

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292971** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.01

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

(22) Дата подачи заявки
2021.04.23

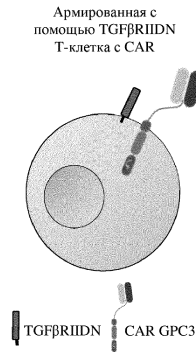
(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ПОМОЩЬЮ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ

(31) **63/014,831**
(32) **2020.04.24**
(33) **US**
(86) **PCT/EP2021/060622**
(87) **WO 2021/214270 2021.10.28**
(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.



202292971 A1

202292971 A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ПОМОЩЬЮ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0000] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия в формате ASCII, созданная 12 апреля 2021 г., имеет название CARTGPC(TGF)-WO-PCT_SL.txt и ее размер составляет 100812 байт.

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 размножения 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-МНС, углеводы или молекулы гликолипидов. Идеальные целевые антигены в больших количествах экспрессируются на опухолевых клетках, что дает возможность нацеливаться

на высокий процент раковых клеток. Идеальные целевые антигены-кандидаты также 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", взаимодействие Celgene[®] и bluebirdbio[®]) продемонстрировала многообещающие результаты в отношении рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломы. Более свежие данные свидетельствуют о том, что подход с CAR может быть эффективным против солидных опухолей. Терапия с использованием 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. Токсичные 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 обычным явлением острой токсичности, ассоциированной с Т-клетками с CAR. CRS возникает, когда лимфоциты сильно активируются и высвобождают избыточные количества воспалительных цитокинов. Случаи повышения содержания интерлейкина 2, интерлейкина 6, интерлейкина 1 бета, GM-CSF и/или С-реактивного белка в сыворотке крови иногда наблюдаются у пациентов с CRS при анализе этих факторов. CRS классифицируется по степени тяжести и диагностируется как одна из степеней 1-4 (от легкой до тяжелой), при этом более серьезные случаи клинически характеризуются высокой температурой, гипотензией, гипоксией и/или полиорганной токсичностью у пациента. В одном исследовании сообщалось, что у 92% пациентов с острым лимфоцитарным лейкозом, получавших лечение посредством терапии с использованием Т-клеток с CAR для CD19, наблюдался CRS, и у 50% данных пациентов развились симптомы 3-4 степени. (Fitzgerald *et al.*, *Crit Care Med.* 45(2): e124–e131 (2017)).

[0008] Другой проблемой для успешной иммунотерапии с использованием Т-клеток с CAR является иммуносупрессия, обусловленная характеристиками опухолевого микроокружения (TME) солидных опухолей. Например, трансформирующий фактор роста бета (TGF- β) представляет собой плеiotропный цитокин, вырабатываемый многими типами клеток в печени (например, синусоидальными эндотелиальными клетками печени, клетками Купфера, естественными клетками-киллерами (NK) внутри печени и т. д.) и в больших количествах в микроокружении рака. (Dahmani *et al.*, TGF- β in T Cell Biology: Implications for Cancer Immunotherapy. *Cancers* **2018**, *10*, 194, 1-21). TGF- β связывается с TGF β R2, который рекрутирует и фосфорилирует TGF β R1, который после фосфорилирования, в свою очередь, фосфорилирует SMAD, регулируемые рецептором (R-SMAD). Комплекс фосфорилированных SMAD с coSMAD перемещается в ядро для помощи в регуляции экспрессии генов. В контексте Т-клеток передача сигнала TGF- β подавляет эффективность терапии с использованием Т-клеток с CAR посредством подавления пролиферации, активации и эффекторных функций Т-клеток и посредством способствования дифференцировке регуляторных Т-клеток. Следовательно, связанная с TGF- β иммуносупрессия представляет собой значительную сложность, которую

необходимо преодолеть для получения эффективной и стойкой 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, исследователи недавно сообщили о модификации Т-клеток с CAR для секреции блокирующих PD-1 одноцепочечных переменных фрагментов (scFv), которые улучшали противоопухолевую активность Т-клеток с CAR в мышинных моделях PD-L1⁺ гематологических и солидных опухолей (Rafiq, S., Yeku, O., Jackson, H. *et al.* Targeted delivery of a PD-1-blocking scFv by CAR-T cells enhances anti-tumor efficacy *in vivo*. *Nat Biotechnol* **36**, 847–856 (2018)). Другие исследования демонстрировали эффективность армирования Т-клеток с помощью армирующей молекулы доминантно-негативного рецептора TGF- β типа 2 (TGF β RIIDN) для нейтрализации подавляющих эффектов TGF- β в отношении Т-клеток (Bollard *et al.*, Tumor-Specific T-Cells Engineered to Overcome Tumor Immune Evasion Induce Clinical Responses in Patients With Relapsed Hodgkin Lymphoma, *J Clin Oncol* **36**(11):1128-1139 (2018)). В настоящее время в по меньшей мере одном клиническом исследовании изучается эффективность армирования Т-клеток с CAR для PSMA с помощью армирующей молекулы для лечения кастрационно-резистентного рака предстательной железы (NCT03089203).

[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 (а) 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 TGF β RIIDN, 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 предусматривает антитело, Fab или scFv, содержащие переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), где VH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, и где VL содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 44, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 45; и армирующую молекулу TGF β RIIDN.

[0014] В еще одном аспекте в настоящем изобретении описан 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.

[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 по

настоящему изобретению и вместе с описанием служат для пояснения принципов и действия настоящего изобретения.

[0017] **Фиг. 1А - 1D. Профиль экспрессии генов TGFβ1 и TGFβ и развитие и выживаемость НСС. 1А.** Кратность изменения (\log_2) экспрессии гена TGFβ1 в нормальной солидной ткани (слева) и первичной солидной опухоли гепатоцеллюлярной карциномы (НСС, справа). **1В.** Кривые выживаемости (OS = общая выживаемость) при высокой экспрессии TGFβ1 по сравнению с низкой экспрессией TGFβ1 в НСС. **1С.** Кратность изменения (\log_2) передачи сигнала TGFβ в нормальной солидной ткани (слева) и солидной ткани опухоли (справа). **1D.** Кривые выживаемости при высокой передаче сигнала TGFβ по сравнению с низкой передачей сигнала.

[0018] **Фиг. 2А и 2В. Образцы НСС человека являются положительными в отношении TGFβ и передачи сигнала TGFβ.** Полуколичественная патологическая оценка TGF-β1 (**2А**) и фосфорилированного SMAD2 (pSMAD2) (**2В**) в образцах нормальной печени FFPE и НСС. Каждый круг представляет собой данные одной хирургической резекции. Интенсивность ИHC определяли следующим образом: оценка 0 - отрицательное окрашивание; оценка 1 - минимальное окрашивание; оценка 2 - умеренное окрашивание; оценка 3 - сильное окрашивание.

[0019] **Фиг. 3А и 3В. Армирование Т-клеток с CAR для GPC3 с помощью TGFβRIIDN.** Как предусмотрено в данном документе, считается, что армирование Т-клеток с CAR для GPC3 с помощью TGFβRIIDN будет обеспечивать устойчивость к TGFβ, приводя к улучшению эффекторной функции Т-клеток с CAR и контроля опухоли. **3А.** Схема опосредованной TGF-β иммуносупрессии неармированных Т-клеток с CAR (фигура, представленная в измененном виде, из Agrese et al, Current Protein & Peptide Science (2018) 19: 1172) **3В.** Диаграмма армированных Т-клеток с CAR, экспрессирующих CAR для GPC3 и армирующую молекулу TGFβRIIDN. В некоторых вариантах осуществления CAR и армирующую молекулу можно объединить с или отделить от CAR посредством спейсерного пептида на С-конце.

[0020] **Фиг. 4. Экспрессия TGFβRIIDN.** Проточный цитометрический анализ TGFβRII и CAR на поверхности неармированных и армированных Т-клеток с CAR.

[0021] **Фиг. 5. TGFβRIIDN подавляет передачу сигнала TGF-β в Т-клетках с CAR. 4В.** Анализ посредством вестерн-блоттинга фосфорилированного SMAD2/3 и общего SMAD 2/3 в нетрансдуцированных (UT), неармированных и армированных (TGFβRIIDN) Т-клетках с CAR после 0-45 минут воздействия rhTGFβ (1 нг/мл). β-Актин служит в качестве положительного контроля нагрузки для всех образцов.

[0022] **Фиг. 6А и 6В. Экспрессия TGF β RIIDN предупреждает индуцированное TGF- β подавление транскрипции эффекторных цитокинов.** Уровни mRNA (6А) *IL2* и *IFNG* (6В) в очищенных Т-клетках с CAR для GPC3, армированных с помощью TGF β RIIDN, и неармированных Т-клетках с CAR для GPC3, стимулированных в течение 6 часов с помощью указанной концентрации связанных на планшете рекомбинантных GPC3 и TGF- β 1. Данные объединены из двух независимых экспериментов.

[0023] **Фиг. 7А и 7В. TGF β RIIDN обеспечивает снижение опосредованной TGF- β дифференцировки Т-клеток с CAR для GPC3 до фенотипа T_{RM}.** 7А. Проточный цитометрический анализ опосредованной TGF- β дифференцировки Т-клеток с CAR для GPC3 в тканевые резидентные клетки памяти (T_{RM}) в отсутствие (левые графики рассеяния) и присутствии (правые графики рассеяния) TGF- β в неармированных (верхние графики рассеяния) и армированных (нижние графики рассеяния) Т-клетках с CAR для GPC3. Y-ось = экспрессия CD103; X-ось = экспрессия CAR. 7В. Процент дифференцировки T_{RM}-клеток, о чем свидетельствует совместная экспрессия CD69+/CD103+ в неармированных (GPC3) и армированных (GPC3 TGF β RIIDN) Т-клетках с CAR, обработанных с помощью TGF- β .

[0024] **Фиг. 8А, 8В и 8С. Показатели исследования *in vitro* в неармированных и армированных Т-клетках с CAR.** 8А. Полученные посредством светлопольной микроскопии изображения отслеживания в режиме реального времени опосредованной Т-клетками с CAR цитотоксичности во время совместного культивирования с GPC3+ клетками опухоли. Размножение Т-клеток с CAR наблюдали визуально при совместном культивировании с GPC3+ клетками опухоли. 8В. Опосредованная Т-клетками с CAR цитотоксичность во время совместного культивирования с GPC3+ клетками опухоли, оцененная посредством импедансного анализа уничтожения в режиме реального времени (RTCA) xCelligence® и выраженная в виде клеточного индекса. 8С. Количественная оценка индуцированной опухолевыми клетками (HEP3В или HUH-7) пролиферации Т-клеток с CAR в неармированных или армированных Т-клетках с CAR для GPC3 (AZ - централизованный остов вектора; LN - остов вектора Lentigen) в присутствии или отсутствие TGF- β . TGF- β подавляет индуцированную GPC3 пролиферацию Т-клеток с CAR через 4 дня после совместного культивирования. Армированные Т-клетки с CAR для GPC3 не являлись подверженными подавлению.

