ID NO: 33	Последовательность нуклеиновой кислоты scFv к GPC3
SEQ ID NO: 34	Последовательность нуклеиновой кислоты scFv к GPC3-2
SEQ ID NO: 35	Последовательность нуклеиновой кислоты scFv к GPC3-3
SEQ ID NO: 36	Последовательность нуклеиновой кислоты scFv к GPC3-4
SEQ ID NO: 37	CDR1 VH GPC3 и GPC3-2
SEQ ID NO: 38	CDR2 VH GPC3 и GPC3-2
SEQ ID NO: 39	CDR3 VH GPC3 и GPC3-2
SEQ ID NO: 40	CDR1 VL GPC3
SEQ ID NO: 41	CDR2 VL GPC3
SEQ ID NO: 42	CDR3 VL GPC3
SEQ ID NO: 43	CDR1 VL GPC3-2
SEQ ID NO: 44	CDR2 VL GPC3-2
SEQ ID NO: 45	CDR3 VL GPC3-2

SEQ ID NO: 46	Последовательность нуклеиновой кислоты CAR для BZ GPC3 и доминантно-негативного HIF-1 α
SEQ ID NO: 47	Аминокислотная последовательность CAR для BZ GPC3 и доминантно-негативного HIF-1 α

Таблица 6. Последовательности

SE	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
Q I	GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKRYFDYW
D	GQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNI
N	GSNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIGGLQSD
O:	EADYYCVAWDDSLNAPVFGGGTKVTVL
1	
SE	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
Q I	GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGRKRYFDYW
D	GQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSDI
N	GSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDE
O:	ADYYCATWDDRMYS PVFGGGTKLTVL
2	
SE	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPGVHSEVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFS
Q I	SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM
D	NSLRAEDTAVYYCARGKRYFDYWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYEL
N	TQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNNQRPSGV
O:	PDRFSGSKSGTSASLAIGGLQSDDEADYYCVAWDDSLNAPVFGGGTKVTVLES
3	KYGPPCPPCFWLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPENMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR*
SE	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPGVHSEVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFS
Q I	SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM
D	NSLRAEDTAVYYCARGKRYFDYWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYEL
N	TQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNNQRPSGV
O:	PDRFSGSKSGTSASLAIGGLQSDDEADYYCVAWDDSLNAPVFGGGTKVTVLES
4	KYGPPCPPCFWLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRVKFSRSADAPA*
SE	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPGVHSEVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFS
Q I	SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM

D	NSLRAEDTAVYYCARGKRYFDYWGQGMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYEL
N	TQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNNQRPSGV
O:	PDRFSGSKSGTSASLAIGGLQSDDEADYYCVAWDDSLNAPVFGGGTKVTVLES
5	KYGPPCPPCFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT RRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR EEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERR RGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR*
SE	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPGVHSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
Q I	SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM
D	NSLRAEDTAVYYCARGKRYFDYWGQGMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYEL
N	TQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNNQRPSGV
O:	PDRFSGSKSGTSASLAIGGLQSDDEADYYCVAWDDSLNAPVFGGGTKVTVLES
6	KYGPPCPPCFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT RRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGL STATKDTYDALHMQUALPPR*
SE	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA
Q I	MSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL
D	RAEDTAVYYCAKGRYFDYWGQGMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSQSVLTQ
N	PPSASGTPGQRVTISCSGGSSDIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYNNQRPSGVDP
O:	RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDRMYS PVFGGGTKLTVLESKYG
7	PPCPPCFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR*
SE	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA
Q I	MSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL
D	RAEDTAVYYCAKGRYFDYWGQGMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSQSVLTQ
N	PPSASGTPGQRVTISCSGGSSDIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYNNQRPSGVDP
O:	RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDRMYS PVFGGGTKLTVLESKYG
8	PPCPPCFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRVKFSRSADAPA*
SE	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA
Q I	MSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL

D N O: 9	RAEDTAVYYCAK GKRYFDYWGQGMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQ PPSASGTPGQRVTISCSGGSSDIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYYNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDRMYS PVFGGGTKLTVLESKYG PPCPPCFWVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*
SE Q I D N O: 10	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAK GKRYFDYWGQGMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQ PPSASGTPGQRVTISCSGGSSDIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYYNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDRMYS PVFGGGTKLTVLESKYG PPCPPCFWVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQALPPR*
SE Q I D N O: 11	ATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCCCATCCCGCCT TCCTGCTGATTCTGCTGTACTCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGG AGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA TTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGC AGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTA CTGTGCGAGAGGAAAGCGATACTTTGACTACTGGGGCCAGGGGACAATGGT CACCGTCTCGAGTGGTGGGGGGGGCAGCGGTGGTGGAGGCTCTGGTGGAGG AGGGAGCTCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGG CAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAGGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATA CTGTAAACTGGTTCCGGCAGCTCCAGGAACGGCCCCAACTCCTCGTTTA TTTTAATAATCAGCGACCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAG TCTGGCACCTCGGCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGG CTGACTATTACTGTGTAGCATGGGATGACTCTCTGAATGCTCCGGTGTTCGG CGGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTAGAGAGCAAATATGGACCACCATGCCC TCCATGTCCTTTTTGGGTCCCTGGTGGTCTGGGAGGCGTGCTGGCATGTTATT

	<p>CTCTGCTGGTCACAGTGGCTTTCATCATCTTCTGGGTCAAGCGAGGCCGGAA GAAACTGCTGTACATCTTCAAACAGCCTTTTATGCGCCCAGTGCAGACA ACTCAGGAGGAAGACGGCTGCTCTTGTCGGTTCCTCCGAGGAAGAGGAAGGGGGA TGTGAGCTGCGCGTGAAGTTTTCTCGAAGTGCCGATGCTCCTGCATATCAGC AGGGACAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAATCTGGGCCGGAGAGAGGAAT ACGACGTGCTGGATAAGAGGCGCGGCAGAGACCCAGAAATGGGCGGGAAG CCACGACGGAAAAACCCCAGGAGGGGCTGTATAATGAACTGCAGAAGGAC AAAATGGCCGAGGCTTACAGCGAAATCGGGATGAAGGGAGAGAGAAGGCG CGGAAAAGGCCACGATGGACTGTATCAGGGCCTGAGCACTGCCACCAAGGA CACCTACGATGCTCTGCACATGCAGGCACTGCCACCCAGGTGA</p>
SE Q I D N O: 12	<p>ATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCCCATCCCGCCT TCCTGCTGATTCCCTGGTGTACTCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGG AGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA TTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGC AGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTA CTGTGCGAGAGGAAAGCGATACTTTGACTACTGGGGCCAGGGGACAATGGT CACCGTCTCGAGTGGTGGGGGGGGCAGCGGTGGTGGAGGCTCTGGTGGAGG AGGGAGCTCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGG CAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAGGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATA CTGTAAACTGGTTCCGGCAGCTCCAGGAACGGCCCCAACTCCTCGTTTA TTTTAATAATCAGCGACCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAG TCTGGCACCTCGGCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGG CTGACTATTACTGTGTAGCATGGGATGACTCTCTGAATGCTCCGGTGTTCGG CGGAGGGACCAAGGTCACCGTCTAGAGAGCAAATATGGACCACCATGCCC TCCATGTCCTTTTTGGGTCCCTGGTGGTCTGGGAGGCGTGCTGGCATGTTATT CTCTGCTGGTCACAGTGGCTTTCATCATCTTCTGGGTCCGCGTGAAGTTTTCT CGAAGTGCCGATGCTCCTGCATGA</p>
SE Q I D N	<p>ATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCCCATCCCGCCT TCCTGCTGATTCCCTGGTGTACTCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGG AGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA TTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGC</p>

O: 13	AGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTA CTGTGCGAGAGGAAAGCGATACTTTGACTACTGGGGCCAGGGGACAATGGT CACCGTCTCGAGTGGTGGGGGGGGCAGCGGTGGTGGAGGCTCTGGTGGAGG AGGGAGCTCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGG CAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAGGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATA CTGTAAACTGGTTCGGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCTCGTTTA TTTTAATAATCAGCGACCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAG TCTGGCACCTCGGCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGG CTGACTATTACTGTGTAGCATGGGATGACTCTCTGAATGCTCCGGTGTTCGG CGGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTAGAGAGCAAATATGGACCACCATGCCC TCCATGTCCTTTTTGGGTCCTGGTGGTCGTGGGAGGGCGTGCTGGCATGTTATT CCCTGCTGGTCACTGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGCGGAGCAAGCGGAG CCGGCTGCTGCACTCTGACTACATGAACATGACTCCACGGAGACCCGGCCCT ACCCGGAACATTATCAGCCCTACGCCCCACCCAGAGATTTTGCCGCTTATA GGTCCAGGGTGAAGTTTTCTCGCAGTGCAGATGCCCTGCTTATCAGCAGGG ACAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAATCTGGGCAGGCGCGAGGAATACGA CGTGCTGGATAAGCGACGGGGCAGAGACCCCGAAATGGGAGGGAAGCCCA GAAGGAAAAACCCTCAGGAGGGGCTGTATAATGAACTGCAGAAGGACAAA ATGGCAGAGGCCTACAGTGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGCCGACGGGG AAAAGGCCACGATGGACTGTATCAGGGCCTGTCTACTGCCACCAAGGACAC CTACGATGCCCTGCACATGCAGGCTCTGCCTCCACGCTGA
SE Q I D N O: 14	ATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCCCATCCCGCCT TCCTGCTGATTCTGGTGTACACTCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGG AGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA TTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGG GGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGC AGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTA CTGTGCGAGAGGAAAGCGATACTTTGACTACTGGGGCCAGGGGACAATGGT CACCGTCTCGAGTGGTGGGGGGGGCAGCGGTGGTGGAGGCTCTGGTGGAGG AGGGAGCTCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGG CAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAGGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATA CTGTAAACTGGTTCGGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCTCGTTTA

	<p>TTTTAATAATCAGCGACCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAG TCTGGCACCTCGGCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGG CTGACTATTACTGTGTAGCATGGGATGACTCTCTGAATGCTCCGGTGTTCGG CGGAGGGACCAAGGTCACCGTCCTAGAGAGCAAATATGGACCACCATGCCC TCCATGTCCTTTTTGGGTCCTGGTGGTCGTGGGAGGCGTGCTGGCATGTTATT CCCTGCTGGTCACTGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGCGGAGCAAGCGGAG CCGGCTGCTGCACTCTGACTACATGAACATGACTCCACGGAGACCCGGCCCT ACCCGAAACATTATCAGCCCTACGCCCCACCCAGAGATTTTGCCGCTTATA GGTCCAAGCGCGGCCGAAAGAAACTGCTGTACATCTTCAAACAGCCCTTCAT GAGACCCGTCCAGACAACTCAGGAGGAAGACGGCTGCAGCTGTAGGTTCCC CGAGGAAGAGGAAGGGGGATGTGAGCTGAGGGTGAAGTTTTCTCGCAGTGC AGATGCCCCTGCTTATCAGCAGGGACAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAA TCTGGGCAGGCGCGAGGAATACGACGTGCTGGATAAGCGACGGGGCAGAGA CCCCGAAATGGGAGGGAAGCCCAGAAGGAAAAACCCTCAGGAGGGGCTGT ATAATGAACTGCAGAAGGACAAAATGGCAGAGGCCTACAGTGAAATCGGGA TGAAGGGAGAGCGCCGACGGGGAAAAGGCCACGATGGACTGTATCAGGGC CTGTCTACTGCCACCAAGGACACCTACGATGCCCTGCACATGCAGGCTCTGC CTCCACGCTGA</p>
<p>SE Q I D N O: 15</p>	<p>ATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCCCATCCCGCCT TCCTGCTGATTCCCTGAGGTCCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGC AGCCTGGAGGAAGTCTGCGACTGTCATGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTCAG CTCCTATGCAATGAGCTGGGTGCGACAGGCACCAGGCAAGGGGCTGGAGTG GGTCTCCGCTATCTCCGGCTCTGGAGGCTCTACTTACTATGCAGACAGTGTG AAGGGGCGGTTCAACAATCTCCAGAGATAACTCTAAGAACACTCTGTACCTGC AGATGAACTCTCTGAGAGCTGAGGACACCGCAGTGTACTATTGCGCCAAGG GCAAAAGGTACTIONTTGATTATTGGGGACAGGGCACTATGGTGACCGTCTCTAG TGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGAGGAGGCAGTCAGT CAGTGCTGACACAGCCACCTAGCGCCTCCGGAACCCCAGGACAGCGGGTCA CAATCTCTTGTAGTGGGGGATCAAGCGACATTGGGAGCAACACCGTGAATT GGTATCAGCAGCTGCCTGGAACAGCTCAAAGCTGCTGATCTACTATAACAA TCAGAGGCCCTCCGGCGTCCCTGATCGCTTCTCAGGCAGCAAATCCGGGACT TCTGCAAGTCTGGCCATTAGTGGCCTGCAGTCAGAGGACGAAGCCGATTACT ATTGTGCTACCTGGGACGATAGGATGTACTCTCCCGTGTTCCGGCGGGGGAAC AAAGCTGACTGTCCTGGAGAGCAAATATGGACCACCATGCCCTCCATGTCCT</p>

	TTTTGGGTCCTGGTGGTCGTGGGAGGCGTGCTGGCATGTTATTCTCTGCTGGT CACAGTGGCTTTCATCATCTTCTGGGTCAAGCGAGGCCGGAAGAACTGCTG TACATCTTCAAACAGCCTTTTATGCGCCCAGTGCAGACAACCTCAGGAGGAAG ACGGCTGCTCTTGTCGGTTCCCCGAGGAAGAGGAAGGGGGATGTGAGCTGC GCGTGAAGTTTTCTCGAAGTGCCGATGCTCCTGCATATCAGCAGGGACAGAA CCAGCTGTACAACGAGCTGAATCTGGGCCGGAGAGAGGAATACGACGTGCT GGATAAGAGGGCGCGGCAGAGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCACGACGGA AAAACCCCCAGGAGGGGCTGTATAATGAACTGCAGAAGGACAAAATGGCCG AGGCTTACAGCGAAATCGGGATGAAGGGAGAGAGAAGGCGCGGAAAAGGC CACGATGGACTGTATCAGGGCCTGAGCACTGCCACCAAGGACACCTACGAT GCTCTGCACATGCAGGCACTGCCACCCAGGTGA
SE Q I D N O: 16	ATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCCCATCCCGCCT TCCTGCTGATTCCCTGAGGTCCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGC AGCCTGGAGGAAGTCTGCGACTGTCATGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTCAG CTCCTATGCAATGAGCTGGGTGCGACAGGCACCAGGCAAGGGGCTGGAGTG GGTCTCCGCTATCTCCGGCTCTGGAGGCTCTACTTACTATGCAGACAGTGTG AAGGGGCGGTTCAACAATCTCCAGAGATAACTCTAAGAACACTCTGTACCTGC AGATGAACTCTCTGAGAGCTGAGGACACCGCAGTGTACTATTGCGCCAAGG GCAAAGGTACTTTGATTATTGGGGACAGGGCACTATGGTGACCGTCTCTAG TGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGAGGAGGCAGTCAGT CAGTGCTGACACAGCCACCTAGCGCCTCCGGAACCCCAGGACAGCGGGTCA CAATCTCTTGTAGTGGGGGATCAAGCGACATTGGGAGCAACACCGTGAATT GGTATCAGCAGCTGCCTGGAACAGCTCCAAAGCTGCTGATCTACTATAACAA TCAGAGGCCCTCCGGCGTCCCTGATCGCTTCTCAGGCAGCAAATCCGGGACT TCTGCAAGTCTGGCCATTAGTGGCCTGCAGTCAGAGGACGAAGCCGATTACT ATTGTGCTACCTGGGACGATAGGATGTACTCTCCCGTGTTTCGGCGGGGGAAC AAAGCTGACTGTCCTGGAGAGCAAATATGGACCACCATGCCCTCCATGTCCT TTTTGGGTCCTGGTGGTCGTGGGAGGCGTGCTGGCATGTTACTCCCTGCTGG TCACTGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGCGGGTGAAGTTTTCTCGCAGTGCC GACGCTCCCGCATGA
SE Q I D N	ATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCCCATCCCGCCT TCCTGCTGATTCCCTGAGGTCCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGC AGCCTGGAGGAAGTCTGCGACTGTCATGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTCAG CTCCTATGCAATGAGCTGGGTGCGACAGGCACCAGGCAAGGGGCTGGAGTG

O: 17	<p>GGTCTCCGCTATCTCCGGCTCTGGAGGCTCTACTTACTATGCAGACAGTGTG AAGGGGCGGTTTACAATCTCCAGAGATAACTCTAAGAACACTCTGTACCTGC AGATGAACTCTCTGAGAGCTGAGGACACCGCAGTGTACTATTGCGCCAAGG GCAAAAGGTACTIONTTGATTATTGGGGACAGGGCACTATGGTGACCGTCTCTAG TGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGAGGAGGCAGTCAGT CAGTGCTGACACAGCCACCTAGCGCCTCCGGAACCCCAGGACAGCGGGTCA CAATCTCTTGTAGTGGGGGATCAAGCGACATTGGGAGCAACACCGTGAATT GGTATCAGCAGCTGCCTGGAACAGCTCCAAAGCTGCTGATCTACTATAACAA TCAGAGGCCCTCCGGCGTCCCTGATCGCTTCTCAGGCAGCAAATCCGGGACT TCTGCAAGTCTGGCCATTAGTGGCCTGCAGTCAGAGGACGAAGCCGATTACT ATTGTGCTACCTGGGACGATAGGATGTACTCTCCCGTGTTTCGGCGGGGGAAC AAAGCTGACTGTCCTGGAGAGCAAATATGGACCACCATGCCCTCCATGTCCT TTTTGGGTCCTGGTGGTCGTGGGAGGCGTGCTGGCATGTTATTCCCTGCTGGT CACAGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGCGGAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTG CACTCTGACTACATGAACATGACCCCCCGGAGACCCGGCCCTACAAGAAAG CATTATCAGCCTTACGCCCCACCCAGGGACTTCGCAGCTTATCGCTCCCGAG TGAAATTTTCTCGCAGTGCAGATGCCCCCGCTTATCAGCAGGGCCAGAATCA GCTGTACAACGAGCTGAATCTGGGGAGGCGCGAGGAATACGACGTGCTGGA TAAGCGACGGGGCCGGGACCCCGAAATGGGAGGAAAGCCTAGAAGGAAAA ACCCACAGGAGGGCCTGTATAATGAACTGCAGAAGGACAAAATGGCAGAGG CCTACAGCGAAATCGGAATGAAGGGAGAGCGCCGACGGGGCAAAGGACAC GATGGCCTGTATCAGGGGCTGAGCACCGCCACAAAGGACACCTACGATGCC CTGCACATGCAGGCTCTGCCTCCACGCTGA</p>
SE Q I D N O: 18	<p>ATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCCATCCCGCCT TCCTGCTGATTCTGAGGTCCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGC AGCCTGGAGGAAGTCTGCGACTGTCATGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTCAG CTCCTATGCAATGAGCTGGGTGCGACAGGCACCAGGCAAGGGGCTGGAGTG GGTCTCCGCTATCTCCGGCTCTGGAGGCTCTACTTACTATGCAGACAGTGTG AAGGGGCGGTTTACAATCTCCAGAGATAACTCTAAGAACACTCTGTACCTGC AGATGAACTCTCTGAGAGCTGAGGACACCGCAGTGTACTATTGCGCCAAGG GCAAAAGGTACTIONTTGATTATTGGGGACAGGGCACTATGGTGACCGTCTCTAG TGGAGGAGGAGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGAGGAGGCAGTCAGT CAGTGCTGACACAGCCACCTAGCGCCTCCGGAACCCCAGGACAGCGGGTCA CAATCTCTTGTAGTGGGGGATCAAGCGACATTGGGAGCAACACCGTGAATT</p>

	<p>GGTATCAGCAGCTGCCTGGAACAGCTCCAAAGCTGCTGATCTACTATAACAA TCAGAGGCCCTCCGGCGTCCCTGATCGCTTCTCAGGCAGCAAATCCGGGACT TCTGCAAGTCTGGCCATTAGTGGCCTGCAGTCAGAGGACGAAGCCGATTACT ATTGTGCTACCTGGGACGATAGGATGTACTCTCCCGTGTTCCGGCGGGGGAAC AAAGCTGACTGTCCTGGAGAGCAAATATGGACCACCATGCCCTCCATGTCCT TTTTGGGTCCTGGTGGTCGTGGGAGGCGTGCTGGCATGTTATCCCTGCTGGT CACTGTGGCCTTCATCATCTTCTGGGTGCGGAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTG CACTCTGACTACATGAACATGACTCCACGGAGACCCGGCCCTACCCGGAAA CATTATCAGCCCTACGCCCCACCCAGAGATTTTGCCGCTTATAGGTCCAAGC GCGGCCGAAAGAAACTGCTGTACATCTTCAAACAGCCCTTCATGAGACCCGT CCAGACAACCTCAGGAGGAAGACGGCTGCAGCTGTAGGTTCCCCGAGGAAGA GGAAGGGGGATGTGAGCTGAGGGTGAAGTTTTCTCGCAGTGCAGATGCCCC TGCTTATCAGCAGGGACAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAATCTGGGCAG GCGCGAGGAATACGACGTGCTGGATAAGCGACGGGGCAGAGACCCCGAAAT GGGAGGGAAGCCCAGAAGGAAAAACCCTCAGGAGGGGCTGTATAATGAAC TGCAGAAGGACAAAATGGCAGAGGCTACAGTGAAATCGGGATGAAGGGA GAGCGCCGACGGGGAAAAGGCCACGATGGACTGTATCAGGGCCTGTCTACT GCCACCAAGGACACCTACGATGCCCTGCACATGCAGGCTCTGCCTCCACGCT GA</p>
SE Q I D N O: 19	<p>MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNR NTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCSQNTHPPTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTGDTAYSQKFK GRVTLTADKSTSTAYMELSSLTSEDNAVYYCTRFYSYTYWGQGLVTVSSDKT HTCPPCPFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*</p>
SE Q I D N O: 20	<p>MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLVHSNR NTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCSQNTHPPTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTGDTAYSQKFK GRVTLTADKSTSTAYMELSSLTSEDNAVYYCTRFYSYTYWGQGLVTVSSDKT HTCPPCPFWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLRHSDYMNMTPRRP</p>

	GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR*
SE Q I D N O: 21	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG LHWVRQAPGKGLEWVA AISYDGSKKYYADSVKGRLTISRDN SKNTLYLQMNS LRPDDTALYFCARGWFVEPLSWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQ PPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAA WDDSLNGYVFGTGTKLTVLESKYG PPCPPCFWVLLVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFP EEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR*
SE Q I D N O: 22	ATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCCCATCCCGCCT TCCTGCTGATTCTGATGTCGTGATGACGCAGAGCCCTCTCTCTTCCCGTT ACCCCTGGTGAACCCGCATCAATAAGTTGCCGCTCCAGTCAATCACTTGTAC ATTCAAATCGCAATACCTACCTGCACTGGTATTTGCAGAAGCCGGGACAATC CCCTCAATTGTTGATATATAAGGTATCCAATCGCTTTTCTGGAGTTCCTGATA GATTCAGCGGATCCGGGTCTGGTACTGATTTCACTCTGAAAATATCCAGGGT CGAAGCTGAGGACGTAGGCGTATATTATTGCTCTCAGAACACGCATGTCCCG CCGACTTTCGGCCAGGGCACTAACTTGAGATCAAGGGTGGGGGGGGCAGC GGTGGTGGAGGCTCTGGTGGAGGAGGGAGCCAGGTCCA ACTCGTTCAAAGT GGCGCAGAGGTCAAAAAGCCAGGCGGAGCGTTAAAGTATCATGTAAGGCC AGCGGTTATACTTTCCTGATTATGAAATGCACTGGGTGCGACAAGCCCCCG GGCAAGGTCTTGAGTGGATGGGTGCACTTGATCCAAA AACTGGGGATACTG CCTATAGCCAGAAATTCAAAGGGCGCGTCACACTCACTGCCGACAAAAGTA CGAGCACAGCTTATATGGAATTGAGTTCCTGACGAGCGAGGATACGGCAG TTTATTACTGTACGCGCTTCTACTCTTACACTTATTGGGGGCAAGGCACTTTG GTTACTGTGTCTCTGACAAGACCCATACGTGTCCACCGTGTCCCTTCTGGGT ATTGGTTGTGGTCGGCGGTGTCCTTGCTTGTTACAGCCTTCTCGTGACAGTCG CATTATAATTTTTTGGGTGAAAAGAGGTGCGAAAAGTTGCTGTATATTTT CAAACAACCCTTTATGAGACCTGTACAAACGACTCAGGAAGAGGATGGTTG TAGTTGCAGGTTTCCGGAGGAGGAGGAAGGTGGGTGCGAACTGCGGGTGAA ATTTAGTAGAAGCGCTGACGCACCAGCTTACCAACAAGGACAGAACCAATT