[0025] **Фиг. 9. Армированные с помощью TGF β RIIDN Т-клетки с CAR и уменьшение объема опухоли *in vivo* в ксенотрансплантатной модели.** Ксенотрансплантатная модель со сверхэкспрессией Huh7-TGF- β . Нетрансдуцированные Т-клетки, неармированные или армированные с помощью TGF β RIIDN Т-клетки с CAR

для GPC3 вводили посредством инфузии мышам, несущим опухоли Huh7, сконструированные для сверхэкспрессии TGF- β . Объем опухоли измеряли еженедельно (10 мышей/группа).

[0026] **Фиг. 10. Увеличение количества лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, у мышей, получивших обработку армированными с помощью TGF β RIIDN T-клетками с CAR.** Мышам, несущим опухоли со сверхэкспрессией Huh7-TGF- β , вводили 7×10^6 нетрансдуцированных T-клеток, неармированных или армированных с помощью TGF β RIIDN T-клеток с CAR для GPC3. **10А.** Количество CAR⁺ клеток в опухоли мышей, собранных в указанные моменты времени. **10В.** Репрезентативный пример данных FACS, обобщенных в 10А.

[0027] **Фиг. 11. Увеличение количества армированных с помощью TGF β RIIDN T-клеток с CAR в селезенке.** Мышам, несущим опухоли со сверхэкспрессией Huh7-TGF- β , вводили 7×10^6 нетрансдуцированных T-клеток, неармированных или армированных с помощью TGF β RIIDN T-клеток с CAR для GPC3. **11А.** Количество CAR⁺ клеток в селезенке мышей, собранных в указанные моменты времени. **11В.** Репрезентативный пример данных FACS, обобщенных в 11А.

[0028] **Фиг. 12. Экспрессия TGF β RII на поверхности CAR⁺ клеток *ex vivo*.** **12А.** Экспрессия CAR и TGF β RII на поверхности лимфоцитов, инфильтрирующих селезенку или опухоль, через 14 дней после инфузии у мышей, несущих опухоли со сверхэкспрессией Huh7-TGF- β . (FMO - флуоресценция с комбинацией детектируемых меток без одной) **12В.** Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) TGF β RII на поверхности CAR⁺ или CAR⁻ CD8⁺ T-клеток в опухоли.

[0029] **Фиг. 13. Сниженная экспрессия PD1 и LAG3 на поверхности армированных с помощью TGF β RIIDN T-клеток с CAR в опухоли.** Экспрессия PD1 (**А**) и LAG3 (**В**) на поверхности инфильтрирующих опухоль CD8⁺ и CD4⁺ CAR⁺ T-клеток через 14 дней после инфузии у мышей, несущих опухоли со сверхэкспрессией Huh7-TGF- β .

[0030] **Фиг. 14. Сниженная экспрессия CD70 и повышенная экспрессия CD27 клеток на поверхности армированных с помощью TGF β RIIDN T-клеток с CAR в опухоли.** Частота CD70⁺ CD27⁻ (**А**) и CD70⁺ CD27⁺ (**В**) на поверхности инфильтрирующих опухоль CD8⁺ и CD4⁺ CAR⁺ T-клеток через 14 дней после инфузии у мышей, несущих опухоли со сверхэкспрессией Huh7-TGF- β .

[0031] **Фиг. 15. Иммунофенотип T-клеток с CAR в селезенке.** Экспрессия PD1 (**15А**), LAG3 (**15В**) и CD27/CD70 (**15С**) на поверхности CD8⁺ и CD4⁺ CAR⁺ T-клеток в

селезенке через 14 дней после инфузии у мышей, несущих опухоли со сверхэкспрессией Huh7-TGF- β .

[0032] **Фиг. 16. Анализ IFN- γ в сыворотке крови.** Концентрация IFN- γ , обнаруженная в сыворотке крови мышей, несущих опухоли со сверхэкспрессией Huh7-TGF- β и получавших инфузию нетрансдуцированных Т-клеток, неармированных или армированных Т-клеток с CAR для GPC3 (исходный уровень А: перед имплантацией опухоли; исходный уровень В: перед инфузией Т-клеток с CAR). **Фиг. 17. Анализ AFP в сыворотке крови.** Концентрация AFP, обнаруженная в сыворотке крови мышей, несущих опухоли со сверхэкспрессией Huh7-TGF- β и получивших инфузию нетрансдуцированных Т-клеток, неармированных или армированных Т-клеток с CAR для GPC3 (исходный уровень А: перед имплантацией опухоли; исходный уровень В: перед инфузией Т-клеток с CAR).

[0033] **Фиг.18. Армированные с помощью TGF β RIIDN Т-клетки с CAR и уменьшение объема опухоли *in vivo* в моделях TGF β (-) PDX.** На **фиг. 18А - С** представлен объем опухоли в трех различных ксенотрансплантатных моделях (PDX), полученных от пациента с GPC3⁺ TGF- β ⁻ гепатоцеллюлярной карциномой (HCC). Для каждой модели 5 x 10⁶ нетрансдуцированных Т-клеток, неармированных или армированных Т-клеток с CAR для GPC3 вводили посредством инфузии мышам, несущим опухоли, и объем опухоли измеряли раз в две недели (5 мышей/группа).

[0034] **Фиг.19. Армированные с помощью TGF β RIIDN Т-клетки с CAR и уменьшение объема опухоли *in vivo* в моделях TGF β (+) PDX.** На **А - ЕЕ** представлен объем опухоли в пяти различных ксенотрансплантатных моделях (PDX), полученных от пациента с GPC3⁺ TGF- β ⁺ гепатоцеллюлярной карциномой (HCC). Для каждой модели 5 x 10⁶ нетрансдуцированных Т-клеток, неармированных или армированных Т-клеток с CAR для GPC3 вводили посредством инфузии мышам, несущим опухоли, и объем опухоли измеряли раз в две недели (5 мышей/группа).

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 техники 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).

Применяемые в данном документе следующие термины имеют значения, приписываемые им ниже, если не указано иное.

[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 изобретения.

[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%" и 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 нескольких аминокислот. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок", "аминокислотная цепь" или любой другой термин, применяемый для обозначения цепи или цепей из двух или нескольких аминокислот, включены в определение "полипептида", и термин "полипептид" можно применять вместо любого из данных 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 нескольким полипептидам, которые связаны, например, посредством 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, которая способна 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, или могут быть получены из них. Молекулы scFv известны из уровня техники и описаны, например, в патенте США №

5892019. Молекулы антител, охватываемые настоящим изобретением, могут представлять собой или 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. При нумерации аминокислот в вариабельном домене, определяющих комплементарность областях (CDR) и каркасных участках (FR) антитела следуют, если не указано иное, определению согласно Kabat, как изложено в публикации Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. (1991).

[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 включать последовательности нуклеиновой кислоты, которые обеспечивают его репликацию в клетке-хозяине, такие как точка начала репликации. Вектор также может включать 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 родственным 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 средства терапии при введении субъекту ослаблять симптомы, признаки или сокращать 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, прогнозирование или терапия. Субъекты-млекопитающие включают, например, людей, приматов, отличных от человека, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот, медведей и т. д.

[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 путем обычным способом.

2. Общий обзор

[0053] Настоящее изобретение направлено на композиции и способы лечения рака с применением клеточной терапии с использованием химерных антигенных рецепторов (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 эти конструкции, и виды терапии с использованием трансформированных клеток, раскрытые в данном документе, могут обеспечить надежные виды лечения рака с минимальным риском синдрома высвобождения цитокинов (CRS) или неизбирательного высвобождения цитокинов в клетках, не экспрессирующих GPC3.

[0054] Без ограничения какой-либо теорией считается, что GPC3 является жизнеспособной мишенью рака во многих модальностях, включая биспецифические активаторы Т-клеток, CAR-клетки, а также моноклональные антитела и конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC). Онкофетальный антиген GPC3 представляет собой GPI-связанный протеогликан сульфата гепарина. GPC3 стабилизирует

взаимодействие Wnt-Fzd, стимулируя передачу сигнала 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, такие как клетки, нацеленные на GPC3, и другие, которые являются армированными с помощью TGF β RIIDN для защиты Т-клеток с CAR от иммуносупрессии, ассоциированной с TGF- β , 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 несколько повторов (SEQ ID NO: 48)).

[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, составляющей 0,56 нМ), привели в результате к увеличению терапевтического индекса по сравнению с низкоаффинным вариантом. Наоборот, сообщалось о других примерах того, что конструирование scFv для более низкой аффинности улучшает распознавание среди клеток с различной плотностью антигена. Это может быть полезно для улучшения терапевтической специфичности антигенов, дифференциально экспрессируемых в опухолевых тканях по сравнению с нормальными.

[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 методики, которая исключает 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 пространственную 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 (более 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 мощный, но недолговечный эффектор-подобный фенотип с высокими уровнями цитолитической способности, секреции интерлейкина-2 (IL-2) и гликолиза. Напротив, T-клетки, модифицированные с помощью CAR, несущих костимуляторные домены 4-1BB, имеют тенденцию к увеличению количества и сохранению *in vivo* дольше, имеют повышенный окислительный метаболизм, менее склонны к истощению и имеют повышенную способность создавать T-клетки центральной памяти.

9. Клетки

[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 по настоящему изобретению 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 домен 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 на основании 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 Igκ, LGR5, LMP1, LeY, LRP8, MG7, MR1, NRCAM, PMEL, лиганд NKG2D, PRAME, PRLR, PVR, ROR1, ROR2, SSX2, STEAP1, STEAP2, TAC1, 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 с 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-2Rβ 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 домен 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 переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную 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 иметь 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 быть представлена 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.

[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/л (нМ) или меньше, и где конструкция с CAR не индуцирует выработку цитокинов в клетках с GPC3. Например, последовательность нуклеиновой кислоты может быть представлена 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.

[0082] В других вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор (CAR) для GPC3 на своей внеклеточной поверхности. CAR может иметь антигенсвязывающий домен, который может представлять собой антитело, Fab или scFv, каждый из которых имеет 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 полезны для подавления роста или распространения неопластических клеток. В некоторых аспектах они являются особенно полезными для подавления роста неопластических клеток, в котором играет роль GPC3.