	<p>GTACAACGAGCTTAACTTGGGTAGGAGGGAGGAATATGATGTACTGGACAA AAGGCGAGGTCGCGATCCGGAAATGGGAGGCAAGCCACAGCGCCGGAAAA ACCCGCAGGAAGGCTTGTACAACGAACTTCAGAAAGATAAAAATGGCAGAAG CATACTCCGAAATAGGGATGAAAGGTGAACGGCGGCGAGGCAAGGGCCAC GACGGTCTGTACCAAGGGTTGTCAACGGCAACTAAAGACACGTATGATGCA CTTCATATGCAAGCTCTGCCACCCAGGTGA</p>
SE	ATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCCCATCCCGCCT
Q I	TCCTGCTGATTCTGATGTCGTGATGACGCAGAGCCCTCTCTCTTCCCGTT
D	ACCCCTGGTGAACCCGCATCAATAAGTTGCCGCTCCAGTCAATCACTTGTAC
N	ATTCAAATCGCAATACCTACCTGCACTGGTATTTGCAGAAGCCGGGACAATC
O:	CCCTCAATTGTTGATATATAAGGTATCCAATCGCTTTTCTGGAGTTCCTGATA
23	<p>GATTCAGCGGATCCGGGTCTGGTACTGATTTCACTCTGAAAATATCCAGGGT CGAAGCTGAGGACGTAGGCGTATATTATTGCTCTCAGAACACGCATGTCCCG CCGACTTTCGGCCAGGGCACTAACTTGAGATCAAGGGTGGGGGGGGCAGC GGTGGTGGAGGCTCTGGTGGAGGAGGGAGCCAGGTCCAACCTCGTTCAAAGT GGCGCAGAGGTCAAAAAGCCAGGCGGAGCGTTAAAGTATCATGTAAGGCC AGCGGTTATACTTTCCTGATTATGAAATGCACTGGGTGCGACAAGCCCCCG GGCAAGGTCTTGAGTGGATGGGTGCACTTGATCCAAAACTGGGGATACTG CCTATAGCCAGAAATTCAAAGGGCGCGTCACACTCACTGCCGACAAAAGTA CGAGCACAGCTTATATGGAATTGAGTTCCTGACGAGCGAGGATACGGCAG TTTATTACTGTACGCGCTTCTACTCTTACACTTATTGGGGGCAAGGCACTTTG GTTACTGTGTCTCTGACAAGACCCATACGTGTCCACCGTGTCCCTTCTGGGT ATTGGTTGTGGTCGGCGGTGTCCTTGCTTGTTACAGCCTTCTCGTGACAGTCG CATTATAATTTTTTGGGTGCGGAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACTCTGA CTACATGAACATGACTCCACGGAGACCCGGCCCTACCCGGAAACATTATCA GCCCTACGCCCCACCCAGAGATTTTGCCGCTTATAGGTCCAAAAGAGGTTCGG AAAAAGTTGCTGTATATTTTCAAACAACCCTTTATGAGACCTGTACAAACGA CTCAGGAAGAGGATGGTTGTAGTTGCAGGTTTCCGGAGGAGGAGGAAGGTG GGTGCGAACTGCGGGTCAAATTTAGTAGAAGCGCTGACGCACCAGCTTACC AACAAAGGACAGAACCAATTGTACAACGAGCTTAACTTGGGTAGGAGGGAGG AATATGATGTACTGGACAAAAGGCGAGGTCGCGATCCGGAAATGGGAGGCA AGCCACAGCGCCGGAAAAACCCGCAGGAAGGCTTGTACAACGAACTTCAGA AAGATAAAAATGGCAGAAGCATACTCCGAAATAGGGATGAAAGGTGAACGG</p>

	CGGCGAGGCAAGGGCCACGACGGTCTGTACCAAGGGTTGTCAACGGCAACT AAAGACACGTATGATGCACTTCATATGCAAGCTCTGCCACCCAGGTGA
SE Q I D N O: 24	ATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCCCATCCCGCCT TCCTGCTGATTCCCTCAGGTCCAGCTTGTGCAAAGCGGAGGAGGAGTGGTACA GCCTGGCCGCTCTTTGAGACTGTCTTGTGCGGCCAGTGGATTTACATTCTCTT CTTATGGGTTGCATTGGGTCAGACAAGCACCGGGCAAAGGATTGGAATGGG TCGCGGCCATTAGCTATGATGGCTCAAAGAAATATTATGCCGATTCCGTA AGGGAGGTTGACAATAAGCCGGGATAACAGCAAGAACA ACTTTGTATCTTCA GATGAATAGCCTCCGACCGGACGACACGGCACTGTATTTTTGCGCACGCGGG TGGTTTGTAGAACCCTGAGTTGGGGACAAGTACTCTTGTACACGGTATCTT CTGGCGGAGGTGGGAGTGGTGGGGGTGGCAGTGGCGGGGGTGGGTCAAAA GCGTGCTTACACAACCTCCTTCTGCGAGCGGAACTCCGGGACAACGGGTTAC GATTTTATGCTCCGGCTCAAGTAGCAATATAGGATCAAATACAGTGAATTGG TATCAACA ACTCCCTGGCACAGCGCCCAAGCTGCTGATCTACTCTAATAACC AGAGGCCGAGTGGTGTGCCAGATAGGTT CAGTGGCTCTAAATCAGGTA CTAGC GCGCGAGCCTCGCCATTT CAGGACTTCAATCAGAGGATGAAGCGGACTACT ACTGTGCCCGTGGGATGATTTACTTAATGGATATGTTTTCGGGACCGGAAC AAAATTGACGGTATTGGAGAGCAAATATGGACCACCATGCCCTCCATGTCCT TTTTGGGTCCTGGTGGTCGTGGGAGGCGTGCTGGCATGTTATTCTCTGCTGGT CACAGTGGCTTT CATCATCTTCTGGGTCAAGCGAGGCCGGAAGAACTGCTG TACATCTTCAAACAGCCTTTTATGCGCCCAGTGCAGACA ACTCAGGAGGAAG ACGGCTGCTCTTGT CGGTTCCCCGAGGAAGAGGAAGGGGGATGTGAGCTGC GCGTGAAGTTTTCTCGAAGTGCCGATGCTCCTGCATATCAGCAGGGACAGAA CCAGCTGTACAACGAGCTGAATCTGGGCCGGAGAGAGGAATACGACGTGCT GGATAAGAGGCGCGGCAGAGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCACGACGGA AAAACCCCCAGGAGGGGCTGTATAATGAACTGCAGAAGGACAAAATGGCCG AGGCTTACAGCGAAATCGGGATGAAGGGAGAGAGAAGGCGCGGAAAAGGC CACGATGGACTGTATCAGGGCCTGAGCACTGCCACCAAGGACACCTACGAT GCTCTGCACATGCAGGCACTGCCACCCAGGTGA
SE Q I D N	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGKRYFDYWGQGM TVTVSSGGGSSGGGSSGGGSSSYEL TQP PSASGTPGQRTISCSGGSSNIGSNT VNWFRQLPGTAPKLLVYFNNQRPSG VPDR FSGSKSGTSASLAIGGLQSDDEADY YCVAWDDSLNAPVFGGGTKVTVLES KYG

O: 25	PPCPPCFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
SE Q I D N O: 26	ATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCCATCCCGCCT TCCTGCTGATTCCCTGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACA GCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGC AGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGG GTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGA AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA AATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGG AAAGCGATACTTTGACTACTGGGGCCAGGGGACAATGGTCACCGTCTCGAG TGGTGGGGGGGGCAGCGGTGGTGGAGGCTCTGGTGGAGGAGGGAGCTCCTA TGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCAC CATCTCTTGTCTGGAGGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAACTGG TTCCGGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCAAACTCCTCGTTTATTTAATAATC AGCGACCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTC GGCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGACTATTAC TGTGTAGCATGGGATGACTCTCTGAATGCTCCGGTGTTCGGCGGAGGGACCA AGGTCACCGTCCTAGAGAGCAAATATGGACCACCATGCCCTCCATGTCCTTT TTGGGTCCTGGTGGTCGTGGGAGGCGTGCTGGCATGTTATTCTCTGCTGGTC ACAGTGGCTTTCATCATCTTCTGGGTCAAGCGAGGCCGGAAGAAACTGCTGT ACATCTTCAAACAGCCTTTTATGCGCCCAGTGCAGACAACCTCAGGAGGAAG ACGGCTGCTCTTGTTCGGTTCCTCCGAGGAAGAGGAAGGGGGATGTGAGCTGC GCGTGAAGTTTTCTCGAAGTGCCGATGCTCCTGCATATCAGCAGGGACAGAA CCAGCTGTACAACGAGCTGAATCTGGGCCGGAGAGAGGAATACGACGTGCT GGATAAGAGGCGCGGCAGAGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCACGACGGA AAAACCCCCAGGAGGGGCTGTATAATGAACTGCAGAAGGACAAAATGGCCG AGGCTTACAGCGAAATCGGGATGAAGGGAGAGAGAAGGCGCGGAAAAGGC CACGATGGACTGTATCAGGGCCTGAGCACTGCCACCAAGGACACCTACGAT GCTCTGCACATGCAGGCACTGCCACCCAGG
SE Q I D	EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKRYFDYW GQGTMTVSS

N O: 27	
SE Q I D N O: 28	SYELTQPPSASGTPGQRTISCSGGSSNIGSNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNNQR PSGVPDRFSGSKSGTSASLAIGGLQSDDEADYYCVAWDDSLNAPVFGGGTKVT VL
SE Q I D N O: 29	EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK GKRYFDYW GQGMVTVSS
SE Q I D N O: 30	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGGSSDIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYYNNQR PSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDRMYS PVFGGGTKLTV L
SE Q I D N O: 31	DVVMTQSPLSLPVTGPASISCRSSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYK VSNRFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADVGVYYCSQNTHPPTFGGQTKL EIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTDYEM HWVRQAPGQGLEWMGALDPKTGDTAYSQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSL TSED TAVYYCTRFYSYTYWGQGLVTVSS
SE Q I D N O: 32	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGLHWVRQAPGKGLEWVA AISY DGSKKYYADSVKGRLTISRDN SKNTLYLQMNSLRPDDTALYFCARGWFVEPLS WGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSNI GSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDE ADYYCAA WDDSLNGYVFGTGTKLTVL

SE	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCC
Q I	CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGA
D	GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTA
N	GTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA
O:	CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT
33	GAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGAAAGCGATACTT TGACTACTGGGGCCAGGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGTGGTGGGGGGGG CAGCGGTGGTGGAGGCTCTGGTGGAGGAGGGAGCTCCTATGAGCTGACTCA GCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCT GGAGGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAACTGGTTCCGGCAGCTC CCAGGAACGGCCCCAACTCCTCGTTTATTTAATAATCAGCGACCCTCAG GGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCGGCCTCCCTGGC CATCGGTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGACTATTACTGTGTAGCATGG GATGACTCTCTGAATGCTCCGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCC TA
SE	GAGGTCCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAGGAAGT
Q I	CTGCGACTGTCATGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTTCAGCTCCTATGCAATGA
D	GCTGGGTGCGACAGGCACCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCCGCTATCT
N	CCGGCTCTGGAGGCTCTACTTACTATGCAGACAGTGTGAAGGGGCGGTTAC
O:	AATCTCCAGAGATAACTCTAAGAACACTCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTG
34	AGAGCTGAGGACACCGCAGTGTACTATTGCGCCAAGGGCAAAGGTACTTT GATTATTGGGGACAGGGCACTATGGTGACCGTCTCTAGTGGAGGAGGAGGA AGCGGAGGAGGAGGATCCGGCGGAGGAGGCAGTCAGTCAGTGCTGACACA GCCACCTAGCGCCTCCGGAACCCAGGACAGCGGGTCACAATCTCTTGTAGT GGGGGATCAAGCGACATTGGGAGCAACACCGTGAATTGGTATCAGCAGCTG CCTGGAACAGCTCCAAAGCTGCTGATCTACTATAACAATCAGAGGCCCTCCG GCGTCCCTGATCGTTCTCAGGCAGCAAATCCGGGACTTCTGCAAGTCTGGC CATTAGTGGCCTGCAGTCAGAGGACGAAGCCGATTACTATTGTGCTACCTGG GACGATAGGATGTACTCTCCCGTGTTCGGCGGGGGAACAAAGCTGACTGTCC TG
SE	GATGTCGTGATGACGCAGAGCCCTCTCTCTTCCCGTTACCCCTGGTGAAC
Q I	CCGCATCAATAAGTTGCCGCTCCAGTCAATCACTTGTACATTCAAATCGCAA
D	TACCTACCTGCACTGGTATTTGCAGAAGCCGGGACAATCCCCTCAATTGTTG
N	ATATATAAGGTATCCAATCGCTTTTCTGGAGTTCCTGATAGATTCAGCGGAT

O: 35	CCGGGTCTGGTACTGATTTCACTCTGAAAATATCCAGGGTCTGAAGCTGAGGACGTAGGCGTATATTATTGCTCTCAGAACACGCATGTCCC GCCGACTTTCCGGC CAGGGCACTAACTTGAGATCAAGGGTGGGGGGGGCAGCGGTGGTGGAGGC TCTGGTGGAGGAGGGAGCCAGGTCCAACCTCGTTCAAAGTGGCGCAGAGGTC AAAAAGCCAGGCGCGAGCGTTAAAGTATCATGTAAGGCCAGCGGTTATACT TTCACTGATTATGAAATGCACTGGGTGCGACAAGCCCCGGGCAAGGTCTTG AGTGGATGGGTGCACTTGATCCAAAACTGGGGATACTGCCTATAGCCAGA AATTCAAAGGGCGCGTCACACTCACTGCCGACAAAAGTACGAGCACAGCTT ATATGGAATTGAGTTCCTGACGAGCGAGGATACGGCAGTTTATTACTGTAC GCGCTTCTACTCTTACACTTATTGGGGGCAAGGCACTTTGGTTACTGTGTCCT CT
SE Q I D N O: 36	CAGGTCCAGCTTGTGCAAAGCGGAGGAGGAGTGGTACAGCCTGGCCGCTCT TTGAGACTGTCTTGTGCGGCCAGTGGATTTACATTCTTCTTATGGGTTGCA TTGGGTCAGACAAGCACCGGGCAAAGGATTGGAATGGGTGCGCGGCCATTAG CTATGATGGCTCAAAGAAATATTATGCCGATTCCGTAAAAGGGAGGTTGAC AATAAGCCGGGATAACAGCAAGAACACTTTGTATCTTCAGATGAATAGCCTC CGACCGGACGACACGGCACTGTATTTTTGCGCACGCGGGTGGTTTGTAGAAC CCCTGAGTTGGGGACAAGGTA CTCTTGTACGGTATCTTCTGGCGGAGGTGG GAGTGGTGGGGGTGGCAGTGGCGGGGGTGGGTACAAAAGCGTGCTTACACA ACCTCCTTCTGCGAGCGGA ACTCCGGGACAACGGGTACGATTTTCATGCTCC GGCTCAAGTAGCAATATAGGATCAAATACAGTGAATTGGTATCAACA ACTC CCTGGCACAGCGCCCAAGCTGCTGATCTACTCTAATAACCAGAGGCCGAGTG GTGTGCCAGATAGGTTCA GTGGCTCTAAATCAGGTA CTAGCGCGAGCCTCGC CATTTCAGGACTTCAATCAGAGGATGAAGCGGACTACTACTGTGCCGCGTGG GATGATTCACTTAATGGATATGTTTTTCGGGACCGGAACAAAATTGACGGTAT TG
SE Q I D N O: 37	GFTFSSYAMS
SE Q I	AISGSGGSTYYADSVKG

D N O: 38	
SE Q I D N O: 39	GKRYFDY
SE Q I D N O: 40	SGGSSNIGSNTVN
SE Q I D N O: 41	FNNQRPS
SE Q I D N O: 42	VAWDDSLNAPV
SE Q I D N O: 43	SGGSSDIGSNTVN

SE Q I D N O: 44	YNNQRPS
SE Q I D N O: 45	ATWDDRMYSVP
SE Q I D N O: 46	ATGCGGAGCAAAGAAAGCGAGGTGTTCTACGAGCTGGCCCACCAACTGCCT CTGCCTCACAATGTGTCCAGCCACCTGGATAAGGCCAGCGTGATGAGACTGA CCATCAGCTACCTGAGAGTGCGGAAGCTGCTGGATGCCGGCGATCTGGACA TCGAGGACGATATGAAGGCCAGATGAACTGCTTCTACCTGAAGGCCCTGG ACGGCTTCGTGATGGTGCTGACCGATGACGGCGACATGATCTACATCAGCGA CAACGTGAACAAGTACATGGGGCTGACCCAGTTCGAGCTGACAGGCCACAG CGTGTTGACTTCACACACCCCTGCGACCACGAAGAGATGAGAGAGATGCT GACCCACCGGAACGGCCTGGTCAAGAAGGGCAAAGAGCAGAATACCCAGC GGTCATTCTTCTGCGGATGAAGTGCACCCTGACCAGCAGGGGCAGAACCAT GAACATCAAGAGCGCCACATGGAAGGTGCTGCACTGCACCGGACACATCCA CGTGTACGACACCAACAGCAACCAGCCTCAGTGCGGCTACAAGAAACCTCC TATGACCTGCCTGGTGCTGATCTGCGAGCCATTCCTCATCCTAGCAACATC GAGATCCCTCTGGACAGCAAGACCTTCTGAGCAGACACAGCCTGGACATG AAGTTCAGCTACTGCGACGAGCGGATCACCGAGCTGATGGGCTATGAGCCT GAAGAAGTCTGGGCCCGCAGCATCTACGAGTACTATCACGCCCTGGACAGC GACCACCTGACCAAGACACACCACGACATGTTACCAAGGGCCAAGTGACC ACCGGCCAGTACAGAATGCTGGCCAAGCGCGGAGGCTACGTGTGGGTTGAA ACACAGGCCACCGTGATCTACAACACCAAGAACTCCCAGCCACAGTGCATC GTGTGCGTGAAGTACGTGGTGTCCGGCATCATCCAGCACGACCTGATCTTCA GCCTGCAGCAGACCGAGTGCGTGCTGAAGCCTGTGGAAAGCAGCGACATGA AGATGACCCAGCTGTTTACCAAGGTGGAATCCGAGGACACCAGCAGCCTGT TCGACAAG

SE	MRSKESEV FYELAHQLPLPHNVSSHLDKASVMRLTISYLRVRKLLDAGDLIED
Q I	DMKAQMNC FYLKALDGFVMVL TDDGDMYISDNVNKYMGLTQFELTGHSVFD
D	FTHPCDHEEMREMLTHRNGLVKKGKEQNTQRSFFLRMKCTLT SRGRTMNIKSA
N	TWKVLHCTGHIHVYDTNSNQPCGYKKPPMTCLVLICEPIPHPSNIEIPLDSKTFL
O:	SRHSLDMKF SYCDERITELMGYEPEELLGRSIYEYYHALDS DHLT KTHHDMFTK
47	GQVTTGQYRMLAKRGGYVWVETQATVIYNTKNSQPQCIVCVNYVVSGIIQHDL
	IFSLQQTECVLKPVESSDMKMTQLFTKVESED TSSLFDKIYNTKNSQPQCIVCVN
	YVVSGIIQHDLIFSLQQTECVLKPVESSDMKMTQLFTKVESED TSSLFDK

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая
а) химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит антигенсвязывающий домен, специфический в отношении антигена клеточной поверхности; и
б) армирующую молекулу, где армирующая молекула противодействует иммуносупрессии клетки в микроокружении опухоли при ее экспрессии на поверхности клетки.
2. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 1, где антигенсвязывающий домен содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
3. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 2, где антигенсвязывающий домен представляет собой Fab или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).
4. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 3, где антигенсвязывающий домен представляет собой scFv, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34.
5. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, дополнительно кодирующая трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен.
6. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 5, где трансмембранный домен предусматривает трансмембранный домен CD28.
7. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 5, где костимулирующий домен предусматривает один или несколько из костимулирующих доменов CD28, 4-1BB, CD3-дзета, OX-40, ICOS, CD27, GITR и MyD88/CD40.
8. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 5, где костимулирующий домен предусматривает один или несколько из костимулирующих доменов CD28, 4-1BB и CD3-дзета.
9. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 5, где сигнальный домен содержит последовательность, кодирующую сигнальный пептид CSFR2.
10. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по любому из предыдущих пунктов, кодирующая последовательность, дополнительно содержащую шарнирный/спейсерный домен.
11. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 10, где шарнирный/спейсерный домен представляет собой шарнир/спейсер IgG4P.

12. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 1, где армирующая молекула представляет собой доминантно-негативный индуцируемый гипоксией фактор 1 α (HIF-1 α) (HIF1 α DN).

13. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 12, где HIF1 α DN кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 46.

14. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 1, где антиген клеточной поверхности предусматривает один или несколько из CD10, CD16, CD19, CD20, CD22, CD123, CD30, CD34, CD47, CD56, CD80, CD86, CD117, CD133, CD138, CD171, CD37, CD38, CD5, CD7, CD79, 5T4, AFP, AXL, BCMA, B7H3, CDH3, CDH6, CLDN6, CLDN18, CLL-1, CMV, CS1, DLL3, DR5, FBP, GD2, GFRA1, GPA33, GPC3, IL-1-RAP, IL17RA, ITGB7, EBV, ERBB1/EGFR, ERBB2/Her-2, ERBB3, ERBB4, cMet, EGFR vIII, FAP, FOLR1, CEA, CEACAM6, EphA2, HSV-1, HSV-2, HTLV, HPV16-E6, HPV16-E7, IL13Ra2, цепи Igk, LGR5, LMP1, LeY, LRP8, MG7, MR1, NRCAM, PMEL, лиганда NKG2D, PRAME, PRLR, PVR, ROR1, ROR2, SSX2, STEAP1, STEAP2, TACI, TIM3, TRBC1, VEGFR-2, EPCAM1, VCAM1, VIPR2, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, мезотелина (MSLN), MUC1, MUC16, NY-ESO-1, WT1, PDL1, CAIX, CD70, PSMA и PSCA.

15. Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит антигенсвязывающий домен, специфический в отношении антигена клеточной поверхности, и армирующую молекулу, где последовательность нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO: 46.

16. Клетка, содержащая вектор по п. 15 или выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-14.

17. Клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), и армирующую молекулу HIF1 α DN, экспрессированную на поверхности клетки.

18. Клетка по п. 17, где CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, костимулирующий домен и сигнальный домен.

19. Клетка по п. 18, где антигенсвязывающий домен представляет собой Fab или одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv).

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

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

где VL содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 44, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 45; и армирующую молекулу HIF1 α DN.

21. Клетка по п. 20, где VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 29.

22. Клетка по пп. 20-21, где VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 30.

23. Клетка по любому из пп. 20-22, где армирующая молекула HIF1 α DN содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 47.

24. Клетка по любому из пп. 16-23, где клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), цитотоксического Т-лимфоцита (CTL) и регуляторной Т-клетки.

25. Способ лечения рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, клетки, при этом клетка содержит

- a) химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении антигена клеточной поверхности, и
- b) армирующую молекулу, где армирующая молекула противодействует иммуносупрессии клетки в опухолевом микроокружении рака.

26. Способ по п. 25, где антиген клеточной поверхности представляет собой один или несколько из CD10, CD16, CD19, CD20, CD22, CD123, CD30, CD34, CD47, CD56, CD80, CD86, CD117, CD133, CD138, CD171, CD37, CD38, CD5, CD7, CD79, 5T4, AFP, AXL, BCMA, B7H3, CDH3, CDH6, CLDN6, CLDN18, CLL-1, CMV, CS1, DLL3, DR5, FBP, GD2, GFRA1, GPA33, GPC3, IL-1-RAP, IL17RA, ITGB7, EBV, ERBB1/EGFR, ERBB2/Her-2, ERBB3, ERBB4, cMet, EGFR vIII, FAP, FOLR1, CEA, CEACAM6, EphA2, HSV-1, HSV-2, HTLV, HPV16-E6, HPV16-E7, IL13Ra2, цепи Igk, LGR5, LMP1, LeY, LRP8, MG7, MR1, NRCAM, PMEL, лиганда NKG2D, PRAME, PRLR, PVR, ROR1, ROR2, SSSX2, STEAP1, STEAP2, TACI, TIM3, TRBC1, VEGFR-2, EPCAM1, VCAM1, VIPR2, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, мезотелина (MSLN), MUC1, MUC16, NY-ESO-1, WT1, PDL1, CAIX, CD70, PSMA и PSCA.

27. Способ по п. 26, где армирующая молекула представляет собой армирующую молекулу HIF1 α DN.

28. Способ по п. 27, дополнительно включающий подавление роста опухоли, индуцирование регрессии опухоли и/или увеличение продолжительности выживания субъекта.

29. Способ по п. 25, где клетка представляет собой аутологичную клетку.