[0086] Новообразования, поддающиеся лечению с помощью композиций по настоящему изобретению, включают солидные опухоли, например, опухоли печени, легкого или яичника. Однако 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 из них, при которых наблюдается экспрессия 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 усиленную секрецию цитокинов, экспрессию лигандов, которые взаимодействуют с иммунными клетками, такими как Т-клетки, макрофаги и регуляторные Т-клетки, или изменение функциональных характеристик. Специалисту в данной области техники будет понятно, что армирование клетки, такой как Т-клетки, 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 рецептор типа 2 трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) (TGF β RIIDN).

[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/л (нМ) или меньше, где конструкция с CAR не индуцирует выработку цитокинов в клетках с GPC3, и где клетка экспрессирует армирующую молекулу TGF β RIIDN.

[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; и армирующую молекулу TGF β RIIDN.

15. Способы лечения

[0092] CAR-модифицированные клетки по настоящему изобретению, такие как Т-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, Т-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; адъюванты (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 средствами терапии. В одном варианте осуществления дополнительные средства терапии могут включать антитела к цитокинам. Например, одно или несколько антител к TNF α можно применять для ослабления токсичности и повышения противоопухолевой активности при более высоких дозах Т-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 будут зависеть от различных параметров, таких как возраст, вес пациента, результаты клинического обследования, тип опухоли, опухолевая нагрузка и/или другие факторы, включая 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, предусмотрено, что схема лечения может дополнительно включать ингибитор иммунных контрольных точек (ICI), например, такой, который нацелен на ось PD-1/PD-L1 (PDX), и другие иммуноонкологические (IO) средства лечения, такие как агонисты 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, цемиплимаб, SHR1210, IBI308, PDR001, антитело к PD-1, BGB-A317, BCD-100 и JS001 и антитело к CTLA4, такое как тремелимумаб или ипилимумаб. В данном документе также предусмотрены дополнительные антитела. В данном документе также предусмотрены любые терапевтически эффективные части антител.

[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 вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антитела 2.14H9OPT, как описано в вышеупомянутых патентах США.

[0098] Информацию, касающуюся тремелимумаба (или его антигенсвязывающих фрагментов) для применения в способах, предусмотренных в данном документе, можно найти в патенте США № 6682736 (в котором тремелимумаб 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 Аугога 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 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. 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 TGF β RIIDN.

[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 (NK), цитотоксического Т-лимфоцита (CTL) и регуляторной Т-клетки.

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

[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 усеченным сигнальным доменом CD3-дзета (действующим в качестве контроля, неспособного к передаче сигнала)
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
TGFβRIIDN	Молекула доминантно-негативного рецептора TGF-β типа 2
GPC3-1 BZ	CAR с scFv для GPC3, сигнальным пептидом CSFR2, шарнирной областью IgG4P и обоими костимулирующими доменами 4-1BB и CD3z

GPC3-2 BZ	CAR с scFv для GPC3-2, сигнальным пептидом CSFR2, шарнирной областью IgG4P и обоими костимулирующими доменами 4-1BB и CD3z
aCART-T	T-клетка с CAR с scFv для GPC3, сигнальным пептидом CSFR2, шарнирной областью IgG4P и обоими костимулирующими доменами 4-1BB и CD3z и армированная с помощью TGFβRIIDN
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. Экспрессия гена и передача сигнала TGFβ при гепатоцеллюлярной карциноме печени

Краткое описание

[00107] В настоящем примере экспрессию гена TGFβ1 и передачу сигнала TGFβ сравнивали с таковыми в нормальной печени и гепатоцеллюлярной карциноме печени (ЛИНС).

Способы

[00108] Данные из когорты TCGA применяли для данного анализа. Экспрессию гена TGFβ1 и профиль передачи сигнала TGFβ в нормальной печени и ткани опухоли из TCGA сравнивали с применением *t*-критерия. Профиль передачи сигнала TGFβ образован из средних уровней экспрессии следующих генов: TGFBR1, SMAD7, TGFB1, SMURF2, SMURF1, BMPR2, SKIL, SKI, ACVR1, PMEPA1, NCOR2, SERPINE1, JUNB, SMAD1, SMAD6, PPP1R15A, TGIF1, FURIN, SMAD3, FKBP1A, MAP3K7, BMPR1A, CTNNB1, HIPK2, KLF10, BMP2, ENG, APC, PPM1A, XIAP, CDH1, ID1, LEFTY2, CDKN1C, TRIM33, RAB31, TJP1, SLC20A1, CDK9, ID3, NOG, ARID4B, IFNGR2, ID2, PPP1CA, SPTBN1, WWTR1, BCAR3, THBS1, FNTA, HDAC1, UBE2D3, LTBP2 и RHOA.

[00109] Анализы Каплана-Мейера общей выживаемости (OS) проводили с помощью данных ЛИНС из TCGA. Данные группировали в соответствии с высоким уровнем (≥66-го) и низким уровнем (<66-го) экспрессии гена TGFβ1 и профиля передачи сигнала TGFβ. *P*-значения определяли с применением логарифмического рангового критерия.

Результаты

[00110] Экспрессия гена TGF β 1 повышалась в клетках первичной солидной опухоли (ЛИНС) в 1,74 раза по сравнению с нормальной тканью. Высокий уровень экспрессии TGF β 1 в ЛИНС был ассоциирован со сниженной OS по сравнению с ЛИНС, экспрессирующей низкие уровни TGF β 1 (медиана 47 месяцев и 70 месяцев соответственно). См. **фигуры 1А и 1В**.

[00111] Передача сигнала гена TGF β повышалась в первичной солидной опухоли в 1,1317 раза по сравнению с нормальной тканью. Высокий уровень передачи сигнала TGF β в ЛИНС был ассоциирован со сниженной выживаемостью клеток по сравнению с низким уровнем передачи сигнала TGF β . См. **фигуры 1С и 1D**.

Вывод

[00112] Данные результаты демонстрируют статистически значимую корреляцию между повышенной экспрессией гена TGF β 1 и передачей сигнала TGF β со сниженной общей выживаемостью у пациентов с ЛИНС. Следовательно, более высокий уровень экспрессии гена TGF β 1 и передачи сигнала TGF β могут играть причинную роль в смертности, связанной с раком.

Пример 2. TGF β и передача сигнала при гепатоцеллюлярной карциноме печени

Краткое описание

[00113] В настоящем примере экспрессию TGF β и интенсивность передачи сигнала TGF β (p-SMAD2) сравнивали с таковыми в нормальной печени и гепатоцеллюлярной карциноме печени посредством иммуногистохимического анализа.

Способы

[00114] Три образца нормальной печени и 32 образца гепатоцеллюлярной карциномы окрашивали с помощью иммуногистохимии и оценивали интенсивность. Анализ TGF- β 1 и pSMAD2 на основе иммуногистохимии проводили на платформе Ventana Discovery с применением антител к TGF- β 1 (Abcam) и к pSMAD2 (Cell Signaling Technology). Экспрессия TGF- β 1 и pSMAD2 в образцах нормальной печени FFPE и НСС оценивалась полуколичественно патоморфологом. Интенсивность окрашивания ИНС определяли следующим образом: оценка 0 – отрицательное окрашивание; оценка 1 – минимальное окрашивание; оценка 2 – умеренное окрашивание; оценка 3 – сильное окрашивание.

Результаты

[00115] TGF- β обнаруживали в 44% опухоли и 91% стромы образцов НСС. Передачу сигнала TGF- β согласно оценке интенсивности фосфо-SMAD2 (p-SMAD2) обнаруживали в 91% образцов НСС. Нормальная печень являлась отрицательной по отношению как к TGF- β , так и к pSMAD-2 (**фигуры 2А и В**).

Выводы

[00116] TGF- β экспрессировался и активно передавал сигнал в подавляющем большинстве образцов НСС, демонстрируя, что он является обычным иммуносупрессивным фактором в опухолях НСС и что армирование для защиты от него может принести пользу большой популяции пациентов с НСС.

Пример 3. Армирование Т-клеток с CAR для GPC3 с помощью TGF β RIIDN**Краткое описание**

[00117] В настоящем примере армирование Т-клеток с CAR для BZ GPC3 с помощью TGF β RIIDN исследовали в качестве потенциального пути для защиты Т-клеток с CAR от опосредованной TGF- β иммуносупрессии, чтобы улучшить эффекторную функцию Т-клеток с CAR и контроль опухоли. См. **фигуры 3А и 3В**.

Способы

[00118] TGF β RIIDN. Молекулы доминантно-негативного рецептора TGF- β типа 2 получали посредством усечения рецептора дикого типа по остатку 194 таким образом, что в рецепторе TGF β RIIDN отсутствовал внутриклеточный сигнальный домен.

[00119] Армированные Т-клетки с CAR. Т-клетки с CAR для BZ GPC3 армировали с помощью TGF β RIIDN посредством экспрессии рецептора TGF β RIIDN в виде С-концевого слияния CAR для BZ GPC3 с пептидом T2A, разделяющим CAR для BZ GPC3 и рецептор TGF β RIIDN.

[00120] При размножении экспрессию CAR и TGF β RII анализировали на поверхности неармированных и армированных Т-клеток с CAR посредством проточной цитометрии. Экспрессию CAR обнаруживали посредством применения антиидиотипического антитела AF647 к GPC3-CAR (**фигура 4**).

[00121] Т-клетки с CAR очищали с помощью микрогранул с антителами к AF647 (Miltenyi) после окрашивания с помощью антиидиотипического антитела AF647 к GPC3-CAR. Очищенные клетки размножали в течение еще 5 дней, выдерживали в отсутствие IL-2 и сыворотки крови в течение ночи и стимулировали с помощью рекомбинантного человеческого TGF- β (1 нг/мл) в течение указанного времени. Клетки лизировали в буфере RIPA, содержащем ингибиторы протеазы и фосфатазы, и экспрессию указанных белков анализировали посредством вестерн-блоттинга (**фигура 5**).

[00122] Неармированные и армированные Т-клетки с CAR очищали с помощью микрогранул с антителами к AF647 (Miltenyi) после окрашивания с помощью антиидиотипического антитела AF647 к GPC3-CAR. Очищенные клетки стимулировали с помощью связанного на планшете рекомбинантного человеческого GPC3 при указанной

концентрации в присутствии или отсутствие рекомбинантного человеческого TGF- β (0,2 или 5 нг/мл). Через 6 часов клетки собирали и из клеток выделяли общую РНК с применением набора RNeasy Mini (QIAGEN) и подвергали обратной транскрипции с применением набора с обратной транскриптазой High Capacity cDNA (Applied Biosystems). Количественную ПЦР в реальном времени проводили в соответствии с протоколом мастер-микса TaqMan Gene Expression (Applied Biosystems) со следующими праймерами TaqMan: GAPDH, Hs02758991_m1; IL2, Hs00174114_m1 и IFNG, Hs00989291_m1 (**фигура 6**).

[00123] Т-клетки с CAR стимулировали с помощью гранул с антителами к CD3/CD28 (Dynabeads) в присутствии 20 нг/мл IL-15 без IL-2. Через 3 дня добавляли TGF β (50 нг/мл) и клетки оценивали в отношении экспрессии CD103 посредством проточной цитометрии через еще 3 дня культивирования (**фигура 7**).

Результаты

[00124] Экспрессия TGF β RII на поверхности Т-клеток с CAR TGF β RIIDN. Окрашивание поверхности TGF β RII на неармированных и армированных Т-клетках с CAR оценивали посредством проточной цитометрии. Антитело не различает эндогенный и TGF β RII DN, поскольку внеклеточная часть является такой же, но Т-клетки с CAR TGF β RIIDN совместно экспрессирует TGF β RII и CAR, что свидетельствует о том, что антитело обнаруживает сверхэкспрессированный рецептор DN. См. **фигуру 4**.

[00125] TGF β RIIDN ингибирует фосфорилирование SMAD 2/3 в Т-клетках с CAR при воздействии rhTGF β , неармированные Т-клетки с CAR демонстрировали индуцированное rhTGF- β фосфорилирование SMAD 2/3, подобное таковому у нетрансдуцированных контрольных клеток через 0, 15, 30 и 45 минут после воздействия rhTGF- β . Армированные TGF- β RIIDN Т-клетки с CAR демонстрировали ослабленное фосфорилирование SMAD 2/3 по сравнению с неармированными Т-клетками с CAR и нетрансдуцированными контрольными клетками через 15, 30 и 45 минут после воздействия rhTGF- β . Общая экспрессия белка SMAD 2/3 и β -актина являлась постоянной во всех группах. См. **фигуру 5В**.

[00126] Экспрессия TGF β RIIDN предупреждает опосредованное TGF- β снижение выработки эффекторных цитокинов. Стимуляция с помощью рекомбинантного человеческого GPC-3 индуцировала транскрипцию эффекторных цитокинов IFN- γ и IL-2 в Т-клетках с CAR. При присутствии во время стимуляции TGF- β снижал уровень IFN- γ и IL-2, вырабатываемый в неармированных, но не в армированных Т-клетках с CAR. Данный результат демонстрирует, что экспрессия TGF β RIIDN защищает Т-клетки с CAR от иммуносупрессивного эффекта TGF- β . См. **фигуру 6А и 6В**.

[00127] Экспрессия TGF β RIIDN эффективно подавляет передачу сигнала TGF β . Для дифференцировки CD103⁻ Т-клеток в CD103⁺ T_{RM}-клеткам требуются IL-15 и TGF- β *in vitro*. Соответственно Т-клетки с CAR TGF β RIIDN не были способны дифференцироваться в T_{RM}-клетки после инкубации с TGF- β по сравнению с CAR⁻ клетками или неармированными Т-клетками с CAR. Данный результат демонстрирует, что экспрессия TGF β RIIDN подавляет индуцированную TGF- β передачу сигнала во время длительного воздействия. См. **фигуры 7А и 7В**.

[00128]

Вывод

[00129] TGF β RIIDN подавляет передачу сигнала TGF- β в армированных Т-клетках с CAR, предупреждает опосредованное TGF- β снижение выработки эффекторных цитокинов и снижает опосредованную TGF- β дифференцировку армированных с помощью TGF β RIIDN Т-клеток с CAR до фенотипа T_{RM}. В целом данные результаты демонстрируют, что экспрессия доминантно-негативного TGF β RII является достаточной для подавления передачи сигнала TGF- β и его биологических эффектов.

Пример 3. Цитотоксичность и размножение армированных с помощью TGF β RIIDN Т-клеток с CAR во время совместного культивирования с GPC3⁺ клетками

Краткое описание

[00130] В настоящем примере опосредованные Т-клетками с CAR цитотоксичность и размножение сравнивали среди UT, неармированных и армированных с помощью TGF β RIIDN Т-клеток с CAR во время совместного культивирования с GPC3⁺ клетками рака печени.

Способы

[00131] Т-клетки (20000 CAR⁺ клеток/лунка) совместно культивировали с линией клеток плоскоклеточной карциномы, сконструированной для экспрессии GPC3 (клетки OE21, 10000 опухолевых клеток на лунку), в течение 5 дней с применением xCELLigence eSight RTCA для одновременного отслеживания жизнеспособности опухолевых клеток в режиме реального времени посредством определения электрического сопротивления и плотности Т-клеток с CAR посредством микроскопии (см. **фигуру 8А**). Затем Т-клетки (60000 CAR⁺ клеток/лунка) совместно культивировали с клетками Нер3В (средний/низкий уровень экспрессии GPC3) или клетками Нuh7 (низкий уровень экспрессии GPC3) (30000 опухолевых клеток/лунка) в течение 5 дней с применением xCELLigence RTCA-MP (без микроскопии) в течение 5 дней (см. **фигуру 8В**). Затем неприкрепленные клетки удаляли из лунок и определяли количество жизнеспособных Т-

клеток с CAR с применением люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CELLTITER-GLO® (Promega, Мэдисон, Висконсин) (см. **фигуру 8С**).

Результаты

[00132] Наблюдали значительное размножение Т-клеток с CAR при совместном культивировании с GPC3⁺ клетками опухоли. См. **фигуру 8А**. Все Т-клетки с CAR эффективно уничтожали GPC3⁺ клетки опухоли, и цитолитическая способность не модулировалась посредством совместной экспрессии TGFβRIIDN или посредством добавления экзогенного TGF-β. См. **фигуру 8В**. TGF-β подавлял индуцированную GPC3 пролиферацию Т-клеток с CAR через 5 дней после совместного культивирования. Однако армированные с помощью TGFβRIIDN Т-клетки с CAR не являлись подверженными данному подавлению. См. **фигуру 8С**.

Вывод

[00133] Армированные с помощью TGFβRIIDN Т-клетки с CAR демонстрировали значительную цитотоксичность в отношении GPC3⁺ клеток опухоли, что указывает на то, что экспрессия доминантно-негативного рецептора не влияла на способность Т-клеток с CAR уничтожать клетки-мишени *in vitro*. Наоборот, в отличие от неармированных Т-клеток с CAR, армированные с помощью TGFβRIIDN Т-клетки с CAR не являлись подверженными опосредованному TGF-β подавлению индуцированной GPC3⁺ пролиферации.

Пример 4. Армированные с помощью TGFβRIIDN Т-клетки с CAR *in vivo* – ксенотрансплантатная модель

Краткое описание

[00134] В настоящем примере эффективность армированных с помощью TGFβRIIDN Т-клеток в отношении GPC3⁺ клеток опухоли определяли *in vivo*.

Способы

[00135] Модель гепатоцеллюлярной карциномы Nuh7-TGF-β, которая характеризуется сверхэкспрессией TGF-β, применяли для анализа эффективности *in vivo* армированных с помощью TGFβRIIDN Т-клеток в отношении уменьшения объема опухоли. Опухолевые клетки имплантировали в бок мышей NSG (10 мышей/группа). Когда средний объем опухолей достигал 150 мм³, мышам вводили 3, 7 или 21 × 10⁶ указанных Т-клеток с CAR или 21 миллион нетрансдуцированных Т-клеток, и опухоли измеряли раз в две недели. Верхние графики: средний объем опухоли на группу. Нижние графики: объем опухоли для каждой отдельной мыши при указанной дозе (см. **фигуру 9**).

[00136] Анализ *ex vivo* проводили на мышах, несущих опухоль Huh7-TGF β , которым вводили 7×10^6 Т-клеток с CAR. Через семь или четырнадцать дней после инфузии опухоли и селезенки собирали от 5 мышей на группу. Количество CAR+ Т-клеток рассчитывали посредством проточной цитометрии при окрашивании с помощью меченого AF647 антиидиотипического антитела к GPC3-CAR и с применением AccuCheck Counting Beads (см. **фигуру 10 и 11**).

[00137] Мышам, несущим опухоли Huh-7-TGF β , вводили 7×10^6 Т-клеток с CAR. Через четырнадцать дней после инфузии опухоли собирали и уровень экспрессии оценивали посредством окрашивания с помощью проточной цитометрии в отношении CAR-положительных и CAR-отрицательных клеток (см. **фигуру 12**).

[00138] Мышам, несущим опухоли Huh-7-TGF β , вводили 7×10^6 Т-клеток с CAR. Через четырнадцать дней после инфузии опухоли собирали и уровень экспрессии PD1, LAG3, CD27 и CD70 оценивали на поверхности Т-клеток с CAR (см. **фигуру 13 и 14**).

[00139] Мышам, несущим опухоли Huh-7-TGF β , вводили 7×10^6 Т-клеток с CAR. Через четырнадцать дней после инфузии селезенки собирали и уровень экспрессии PD1, LAG3, CD27 и CD70 оценивали посредством окрашивания с помощью проточной цитометрии (см. **фигуру 15**).

[00140] Мышам, несущим опухоли Huh-7-TGF β , вводили 7×10^6 Т-клеток с CAR. Для анализа цитокинов и AFP в сыворотке крови кровь собирали небольшими объемами в указанные моменты времени и отделяли сыворотку с применением BD Microtainer Serum Separator Tubes. Уровни цитокинов определяли с применением анализов MSD, тогда как AFP оценивали посредством сэндвич-ELISA. У пяти мышей в группе отбирали кровь перед имплантацией опухоли (исходный уровень А), перед инфузией Т-клеток с CAR (исходный уровень В), через 7 и 14 дней после инфузии (см. **фигура 16 и 17**).