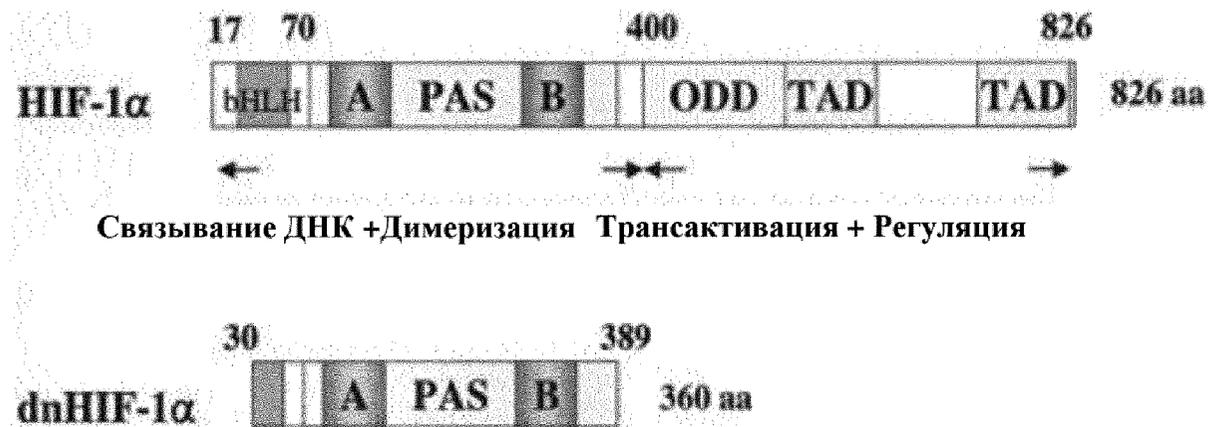
30. Способ по п. 29, где аутологичная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), цитотоксического Т-лимфоцита (CTL) и регуляторной Т-клетки.

31. Способ по любому из пп. 25-30, где рак представляет собой солидную опухоль.

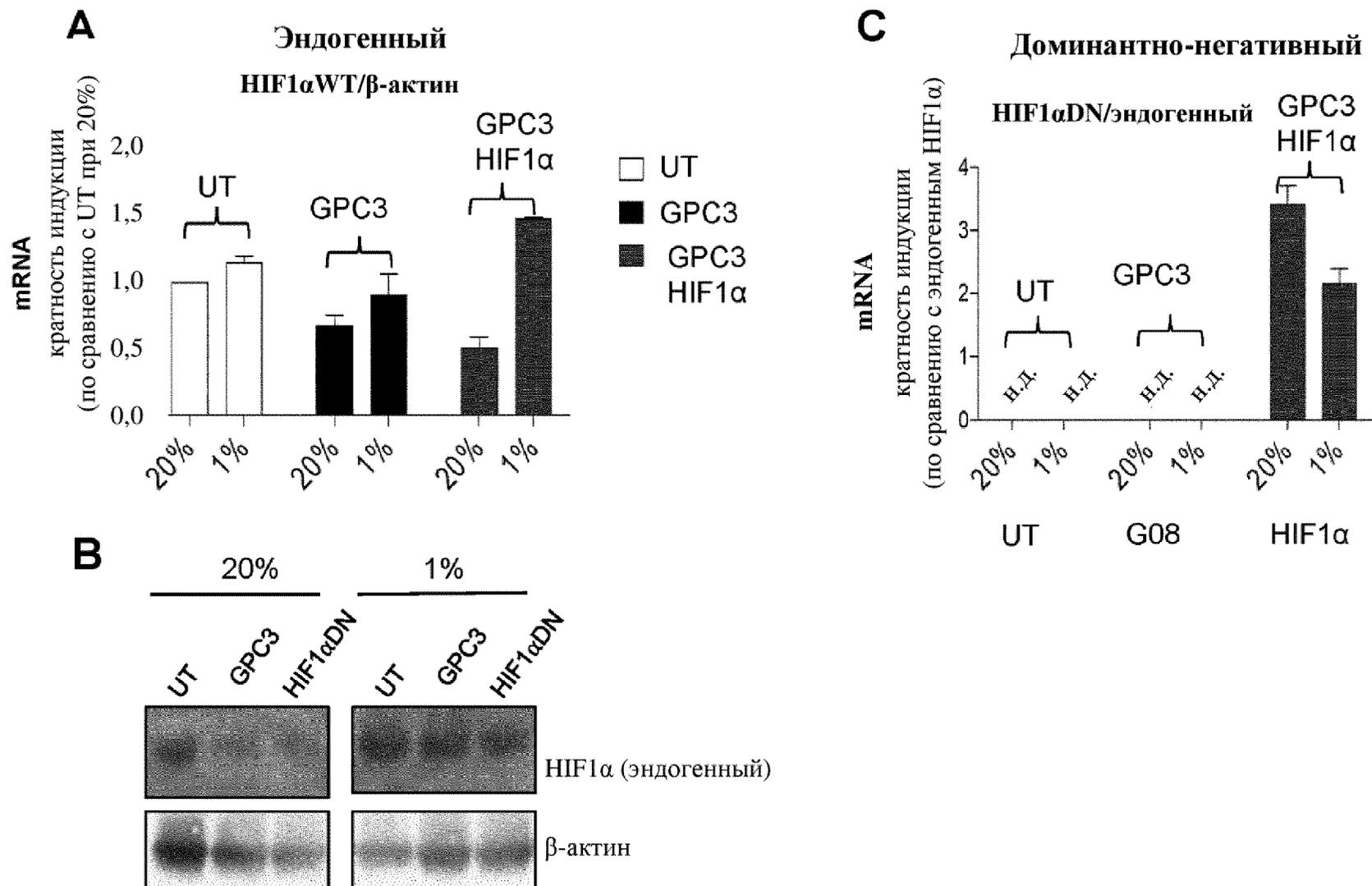
32. Способ по п. 31, где рак представляет собой гепатоцеллюлярную карциному, немелкоклеточный рак легкого, рак яичника и/или плоскоклеточную карциному легкого.

33. Способ по п. 32, где рак представляет собой гепатоцеллюлярную карциному.

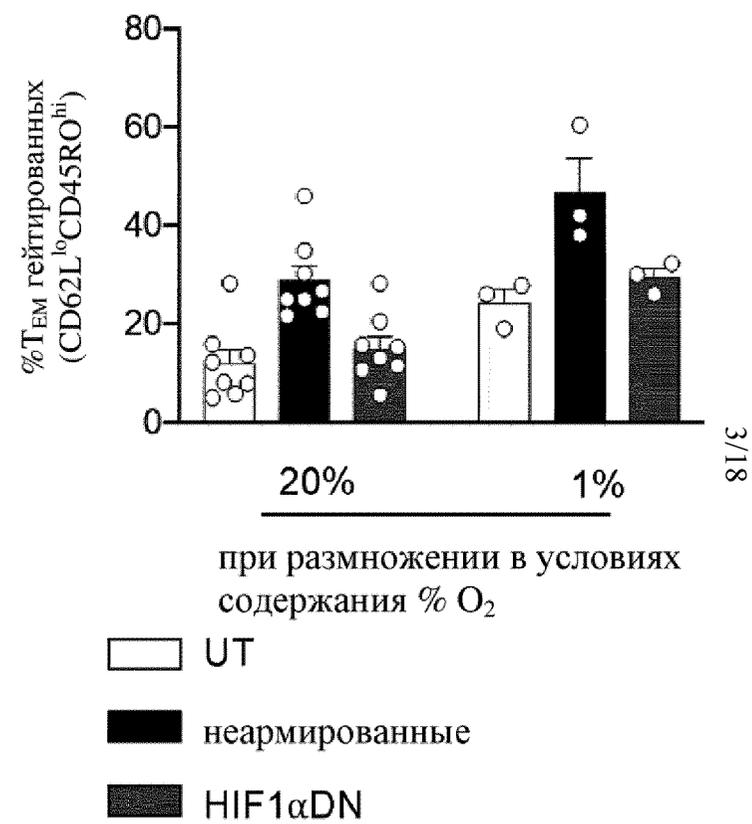
34. Способ по любому из пп. 26-33, дополнительно включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества противоракового антитела и/или химиотерапевтического компонента.