Результаты

[00141] Нетрансдуцированные Т-клетки не оказывали заметного эффекта на рост опухоли. Обработка с помощью Т-клеток с CAR приводила к незначительному уменьшению объема опухоли при самой низкой дозе (3 миллиона клеток/мышь), тогда как более значительный эффект был очевиден при более высоких дозах, что приводило к полной регрессии опухоли. Напротив, введение армированных с помощью TGF β RIIDN Т-клеток с CAR индуцировало значительное уменьшение объема опухоли и полную регрессию даже при самой низкой дозе. Более того, выживаемость без прогрессирования была значительно увеличена при всех дозах обработки армированными с помощью TGF β RIIDN Т-клетками с CAR по сравнению с неармированными Т-клетками с CAR (см. **фигуру 9**). Анализ *ex vivo* Т-клеток с CAR проводили на мышах, получивших инфузию

7 x 10⁶ клеток. В соответствии с повышенной эффективностью у мышей, получивших обработку с помощью TGFβRIIDN, через 7 дней после инфузии было обнаружено повышенное количество лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), что указывает на продолжающийся активный иммунный ответ и ассоциированную с ним пролиферацию, которая стабилизировалась на день 14 после обработки (см. **фигуру 10**). Напротив, повышенное количество Т-клеток с CAR наблюдали через 14 дней после инфузии в селезенке мышей, получивших обработку армированными с помощью TGFβRIIDN Т-клетками с CAR, что свидетельствует об усиленной пролиферации Т-клеток с CAR и, следовательно, большее количество CAR⁺ клеток обнаруживалось в кровотоке (см. **фигуру 11**). Чтобы выяснить, обнаруживается ли TGFβRIIDN на Т-клетках с CAR после размножения *in vivo*, авторы настоящего изобретения проанализировали экспрессию TGFβRII на TIL и лимфоцитах в селезенке через 14 дней после инфузии. Тогда как TGFβRII практически не обнаруживался на неармированных клетках, лимфоциты мышей, получивших обработку армированными Т-клетками с CAR, совместно экспрессировали CAR и TGFβRII. Следовательно, разумно предположить, что TGFβRII, экспрессируемый на TIL с TGFβRIIDN, является доминантно-негативным рецептором, обнаруживаемым *ex vivo* после активного иммунного ответа и ассоциированной с ним антигензависимой пролиферации (см. **фигуру 12**). Примечательно, что TIL с TGFβRIIDN экспрессировали низкий уровень маркеров истощения LAG3 и PD1 (см. **фигуру 13**), причем последний непосредственно регулировался SMAD3-зависимым способом с помощью TGF-β (Park, B. V., Freeman, Z. T., Ghasemzadeh, A., Chattergoon, M. A., Rutebemberwa, A., Steigner, J. et al. (2016). TGFβ1-Mediated SMAD3 Enhances PD-1 Expression on Antigen-Specific T Cells in Cancer. *Cancer Discov*, 6(12), 1366-1381). Кроме того, TIL с TGFβRIIDN экспрессировали меньше CD70 и, наоборот, больше CD27 по сравнению с неармированными TIL (см. **фигуру 14**). Данный результат согласуется с предыдущим доказательством, демонстрирующим, что TGF-β повышает экспрессию CD70 и индуцирует истощение эффекторных Т-клеток памяти, и подкрепляет концепцию о том, что экспрессия доминантно-негативного рецептора защищает Т-клетки с CAR от опосредованной TGF-β иммуносупрессии (Yang, ZZ., Grote, D., Xiu, B. et al. TGF-β upregulates CD70 expression and induces exhaustion of effector memory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 28, 1872–1884 (2014). <https://doi.org/10.1038/leu.2014.84>). В отличие от TIL Т-клетки с CAR на периферии не экспрессировали маркеры совместного ингибирования или CD70 и являлись преимущественно CD27-положительными с постоянным неактивированным статусом (см. **фигуру 15**). В соответствии с повышенной эффективностью и большим количеством TIL обнаруживали больше IFN-γ в сыворотке

крови мышей, получивших инфузию Т-клеток с CAR TGF β RIIDN, через 7 дней после инфузии и значительное снижение в сыворотке крови концентрации опухолевого маркера AFP через 14 дней после инфузии (см. **фигуры 16 и 17**).

Данный результат демонстрирует, что экспрессия TGF β RIIDN повышает эффективность терапии с использованием Т-клеток с CAR посредством противодействия иммуносупрессивному действию TGF- β *in vivo*.

Вывод

[00142] Армированные с помощью TGF β RIIDN Т-клетки с CAR демонстрируют значительные перспективы в отношении эффективного лечения для GPC3⁺ опухолей *in vivo*.

Пример 5. Армированные с помощью TGF β RIIDN Т-клетки с CAR *in vivo* – ксенотрансплантатная модель гепатоцеллюлярной карциномы, полученная от пациента

Краткое описание

[00143] В настоящем примере эффективность армированных с помощью TGF β RIIDN Т-клеток с CAR в ряде клеток ксенотрансплантата GPC3⁺ гепатоцеллюлярной карциномы, полученных от пациента, определяли *in vivo*.

Способы

[00144] Данное исследование проводили с помощью Crown Bioscience Inc. Восемь моделей PDX выбирали на основании экспрессии GPC3 и TGF- β , оцененной посредством ИНС и секвенирования РНК, проведенными с помощью Crown Bioscience. Все выбранные модели имели высокий уровень GPC3 (оценка ИНС > 100), но три из них не экспрессировали TGF- β (оценка ИНС < 5), тогда как другие 5 моделей являлись TGF- β -положительными (оценка ИНС > 20). В соответствии с протоколом исследования Crown Bioscience фрагменты опухоли от исходных мышей собирали и применяли для инокуляции мышей NCG. Каждой мышце инокулировали подкожно в правый передний бок специфический фрагмент опухоли PDX (3 x 3 x 3 мм) для развития опухоли. Мышей рандомизировали, когда средний размер опухоли достигал примерно 150-250 мм³. Мышам, несущим опухоль, вводили 5 миллионов неармированных или армированных Т-клеток с CAR и нетрансдуцированных Т-клеток, предоставленных AstraZeneca (5 мышей/группа), и объем опухоли измеряли раз в две недели (см. **фигуры 18 и 19**).

Результаты

[00145] Опухоли росли у мышей, которые получили нетрансдуцированные Т-клетки. Однако в отсутствие TGF- β неармированные или армированные клетки являлись

одинаково эффективными и индуцировали быструю и полную регрессию у всех мышей, в том числе в исследовании (см. **фигуру 18**). При инфузии в модели, экспрессирующие TGF- β , неармированные T-клетки с CAR оказывали гораздо менее выраженный эффект, в отличие от армированных с помощью TGF β RIIDN T-клеток с CAR, которые были постоянно более активными и индуцировали значительную регрессию опухоли.

Вывод

[00146] Модели PDX имитировали биологию опухоли человека, допуская естественное прогрессирование опухоли. Следовательно, данные наблюдения подтверждают и подкрепляют доказательство, полученное с помощью ксенотрансплантатной модели Nuh7-TGF- β . В целом эти данные демонстрируют, что армированные с помощью TGF β RIIDN T-клетки с CAR для GPC3 могут представлять собой эффективное средство лечения GPC3⁺ опухолей *in vivo* и могут сохранять свою эффективность даже в присутствии иммуносупрессивного фактора TGF- β .

[00147] 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.

[00148] 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.

[00149] 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.

[00150] 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.

[00151] 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	Аминокислотная последовательность 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 рецептора TGF- β типа 2
SEQ ID NO: 47	Аинокислотная последовательность CAR для BZ GPC3 и доминантно-негативного рецептора TGF- β типа 2

Таблица 6. Последовательности

SEQ ID NO: 1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKRYFDYW GQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIG SNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIGGLQSDDE ADYYCVAWDDSLNAPVFGGGTKVTVL
SEQ ID NO: 2	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGRYFDYW GQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSDI GSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDE ADYYCATWDDRMYS PVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 3	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPGVHSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGKRYFDYWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYEL TQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNNQRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAIGGLQSDDEADYYCVAWDDSLNAPVFGGGTKVTVLESK YGPPCPPCFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

SEQ ID NO: 4	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPGVHSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGKRYFDYWGGQTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYEL TQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNNQRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAIGGLQSDDEADYYCVAWDDSLNAPVFGGGTKVTVLESK YGPPCPPCFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRVKFSRSADAPA*
SEQ ID NO: 5	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPGVHSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGKRYFDYWGGQTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYEL TQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNNQRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAIGGLQSDDEADYYCVAWDDSLNAPVFGGGTKVTVLESK YGPPCPPCFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKR S RLLHSDYMN MTPR RPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR*
SEQ ID NO: 6	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPGVHSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGKRYFDYWGGQTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYEL TQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNNQRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAIGGLQSDDEADYYCVAWDDSLNAPVFGGGTKVTVLESK YGPPCPPCFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKR S RLLHSDYMN MTPR RPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCR FPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLS TATKDTYDALHMQUALPPR*
SEQ ID NO: 7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKGRYFDYWGGQTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSQSVLTQ PPSASGTPGQRVTISCSGGSSDIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDRMYS PVFGGGTKLTVLESKYG PPCPPCFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCR FPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKG GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR*

SEQ	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA
ID	MSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL
NO:	RAEDTAVYYCAK GKRYFDYWGQGTMTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQ
8	PPSASGTPGQRVTISCSGGSSDIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDRMYS PVFGGGTKLTVLESKYG PPCPPCFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRVKFSRSADAPA*
SEQ	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA
ID	MSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL
NO:	RAEDTAVYYCAK GKRYFDYWGQGTMTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQ
9	PPSASGTPGQRVTISCSGGSSDIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDRMYS PVFGGGTKLTVLESKYG PPCPPCFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR*
SEQ	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA
ID	MSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL
NO:	RAEDTAVYYCAK GKRYFDYWGQGTMTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQ
10	PPSASGTPGQRVTISCSGGSSDIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDRMYS PVFGGGTKLTVLESKYG PPCPPCFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRP GPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKDTYDALHMQUALPPR*
SEQ	atgctgctgctggtgacaagcctgctgctgtgcaactgccccatcccgccttctgctgattcctggtgtacactccgaggtgc
ID	agctgttgagctctgggggaggcttggtacagcctggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttagcag
NO:	ctatgccatgagctgggtccgccaggctccaggaaggggctggagtggtctcagctattagtgtagtggtgtagcacat
11	actacgcagactccgtgaaggccggtcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctg agagccgaggacacggcctgtattactgtgcgagaggaaagcgatactttgactactggggccaggggacaatggtcaccg tctcgagtgtggggggggcagcgggtggtgaggctctggtggaggaggagctcctatgagctgactcagccaccctcag cgtctgggacccccggcagagggtcaccatctctgttctggaggcagctccaacatcggaagtaatactgtaaactggtcc ggcagctcccaggaacggccccaaactcctcgtttatttaataatcagcgaccctcaggggtccctgaccgattctctggctc caagtctggcacctcggcctccctggccatcgtgggtccagctgacgatgaggctgactattactgtgtagcatgggatga