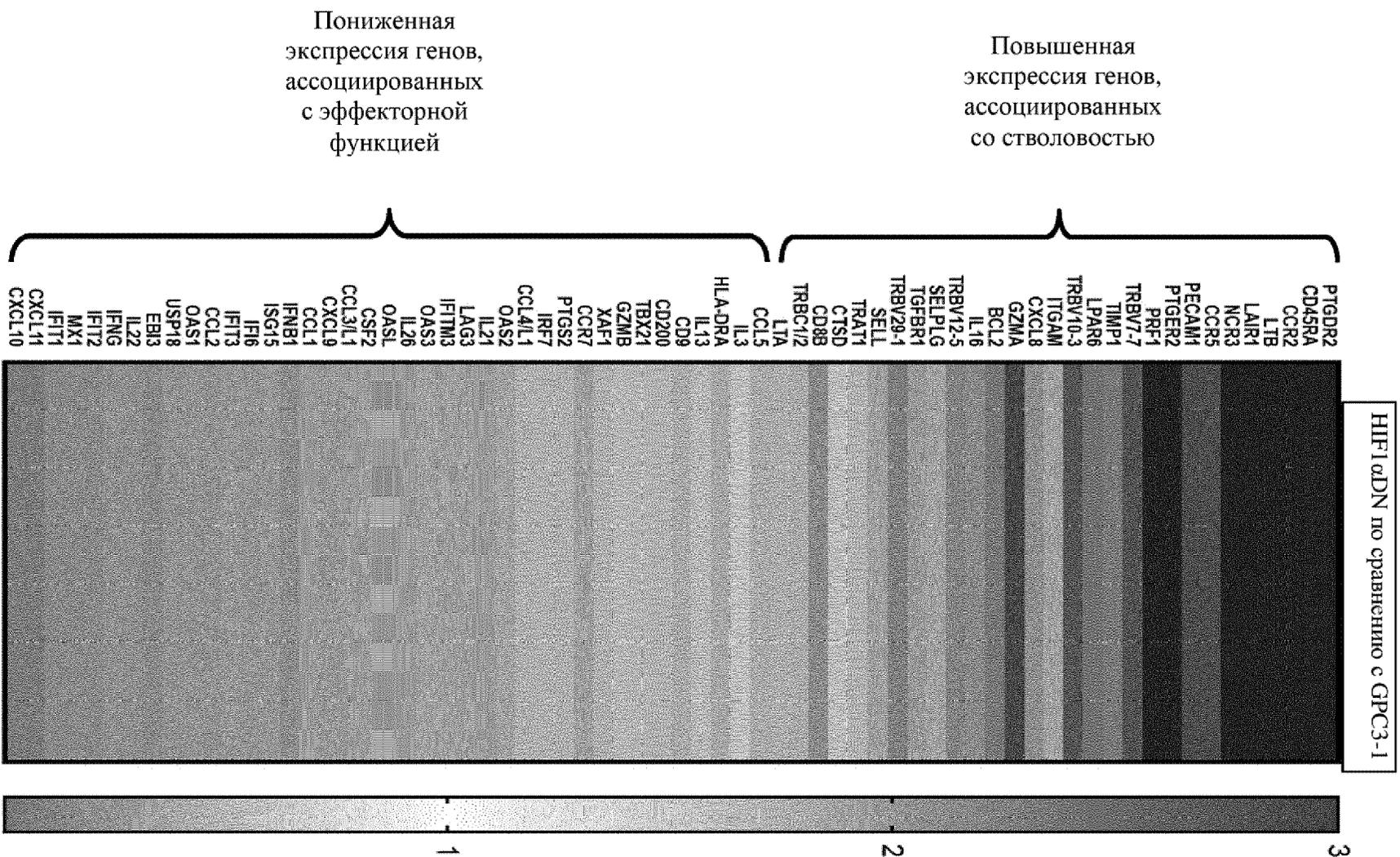
Фиг. 1



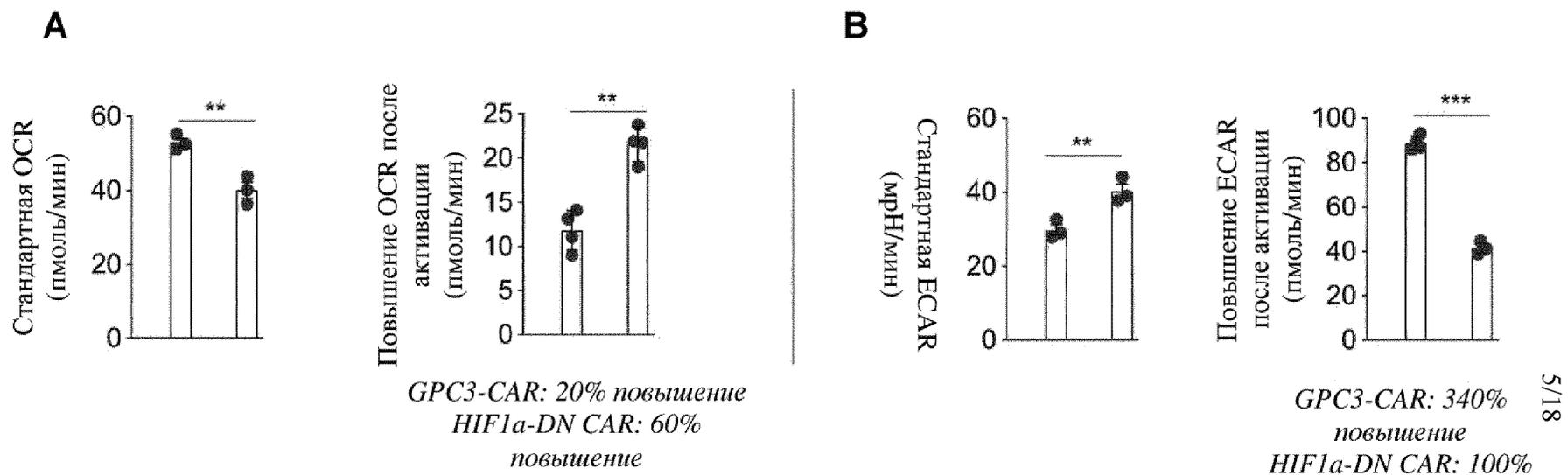
Фиг. 2



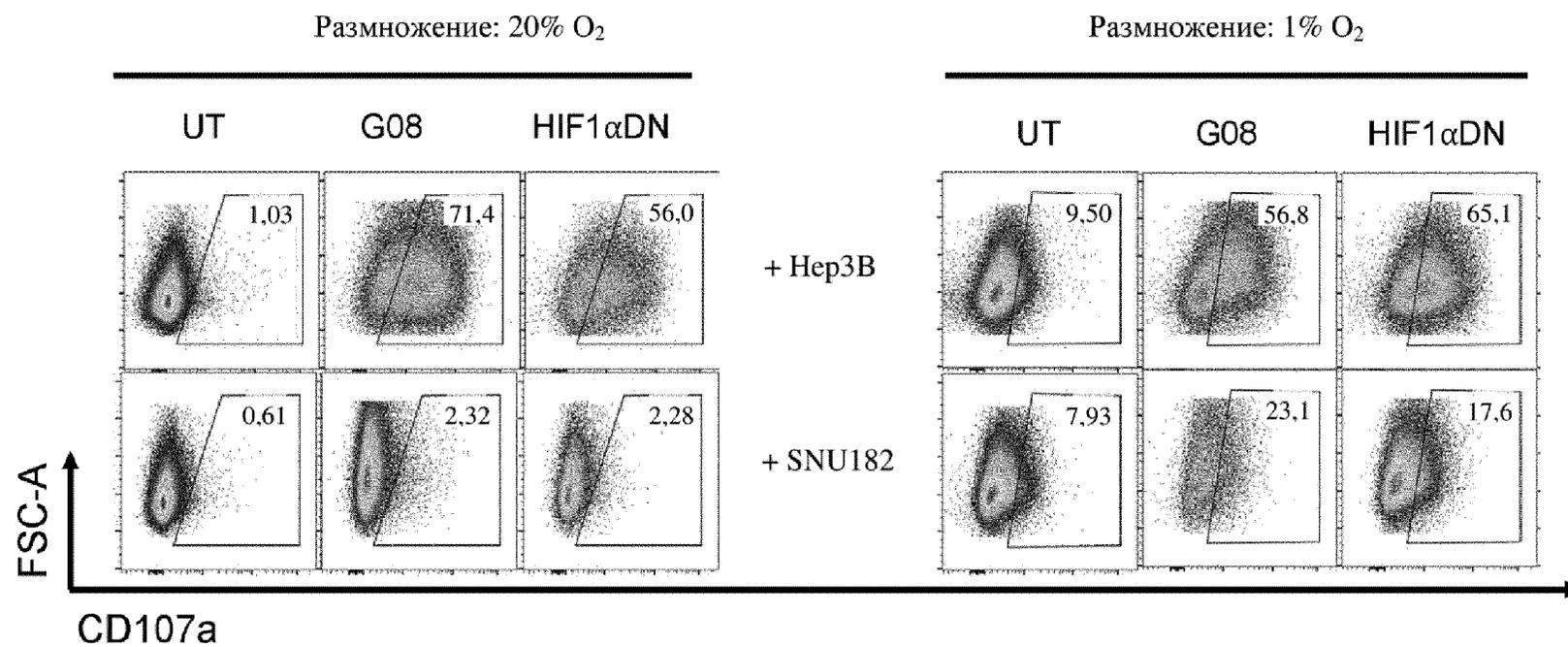
Фиг. 3



Фиг. 4



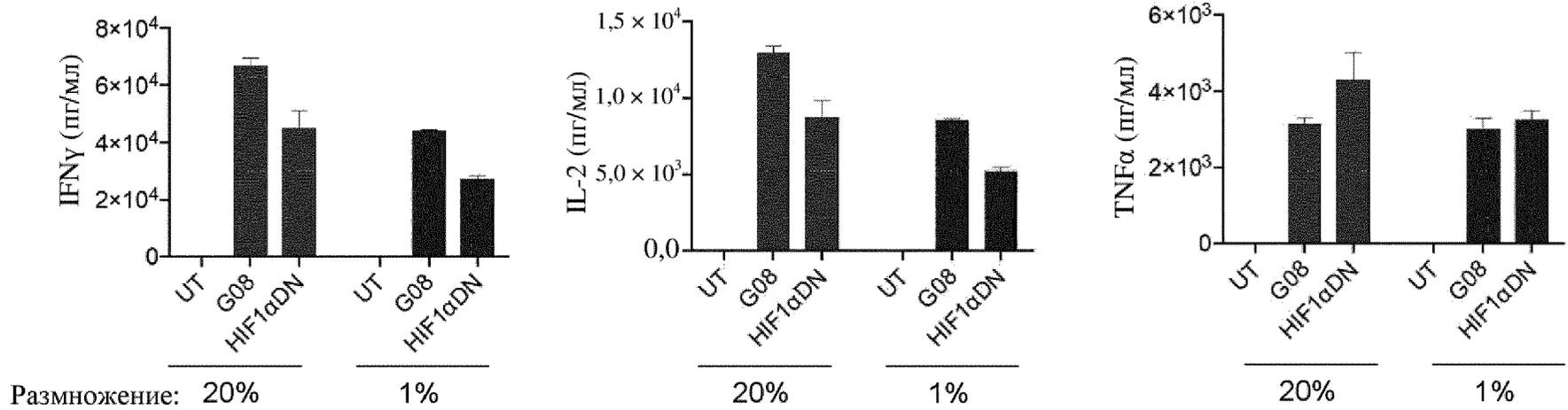
Фиг. 5



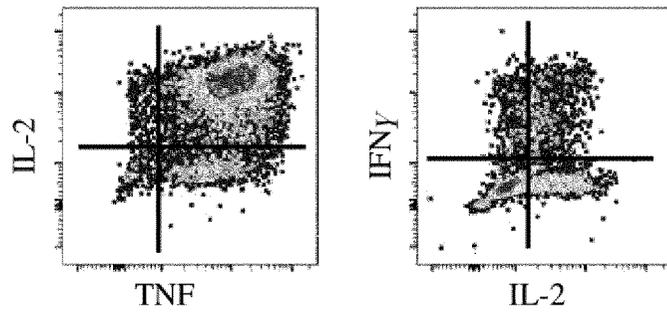
6

6/18

Фиг. 6

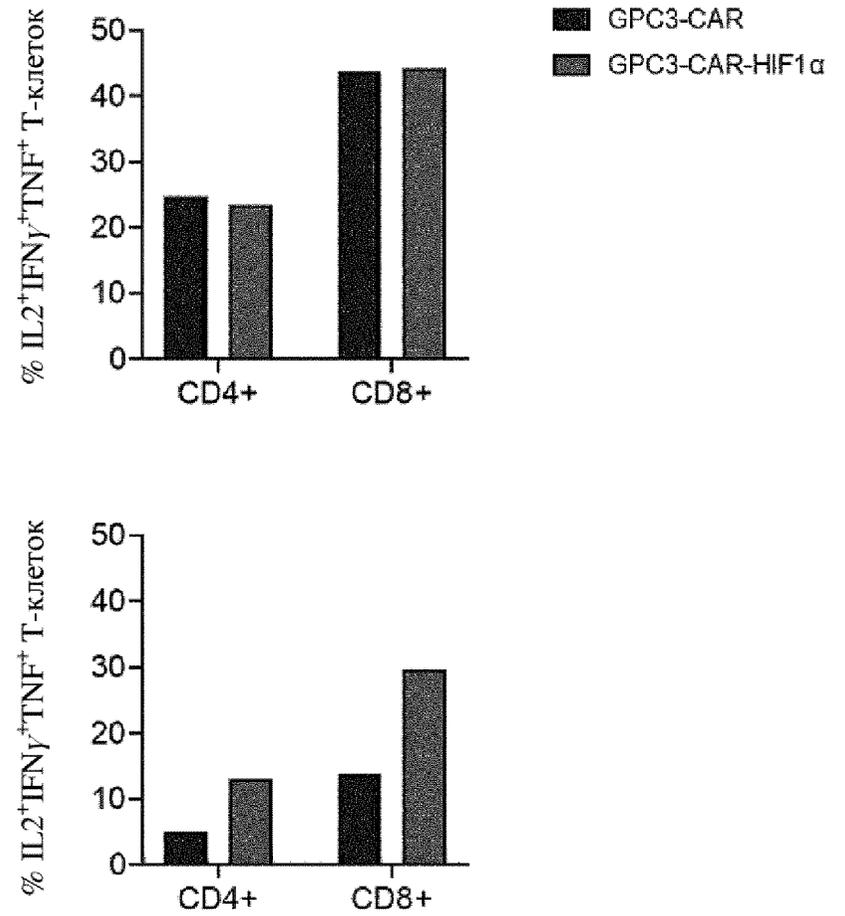


Фиг. 7