	<p>ctctctgaatgctccggtgttcggcggaggaccacaggtcaccgtcctagagagcaaatatggaccacatgccctccatgtcc tttttgggtcctggtggtcgtgggaggcgtgctggcatgttattctctgctggtcacagtggctttcatcttctgggtcaagcga ggccggaagaaactgctgtacatcttcaaacagcctttatgcgccagtgcagacaactcaggaggaagacggctgctctgt cggttccccgaggaagaggaaggggatgtgagctgcgcgtgaagttttctgaagtgccgatgctcctgcatatcagcaggg acagaaccagctgtacaacgagctgaatctgggccggagagaggaatacgcagctgctggataagaggcgcggcagagacc cagaaatggcgggaagccacgacggaaaaacccccaggaggggctgtataatgaactgcagaaggacaaaaatggccga ggcttacagcgaatcgggatgaaggagagagaaggcgcggaaaaggccacgatggactgtatcaggcctgagcactg ccaccaaggacacctacgatgctctgcacatgcaggcactgccaccaggtga</p>
SEQ ID NO: 12	<p>atgctgctgctggtgacaagcctgctgctgtgcgaactgccccatcccgccttctgctgattcctggtgtacactccgaggtgc agctgttgagctgggggaggcttggtagcagcctggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctttagcag ctatgcatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcagctattagtggtagtggtagcagcagc actacgcagactccgtgaaggccggttcacatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctg agagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagaggaaagcgatactttgactactggggccaggggacaatggtcaccg tctcagtggtggggggggcagcgggtggtggaggctctggtggaggaggagctcctatgagctgactcagccaccctcag cgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctctgttctggaggcagctccaacatcggagtaataactgtaaactggttcc ggcagctcccaggaacggccccaaactcctcgtttattttaataatcagcgaccctcagggggtccctgaccgattctctggctc caagtctggcacctcggcctccctggccatcgggtgggtccagctgacgatgaggctgactattactgtgtagcatgggatga ctctctgaatgctccggtgttcggcggaggaccacaggtcaccgtcctagagagcaaatatggaccacatgccctccatgtcc tttttgggtcctggtggtcgtgggaggcgtgctggcatgttattctctgctggtcacagtggctttcatcttctgggtccgcgtg aagttttctgaagtgccgatgctcctgcatga</p>
SEQ ID NO: 13	<p>atgctgctgctggtgacaagcctgctgctgtgcgaactgccccatcccgccttctgctgattcctggtgtacactccgaggtgc agctgttgagctgggggaggcttggtagcagcctggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctttagcag ctatgcatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcagctattagtggtagtggtagcagcagc actacgcagactccgtgaaggccggttcacatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctg agagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagaggaaagcgatactttgactactggggccaggggacaatggtcaccg tctcagtggtggggggggcagcgggtggtggaggctctggtggaggaggagctcctatgagctgactcagccaccctcag cgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctctgttctggaggcagctccaacatcggagtaataactgtaaactggttcc ggcagctcccaggaacggccccaaactcctcgtttattttaataatcagcgaccctcagggggtccctgaccgattctctggctc caagtctggcacctcggcctccctggccatcgggtgggtccagctgacgatgaggctgactattactgtgtagcatgggatga ctctctgaatgctccggtgttcggcggaggaccacaggtcaccgtcctagagagcaaatatggaccacatgccctccatgtcc tttttgggtcctggtggtcgtgggaggcgtgctggcatgttattcctgctggctactgtggcctttcatcttctgggtcgggag caagcggagccggtgctgactctgactacatgaacatgactccacggagaccggccctaccggaaacattatcagccct acgccccaccagagattttgccgcttataggtccagggtgaagttttctgcagtgcagatgccctgcttatcagcagggaca gaatcagctgtacaacgagctgaatctgggcaggcgcgaggaatacgcagctgctggataagcgacggggcagagacccccg</p>

	<p>aatgggagggaaagccagaaggaaaaacccctcaggaggggctgtataatgaactgcagaaggacaaaatggcagaggcc tacagtgaatcgggatgaagggagagcgcggacggggaaaaggccacgatggactgtatcagggcctgtctactgccacc aaggacacctacgatgccttcacatgcaggctctgcctccacgtga</p>
SEQ ID NO: 14	<p>atgctgctgctggtgacaagcctgctgctgtgcgaactccccatcccgccttctgctgattcctggtgtacactccgaggtgc agctgttgagctctgggggaggcttggtacagcctggggggtccctgagactctctgtgcagcctctggattcaccttagcag ctatgcatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtggtctcagctattagtggtagtggtgtagcacat actacgcagactccgtgaaggccggttcacatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctg agagccgaggacacggcctgtattactgtgcgagaggaaagcgatactttgactactggggccaggggacaatggtcaccg tctcgagtgggtggggggggcagcgggtggtggaggctctggtggaggaggagctcctatgagctgactcagccaccctcag cgtctgggacccccgggcagagggtccatctctgttctggaggcagctccaacatcggaagtaatactgtaaactggtcc ggcagctcccaggaacggccccaaactcctcgtttattttaataatcagcgaccctcaggggtccctgaccgattctctggctc caagtctggcacctcggcctccctggccatcggtgggctccagtctgacgatgaggctgactattactgtgtagcatgggatga ctctctgaatgctccggtgttcggcggagggaacaaaggtcaccgtcctagagagcaaatatggaccacatgcctccatgtcc ttttgggtcctggtggtcgtgggaggcgtgctggcatgttattccctgctggtcactgtggccttcatcatcttctgggtcggag caagcggagccggctgctgactctgactacatgaacatgactccacggagaccggccctaccggaaacattatcagccct acgccccaccagagatfttgcgcttataaggtccaagcgcggccgaaagaaactgctgtacatcttcaaacagcccttcatga gaccctccagacaactcaggaggaagacggctgcagctgtaggttcccagggaagaggaagggggatgtgagctgagg gtgaagtttctcgagtgcatgcccctgcttatcagcaggacagaatcagctgtacaacgagctgaatctgggcaggcgc gaggaatacagctgctggataagcgacggggcagagaccccgaatgggagggaaagcccagaaggaaaaacccctcagg aggggctgtataatgaactgcagaaggacaaaatggcagaggcctacagtgaatcgggatgaaggagagcgcggacgg ggaaaaggccacgatggactgtatcagggcctgtctactgccaccaaggacacctacgatgccttcacatgcaggctctgcc tccacgtga</p>
SEQ ID NO: 15	<p>atgctgctgctggtgacaagcctgctgctgtgcgaactccccatcccgccttctgctgattcctgaggtccagctgctggaga gaggagggagactggtgcagcctggaggaagtctgcgactgtatgcgccgctagcggcttccacttcaactcctatgcaatg agctgggtgagcagaccaggcaaggggctggagtggtctccgctatctccggctctggaggctctacttactatgcaga cagtgtgaagggcggttcacaatctccagagataactctaagaacactctgtacctgcagatgaactctctgagagctgagga caccgcagtgtactattgcgccaagggcaaaaggtactttgattattggggacagggcactatggtgaccgtctctagtggagg aggaggaagcggaggaggagatccggcggaggagcagtcagtcagtgctgacacagccacctagcgcctccggaacc ccaggacagcgggtcacaatctctttagtgggggatcaagcgacattgggagcaaacaccgtgaattggtatcagcagctgcc tggaacagctcaaagctgctgatctactataacaatcagaggccctccggcgtccctgatcgttctcaggcagcaaatccgg gacttctgcaagtctggcattagtgccctgcagtcagaggacgaagccgattactattgtctacctgggacgataggatgtac tctcccgtgttcggcgggggaaacaaagctgactgtcctggagagcaaatatggaccacctgcctccatgtccttttgggtcc tggtggtcgtgggaggcgtgctggcatgttattctctgctggtcacagtggctttcatcatcttctgggtcaagcagggccggaag aaactgctgtacatcttcaaacagcctttatgcgcccagtcagacaactcaggaggaagacggctgctcttgcggttccccg</p>

	<p>aggaagaggaagggggatgtgagctgcgcgtgaagtttctcgaagtgccgatgctcctgcatatcagcagggacagaacca gctgtacaacgagctgaatctgggcccggagagaggaatacagctgctggataagaggcgccgagagaccagaaatgg gcggggaagccacgacggaaaaacccccaggaggggctgtataatgaactgcagaaggacaaaatggccgaggcttacagc gaaatcgggatgaagggagagagaagggcgggaaaaaggccacgatggactgtatcagggcctgagcactgccaccaagg acacctacgatgctctgcacatgcaggcactgccaccaggtga</p>
SEQ ID NO: 16	<p>atgctgctgctggtgacaagcctgctgctgtgcgaactccccatcccgccttctgctgattcctgaggtccagctgctggaga gcgaggaggactggtgcagcctggaggaagtctgcgactgtcatgcgccgctagcggcttcacctcagctcctatgcaatg agctgggtgcgacaggcaccaggcaaggggctggagtgggtctccgctatctccggctctggaggctctactactatgcaga cagtgtgaaggggagggttcacaatctccagagataactctaagaacactctgtacctgcagatgaactctctgagagctgagga caccgcagtgtactattgcgccaagggcaaaaaggactttgattattggggacagggcactatggtgaccgtctctagtggagg aggaggaagcggaggaggaggatccggcggaggaggcagtcagtcagtgctgacacagccacctagcgcctccggaacc ccaggacagcgggtcacaatctttgtagtgggggatcaagcgacattgggagcaaacaccgtgaattggtatcagcagctgcc tggaacagctccaaagctgctgatctactataacaatcagaggccctccggcgtccctgatcgcttctcaggcagcaaatccgg gacttctgcaagtctggccattagtgccctgcagtcagaggacgaagccgattactattgtgctacctgggacgataggatgtac tctcccgtgttcggcgggggaacaaagctgactgtcctggagagcaaatatggaccacctgcctccatgtccttttgggtcc tggtggtcgtgggaggcgtgctggcatgttactccctgctggtcactgtggcctcatcatcttctgggtgcgggtgaagtttctc gcagtccgacgctcccgatga</p>
SEQ ID NO: 17	<p>atgctgctgctggtgacaagcctgctgctgtgcgaactccccatcccgccttctgctgattcctgaggtccagctgctggaga gcgaggaggactggtgcagcctggaggaagtctgcgactgtcatgcgccgctagcggcttcacctcagctcctatgcaatg agctgggtgcgacaggcaccaggcaaggggctggagtgggtctccgctatctccggctctggaggctctactactatgcaga cagtgtgaaggggagggttcacaatctccagagataactctaagaacactctgtacctgcagatgaactctctgagagctgagga caccgcagtgtactattgcgccaagggcaaaaaggactttgattattggggacagggcactatggtgaccgtctctagtggagg aggaggaagcggaggaggaggatccggcggaggaggcagtcagtcagtgctgacacagccacctagcgcctccggaacc ccaggacagcgggtcacaatctttgtagtgggggatcaagcgacattgggagcaaacaccgtgaattggtatcagcagctgcc tggaacagctccaaagctgctgatctactataacaatcagaggccctccggcgtccctgatcgcttctcaggcagcaaatccgg gacttctgcaagtctggccattagtgccctgcagtcagaggacgaagccgattactattgtgctacctgggacgataggatgtac tctcccgtgttcggcgggggaacaaagctgactgtcctggagagcaaatatggaccacctgcctccatgtccttttgggtcc tggtggtcgtgggaggcgtgctggcatgttattccctgctggtcacagtggcctcatcatcttctgggtgcggagcaagcggag ccggctgctgactctgactacatgaacatgacccccggagaccggccctacaagaaagcattatcagccttacgccccac ccagggacttcgacgcttatcgctcccagtgaaatctcgcagtcagatgccccgcttatcagcagggccagaatcagct gtacaacgagctgaatctggggaggcgcgaggaatacagctgctggataagcgagggggccgggacccccgaaatggga ggaaagcctagaaggaaaaacccacaggagggcctgtataatgaactgcagaaggacaaaatggcagaggcctacagcga aatcggaatgaagggagagcggcagggggcaaggacacgatggcctgtatcaggggctgagcaccgccacaaaggac acctacgatgcctgcacatgcaggctctgcctccacgctga</p>