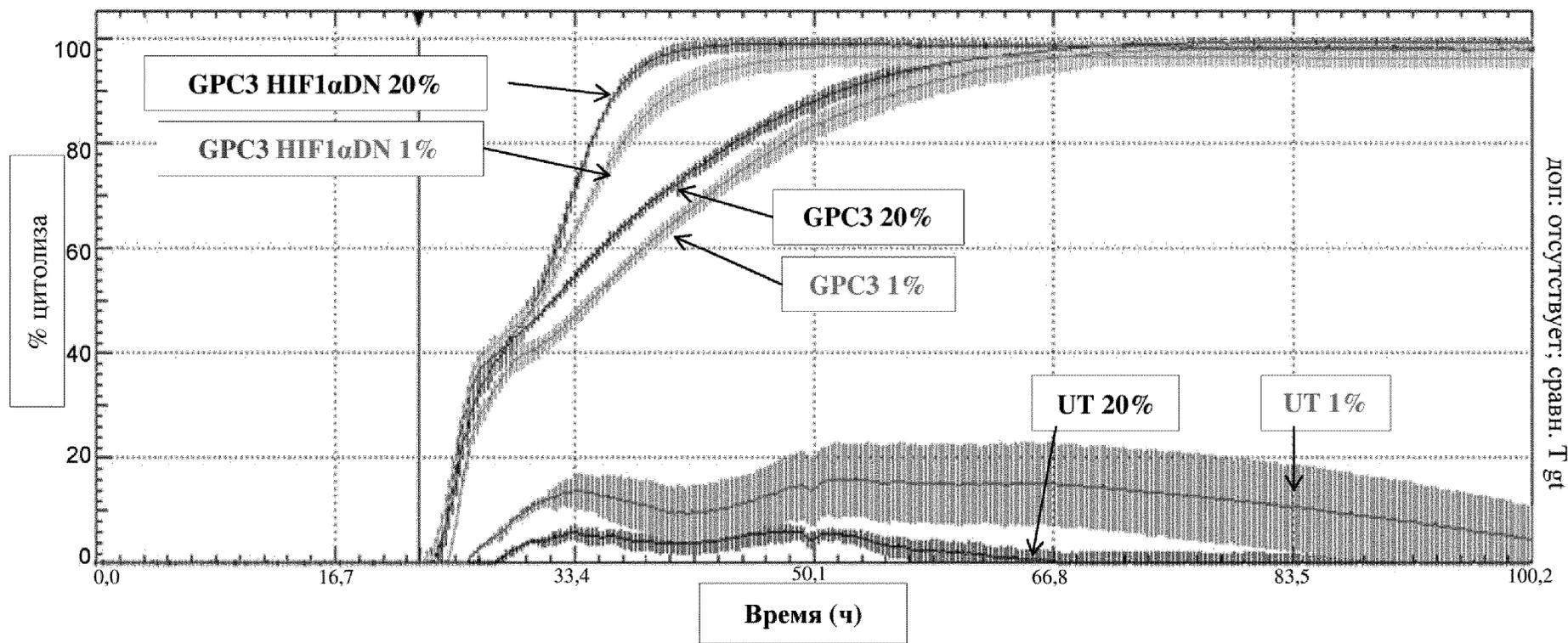


Нормальное содержание кислорода

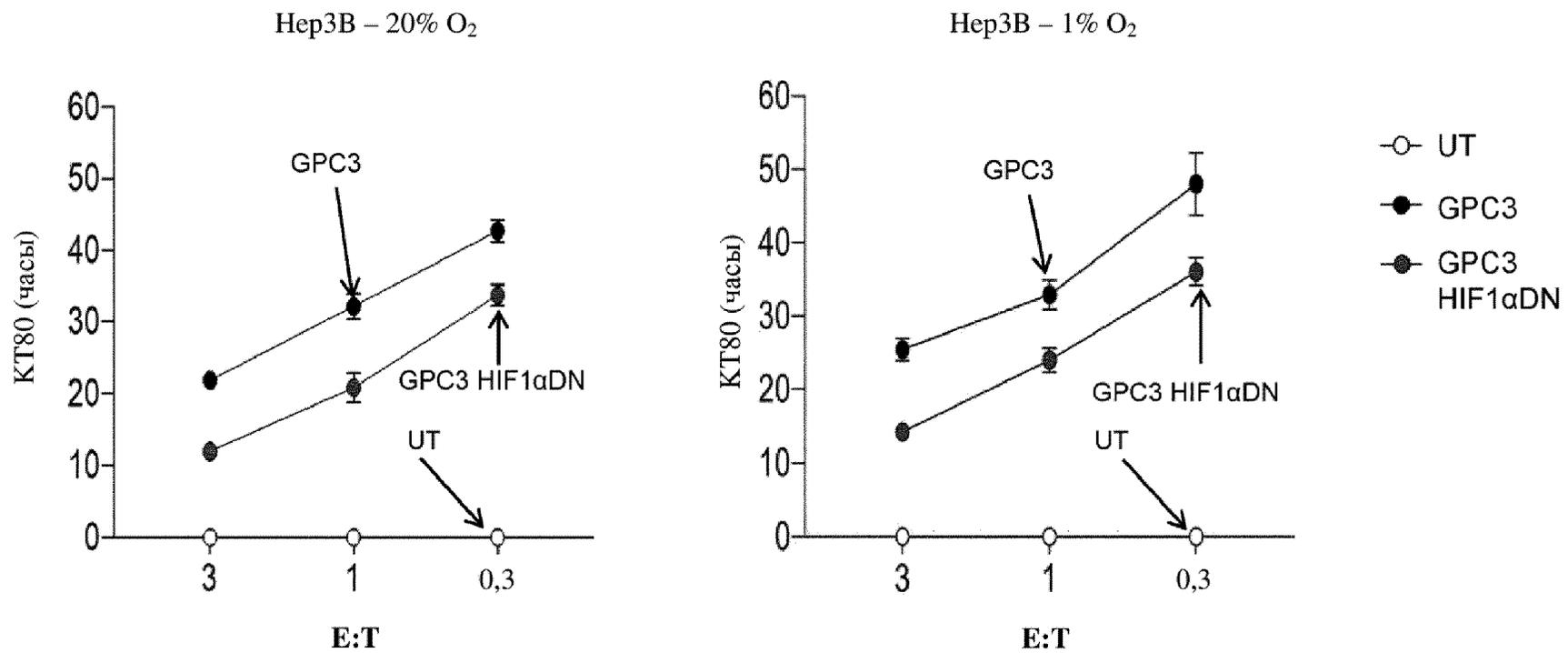
Гипоксия



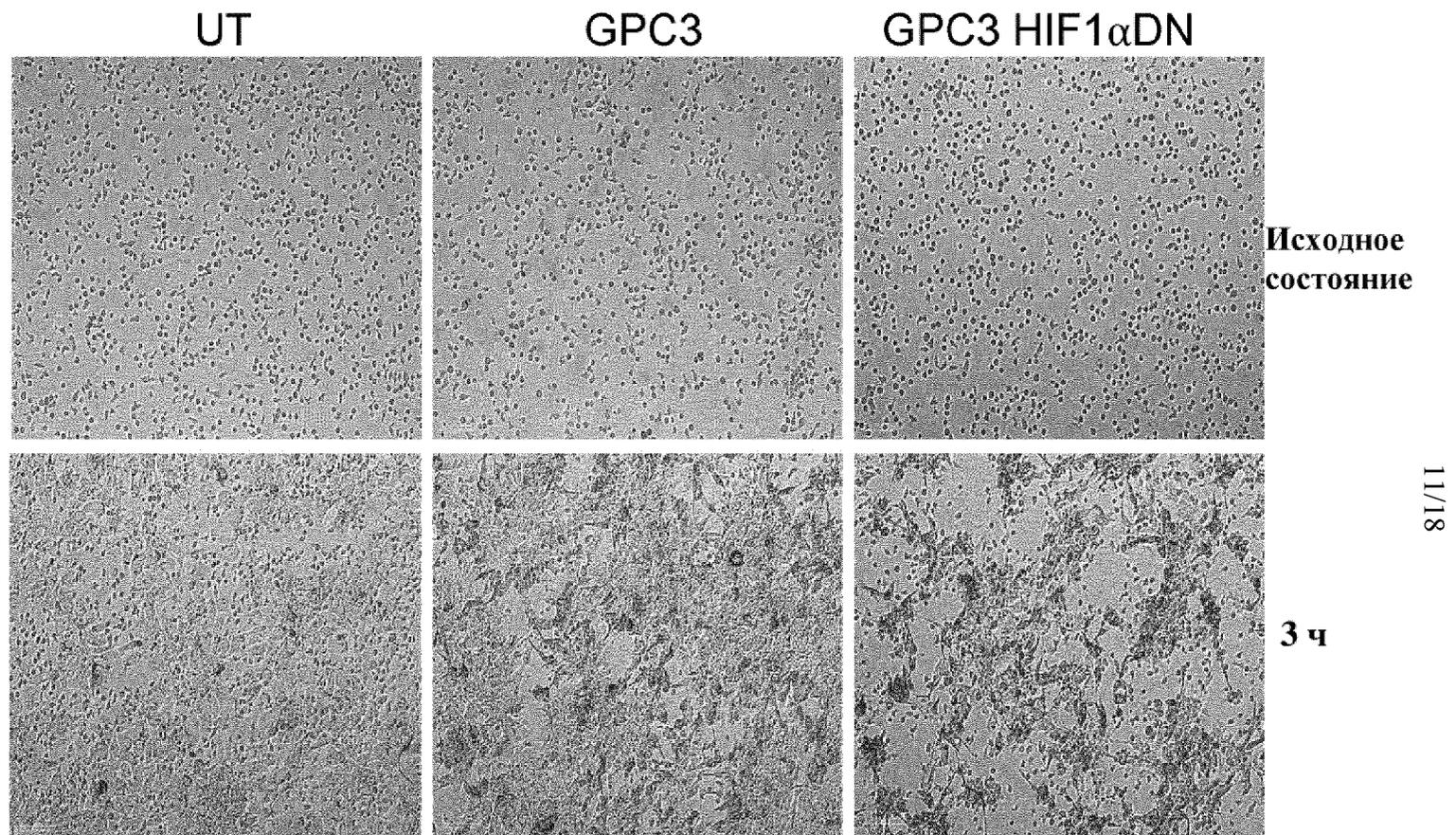
Фиг. 8



Фиг. 9

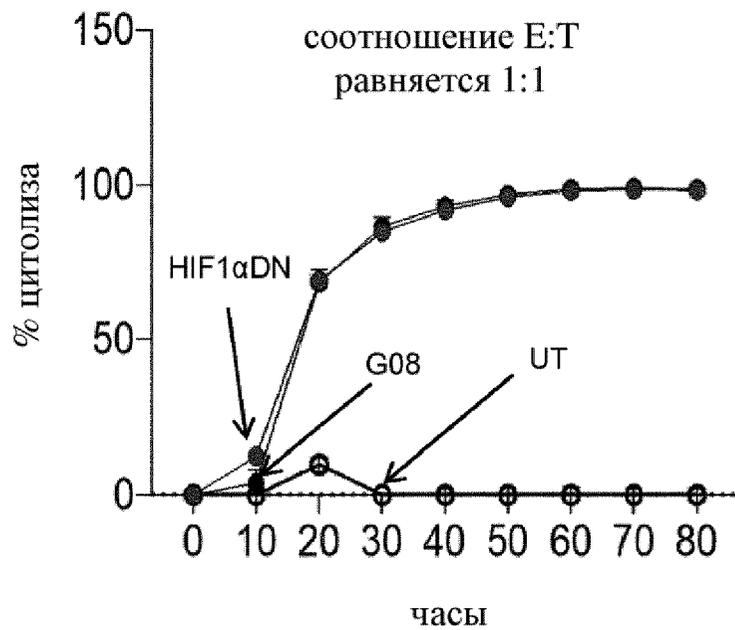


Фиг. 10

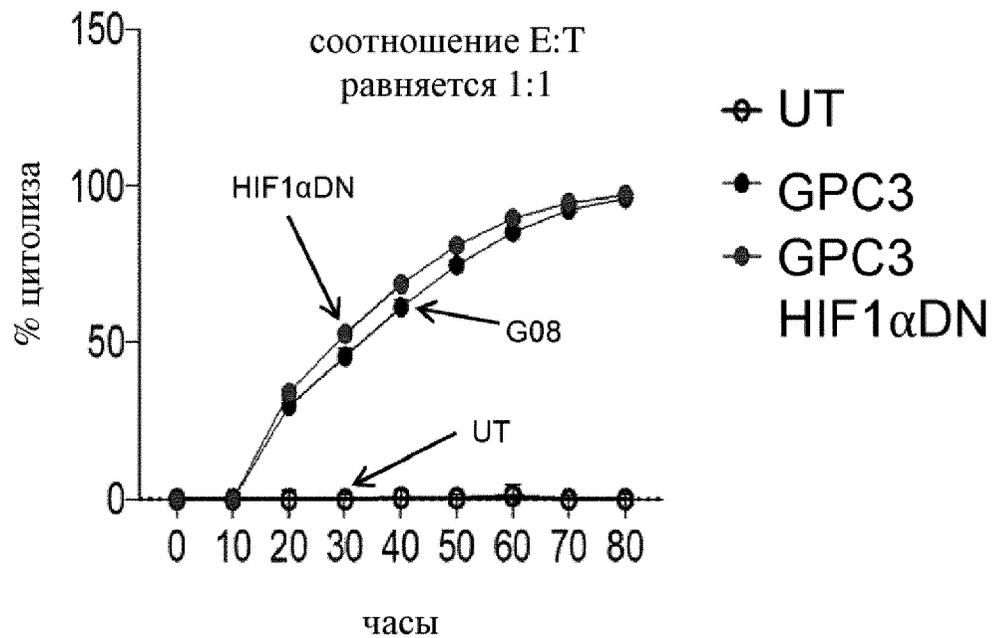


Фиг. 11

HUH7 при 20% O₂

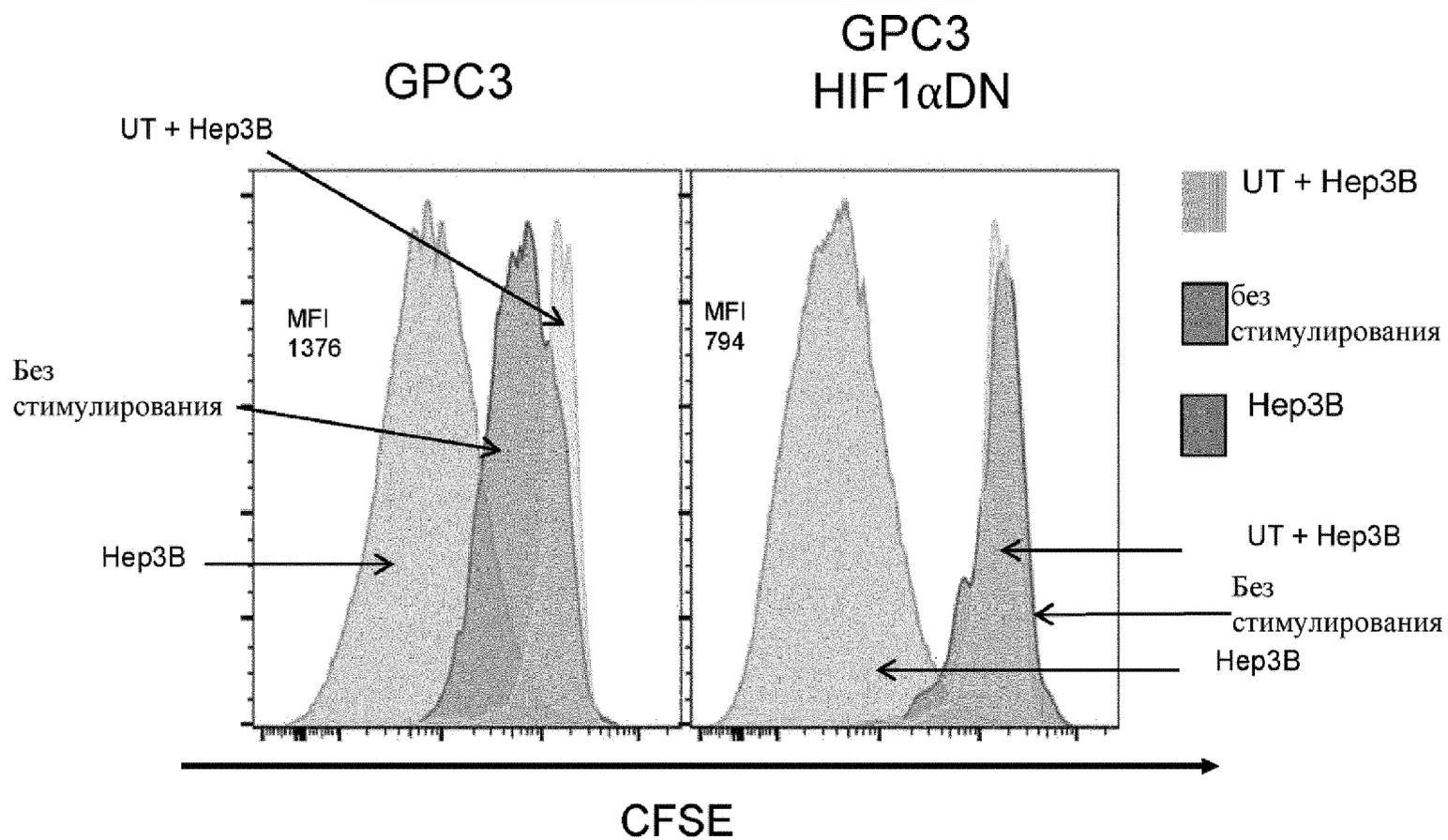