SEQ ID NO: 18	atgctgctgctggtgacaagcctgctgctgtgcgaactgccccatcccgccttctgctgattcctgaggtccagctgctggaga gcgaggaggactggtgcagcctggaggaagtctgcgactgtcatgcccgcctagcggcttcaccttcagctcctatgcaatg agctgggtgcgacagccaccaggcaaggggctggagtggtctccgctatctccggctctggaggctctactactatgcaga cagtgtgaagggcggttcacaatctccagagataactctaagaacactctgtacctgcagatgaactctctgagagctgagga caccgcagtgtactattgcgccaagggcaaaaggactttgattattggggacagggcactatggtgaccgtctctagtggagg aggaggaagcggaggaggaggatccggcggaggaggcagtcagtcagtgctgacacagccacctagcgcctccggaacc ccaggacagcgggtcacaatctctttagtgggggatcaagcgacattgggagcaaacaccgtgaattggtatcagcagctgcc tggaacagctccaaagctgctgatctactataacaatcagaggcctccggcgtccctgatcgttctcaggcagcaaatccgg gacttctgcaagtctggcattagtggcctgcagtcagaggacgaagccgattactattgtgctacctgggacgataggatgtac tctcccgtgttcggcgggggaaacaaagctgactgtcctggagagcaaatatggaccaccatgccctccatgtccttttgggtcc tggtgctgctgggaggcgtgctggcatgttattcctgctggtcactgtggccttcatcatcttctgggtgaggagcaagcggag ccggctgctgcactctgactacatgaacatgactccacggagaccggcctaccggaaacattatcagcctacgccccac ccagagattttgccgcttataggtccaagcggcggcgaagaaactgctgtacatcttcaaacagccctcatgagaccgtcca gacaactcaggaggaagacggctgcagctgtaggtccccgaggaagaggaagggggatgtgagctgaggggtgaagtttct cgcagtcagatgccctgcttatcagcagggacagaatcagctgtacaacgagctgaatctgggcaggcgcgaggaatac acgtgctggataagcgcaggggacagagaccccgaatgggagggagcccagaaggaaaaaccctcaggaggggctgta taatgaactgcagaaggacaaaatggcagaggcctacagtgaatcgggatgaaggagagcgcggacggggaaaaggc cacgatggactgtatcagggcctgtctactgccaccaaggacacctacgatgccctgcacatgcaggctctgcctccacgctga
SEQ ID NO: 19	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDVVMTQSPLSLPVTGEPASISCRSSQSLVHSNR NTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV VYYCSQNTHPPTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTGDTAYSQKFKG RVTLTADKSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCTRFYSYTYWGQGLVTVSSDKTHT CPPCPFVWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR*
SEQ ID NO: 20	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPDVVMTQSPLSLPVTGEPASISCRSSQSLVHSNR NTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV VYYCSQNTHPPTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTGDTAYSQKFKG RVTLTADKSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCTRFYSYTYWGQGLVTVSSDKTHT CPPCPFVWLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGP TRKHYPYAPPRDFAAYRSKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE

	EEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA TKD TYDALHMQALPPR*
SEQ ID NO: 21	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPQVLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG LHWVRQAPGKGLEWVA AISYDGSKKYYADSVKGRLTISRDN SKNTLYLQMNS LRPDDTALYFCARGWVFEPLSWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVL TQ PPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDR FSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGYVFGTGTKLTVLESKYGP PCPPCFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VL DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR*
SEQ ID NO: 22	atgctgctgctggtgacaagcctgctgctgtgcgaactgccccatcccgccttctgctgattcctgatgctgctgatgacgcaga gccctctctcttcccgttaccctggtgaaccgcatcaataagttgccgctccagtcaatcactgtacattcaaatcgcaatac ctacctgactggtatttcagaagccgggacaatcccctcaattggtgatataaggtatccaatcgctttctggagttcctgat agattcagcggatccgggtctggtactgattcactctgaaaatatccagggtcgaagctgaggacgtaggcgtatattattgctc tcagaacacgcatgtcccgccactttcgccagggcactaaactgagatcaagggtggggggggcagcgggtggtggagg ctctggtggaggaggagccagggtccaactcgtcaaagtggcgagagggtcaaaaagccaggcgcgagcgttaaagtatc atgtaaggccagcgggtatactttcactgattatgaaatgcaactgggtgcgacaagccccgggcaaggctctgagtggtgggt gcactgatcaaaaactgggatactgcctatagccagaaattcaaggggcgcgtcacactcactgccgacaaaagtacgag cacagcttatatggaattgagttcactgacgagcaggatagcggcagtttactgtacgcgcttctactttacacttattgggg gcaaggcactttggtactgtctctgacaagaccatacgtgtccaccgtgtcccttctgggtattggtgtggtcggcggtgt ccttgctgttacagccttctctgacagtcgactcataatftttgggtgaaaagaggtcggaaaagttgctgtatatttcaaac aacctttatgagacctgtacaaacgactcaggaagaggatggtgtgagttgcaggtttccggaggaggaggaaggtgggtgc gaactgcgggtgaaatttagtagaagcgtgacgcaccagcttaccacaaggacagaaccaattgtacaacgagcttaacttg ggtaggaggagggaatgatgtactggacaaaaggcaggtcgcgatccggaatgggaggcaagccacagcggcggga aaaaccgcaggaaaggctgtacaacgaactcagaaagataaaatggcagaagcactccgaaatagggatgaaagggtga acggcggcgaggcaaggccacgacgggtctgaccaagggtgtcaacggcaactaaagacacgtatgacattcatatg caagctctgccaccagggtga
SEQ ID NO: 23	atgctgctgctggtgacaagcctgctgctgtgcgaactgccccatcccgccttctgctgattcctgatgctgctgatgacgcaga gccctctctcttcccgttaccctggtgaaccgcatcaataagttgccgctccagtcaatcactgtacattcaaatcgcaatac ctacctgactggtatttcagaagccgggacaatcccctcaattggtgatataaggtatccaatcgctttctggagttcctgat agattcagcggatccgggtctggtactgattcactctgaaaatatccagggtcgaagctgaggacgtaggcgtatattattgctc tcagaacacgcatgtcccgccactttcgccagggcactaaactgagatcaagggtggggggggcagcgggtggtggagg

	<p>ctctggtggaggaggagccaggtccaactcgttcaaagtggcgcagaggtcaaaaagccagggcgcgagcgttaaagtatc atgtaaggccagcgggtatatacttactgattatgaaatgcactgggtgcgacaagccccgggcaaggcttgagtggatgggt gcacttgatccaaaactgggatactgcctatagccagaaattcaagggcgcgtcacactcactgccacaaaagtacgag cacagcttatatggaattgagttcactgacgagcaggatagccagtttattactgtacgcgcttctactcttactattgggg gcaaggcactttggttactgtgtcctctgacaagaccatacgtgtccaccgtgtcccttctgggtattggtgtggtcggcgggt ccttgctgttacagccttctcgtgacagtcgactcataatftttgggtgaggagcaagcggagccggctgctgcactctgacta catgaacatgactccacggagaccggccctaccggaaacattatcagccctacgccccaccagagattttgccgcttatag gtccaaaagaggtcggaaaaagttgctgtatatttcaacaacccttatgagacctgtacaacgactcaggaagaggatggt tgtagttgacaggttccggaggaggaggaaaggtgggtgcgaactgcgggtgaaattagtagaagcgtgacgcaccagctta ccaacaaggacagaaccaattgtacaacgagcttaactgggtaggaggaggaaatgatgtactggacaaaagggcaggt cgcgatccgaaatgggaggcaagccacagcgggaaaaaccgcaggaaggctgtacaacgaactcagaaagataa aatggcagaagcactccgaaatagggatgaaaggtgaacggcggcaggcaaggccacgacggctgtaccaaggggt gtcaacggcaactaaagacacgtatgatgacttcatatgcaagctctgccaccaggtga</p>
SEQ ID NO: 24	<p>atgctgctgctggtgacaagcctgctgctgtgcgaactccccatcccgccttctgctgattcctcaggtccagcttgcaaa cggaggaggagtgttacagcctggccgctcttgagactgtctgtcggccagtggatttacttcttcttatgggttcattg ggtcagacaagcaccgggcaaaggattggaatgggtcgcggccattagctatgatggtcaaagaaatattatgccgattccgt aaaagggaggtgacaataagccgggataacagcaagaacactttgatcttcagatgaatagcctccgaccggacgacagg cactgtattttgcccacgcgggtggtttgtagaaccttgagttggggacaaggactcttgcacggtatcttctggcggaggt gggagtggtgggggtggcagtgccgggggtgggtcacaagcgtgcttacacaacctcttctgcgagcggaaactccggga caacgggttacgatttcatgctccggctcaagtagcaatataggatcaatacagtggaattggtatcaacaactcctggcag cgcccaagctgctgatctacttaataaccagaggccgagtggtgtgccagataggtcagtggtctaaatcaggtactagcg cgagcctgccattcaggacttcaatcagaggatgaagcggactactactgtgccgcgtgggatgattcacttaatggatattg ttcgggaccggaacaaaattgacggattggagagcaaatatggaccacatgccctccatgtccttttgggtcctggtggtcgt gggaggcgtgctggcatgtattctctgctggtcacagtggtcttcatcttctgggtcaagcaggccggagaaactgctgt acatcttcaaacagcctttatgcgccagtgacagacaactcaggagggaagacggctgctcttgcggtccccaggaagagg aaggggatgtgagctgcgcgtgaagtttctgaagtccgatgctctgcatatcagcaggacagaaccagctgtacaac gagctgaatctggccggagagaggaatacagcgtgctggataagaggcggcagagaccagaaatggcgggaagc cacgacggaaaaacccccaggaggggctgataatgaactgcagaaggacaaaatggccgaggcttacagcgaatcggg atgaaggagagagaaggcgggaaaaaggccacgatggactgtatcagggcctgagcactgccaccaaggacacctacga tgctctgcacatgcaggcactgccaccaggTGA</p>
SEQ ID NO: 25	<p>MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGKRYFDYWGQTMVTVSSGGGSGGGGSGGGGSSYELTQP PSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNNQRPSGVPDR</p>