PLC-PRF15 при 20% O₂



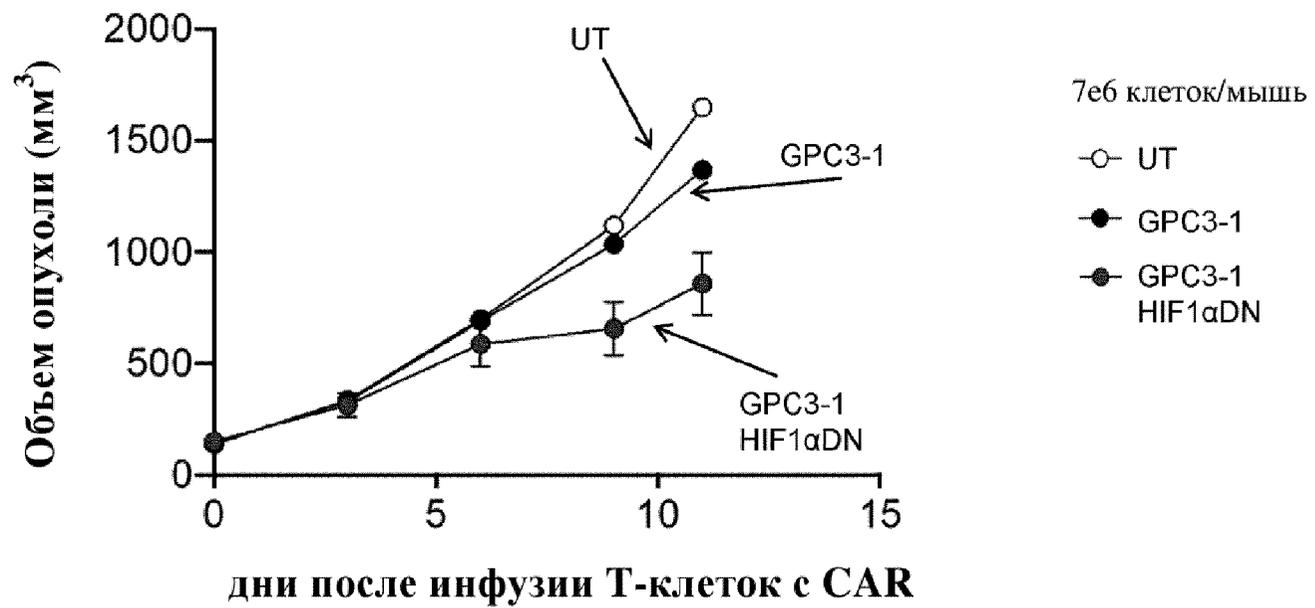
Фиг. 12

День 3; Гейтирование: CAR⁺ Т-клетки

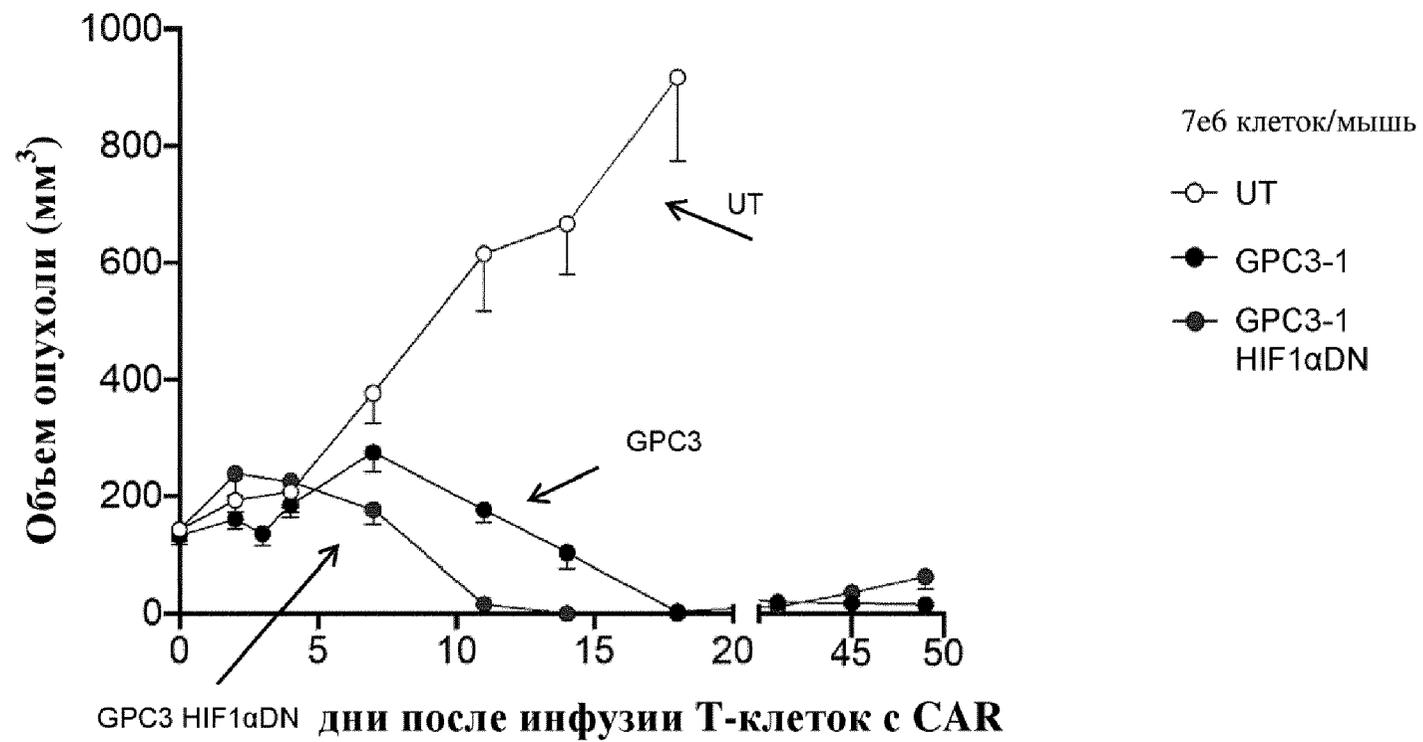


13/18

Фиг. 13

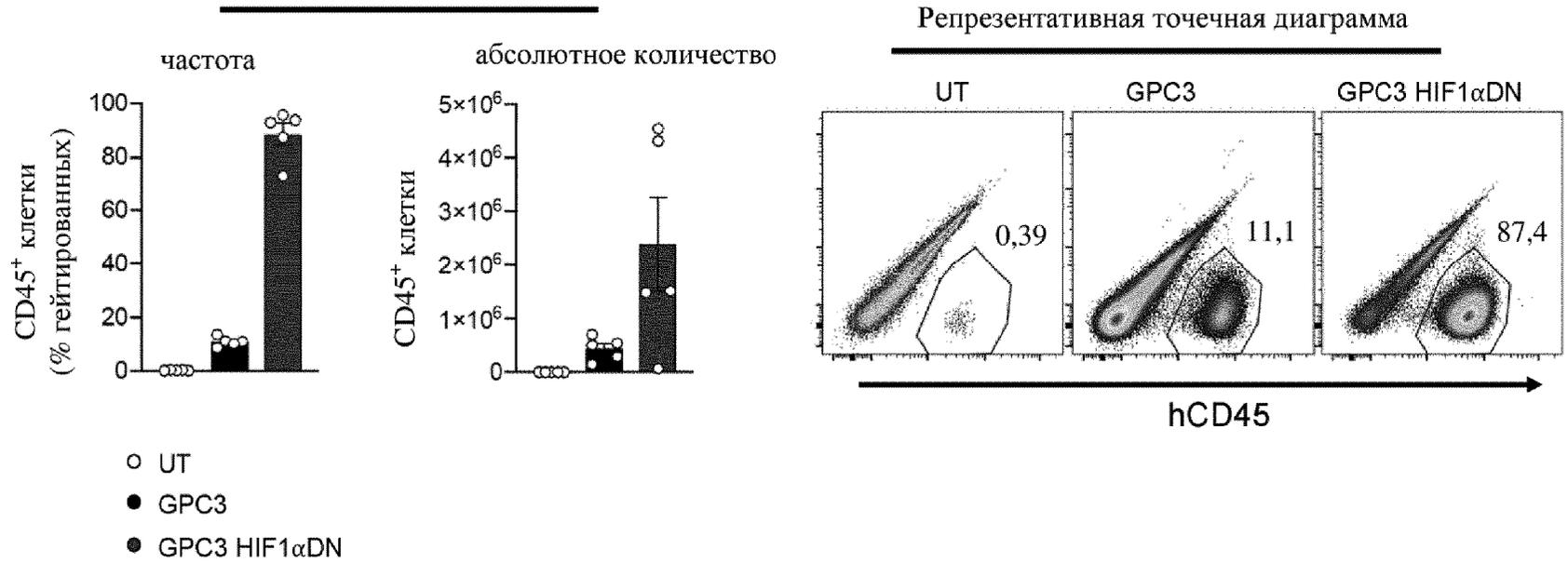


Фиг. 14

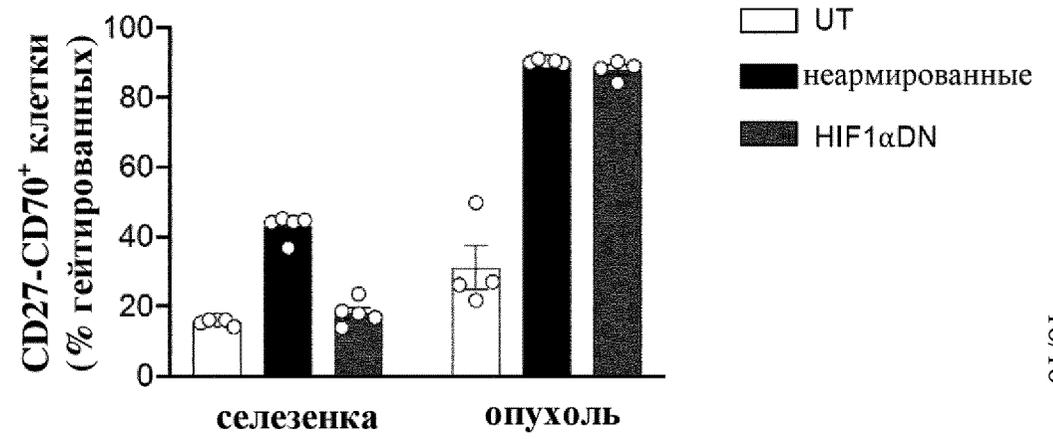


Фиг. 15

Опухоль – день 7 после инфузии Т-клеток



Фиг. 16



Фиг. 18