	FSGSKSGTSASLAIGGLQSDDEADYYCVAWDDSLNAPVFGGGTKVTVLESKYG PPCPPCPFWVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
SEQ ID NO: 26	ATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCCCATCCCGCCT TCCTGCTGATTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACA GCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGC AGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGG GTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGA AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA AATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGG AAAGCGATACTTTGACTACTGGGGCCAGGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT GGTGGGGGGGGCAGCGGTGGTGGAGGCTCTGGTGGAGGAGGGAGCTCCTAT GAGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACC ATCTCTTGTTCTGGAGGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAACTGGT TCCGGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCAACTCCTCGTTTATTTTAATAATCA GCGACCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCG GCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGACTATTACT GTGTAGCATGGGATGACTCTCTGAATGCTCCGGTGTTCGGCGGAGGGACCAA GGTCACCGTCCTAGAGAGCAAATATGGACCACCATGCCCTCCATGTCCTTTT TGGGTCCTGGTGGTCGTGGGAGGCGTGCTGGCATGTTATTCTCTGCTGGTCA CAGTGGCTTTCATCATCTTCTGGGTCAAGCGAGGCCGGAAGAACTGCTGTA CATCTTCAAACAGCCTTTTATGCGCCAGTGCAGACAACTCAGGAGGAAGAC GGCTGCTCTTGTCGGTTCCCCGAGGAAGAGGAAGGGGGATGTGAGCTGCGC GTGAAGTTTTCTCGAAGTGCCGATGCTCCTGCATATCAGCAGGGACAGAACC AGCTGTACAACGAGCTGAATCTGGGCCGGAGAGAGGAATACGACGTGCTGG ATAAGAGGCGCGGCAGAGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCACGACGGAAA AACCCCCAGGAGGGGCTGTATAATGAACTGCAGAAGGACAAAATGGCCGAG GCTTACAGCGAAATCGGGATGAAGGGAGAGAGAAGGCGCGGAAAAGGCCA CGATGGACTGTATCAGGGCCTGAGCACTGCCACCAAGGACACCTACGATGCT CTGCACATGCAGGCACTGCCACCCAGG

SEQ ID NO: 27	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGKRYFDYW GQGMVTVSS
SEQ ID NO: 28	SYELTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNNQR PSGVPDRFSGSKSGTSASLAIGGLQSDDEADYYCVAWDDSLNAPVFGGGTKVT VL
SEQ ID NO: 29	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGRYFDYW GQGMVTVSS
SEQ ID NO: 30	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSDIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYNNQR PSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDRMYS PVFGGGTKLTV L
SEQ ID NO: 31	DVVMTQSPLSLPVTPEP ASISCRSSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYK VSNRFSGVPDRFSGSGS GTFDLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHPPTFGQGTKLE IKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDYEMH WVRQAPGQGLEWMGALDPKTGDTA YSQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLT SEDTAVYYCTRFYSYTYWGQGLTVSS
SEQ ID NO: 32	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFT FSSYGLHWVRQAPGKGLEWVAAISY DGSKKYYADSVKGRLTISRDN SKNTLYLQMNSLRPDDTALYFCARGWFVEPLS WGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNI GSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDE ADYYCAA WDDSLNGYVFGTGKLTVL
SEQ ID NO: 33	gaggtgcagctgttgagctgggggaggcttggtacagcctggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacc tttagcagctatgccatgagctgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcagctattagtggtagtggtgg agcacatactacgcagactccgtgaagggccggtccacatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaac agcctgagagccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagaggaaagc gatactttgactactggggccaggggacaatgg tcaccgtctcagtggtgggggggagcgggtggtggaggctctggtggaggaggagctcctatgagctgactcagccac cctcagcgtctgggacccccgggcagagggcaccatctctgttctggaggcagctccaacatcggaaagtaatactgtaaac ggftccggcagctcccaggaacggccccaaactcctcgtttatftaataatcagc gaccctcaggggtccctgaccgattctct ggctccaagtctggcacctcggcctcctggccatcgggtgggctccagctgacgatgaggctgactattactgttagcatgg gatgactctctgaatgctccggtgttcggcggagggaaccaaggtcaccgtccta
SEQ ID NO: 34	gaggtccagctgctggagagcggaggaggactggtgcagcctggaggaagtctgcgactgtcatgcgccgtagcggcttc acctcagctcctatgcaatgagctgggtgcgacaggcaccaggcaaggggctggagtgggtctccgctatctccggctctgg aggctctacttactatgcagacagtgtaaggggagggtcacaatctccagagataactctaagaacactctgtacctgcagatg

	aactctctgagagctgaggacaccgagtgactattgcccaagggcaaaaggtactttgattattggggacagggcactatg gtgaccgtctctagtggaggagggaagcggaggaggaggatccggcggaggaggcagtcagtcagtgctgacacagc cacctagcgcctccggaaccccaggacagcgggtcacaatctctttagtgaggggatcaagcgacattgggagcaacaccgt gaattggtatcagcagctgctggaacagctccaaagctgctgatctactataacaatcagaggccctccggcgtccctgatcg cttctcaggcagcaaatccgggacttctgcaagtctggcattagtgccctgcagtcagaggacgaagccgattactattgtgct acctgggacgataggatgactctcccgtgttcggcgggggaacaaagctgactgtcctg
SEQ ID NO: 35	gatgtcgtgatgacgcagagccctctctcttcccgttaccctgggaacccgcatcaataagtgccgctccagtcactact gtacattcaaatcgcaatacctacctgcactggatttgcagaagccgggacaatccctcaattgttgatataaggtatcaat cgcttttctggagttcctgatagattcagcggatccgggtctggactgatttactctgaaaatatccagggtcgaagctgagga cgtaggcgtatattattgctctcagaacacgcatgtcccgccacttccggcaggcactaaacttgagatcaagggtggggg gggcagcgggtggaggctctgggtggaggaggagccagggtccaactcgttcaaaagtggcgcagaggtcaaaaagccag gcgcgagcgttaaagtatcatgtaaggccagcgggtatactttcactgattatgaaatgactgggtgcgacaagccccgggc aaggctttagtgatgggtgacttgatcaaaaactggggatactgctatagccagaattcaaaagggcgcgtcacactca ctgccgacaaaagtacgagcacagcttatatggaattgagttcactgacgagcaggatacggcagtttattactgtacgcgctt ctactcttactattgggggcaaggcactttggttactgtcctct
SEQ ID NO: 36	cagggtccagcttgtgcaagcggaggaggagtggtacagcctggccgctctttgagactgtcttgtcggccagtggattaca ttctctttatgggttcattgggtcagacaagcaccgggcaaaaggattggaatgggtcgcggccattagctatgatggctcaa agaaatattatgccgattccgtaaaaggaggtgacaataagccgggataacagcaagaacactttgtatctcagatgaatag cctccgaccggacgacacggcactgtatTTTTgcgcacgcgggtggtttagaaccctgagttggggacaaggtactcttgc acgggtatcttctggcggagggtgggagtggtgggggtggcagtgccgggggtgggtcacaagcgtgcttacacaacctcct ctgcgagcggaaactccgggacaacgggttacgatttcatgctccggctcaagtagcaatataggatcaatacagtgaattggt atcaacaactccctggcacagcggccaagctgctgatctacttaataaccagaggccgagtggtgtgccagataggttcagtg gctctaaatcaggtactagcgcgagcctcgccatttcaggactcaatcagaggatgaagcggactactactgtccgcgtggg atgattcacttaatggatagtttccggaccggaacaaaattgacggattg
SEQ ID NO: 37	GFTFSSYAMS
SEQ ID NO: 38	AISGSGGSTYYADSVKG
SEQ ID NO: 39	GKRYFDY
SEQ ID NO: 40	SGGSSNIGSNTVN

SEQ ID NO: 41	FNNQRPS
SEQ ID NO: 42	VAWDDSLNAPV
SEQ ID NO: 43	SGGSSDIGSNTVN
SEQ ID NO: 44	YNNQRPS
SEQ ID NO: 45	ATWDDRMYSVP
SEQ ID NO: 46	<p>ATGCTGCTGCTGGTGACAAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCCCATCCCGCCT TCCTGCTGATTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACA GCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGC AGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGG GTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGA AGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCA AATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGG AAAGCGATACTTTGACTACTGGGGCCAGGGGACAATGGTCACCGTCTCGAGT GGTGGGGGGGGCAGCGGTGGTGGAGGCTCTGGTGGAGGAGGGAGCTCCTAT GAGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACC ATCTCTTGTTCTGGAGGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTAAACTGGT TCCGGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCAAACTCCTCGTTTATTTAATAATCA GCGACCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCG GCCTCCCTGGCCATCGGTGGGCTCCAGTCTGACGATGAGGCTGACTATTACT GTGTAGCATGGGATGACTCTCTGAATGCTCCGGTGTTCGGCGGAGGGACCAA GGTCACCGTCCTAGAGAGCAAATATGGACCACCATGCCCTCCATGTCCTTTT TGGGTCTTGGTGGTTCGTGGGAGGCGTGCTGGCATGTTATTCTCTGCTGGTCA CAGTGGCTTTCATCATCTTCTGGGTCAAGCGAGGCCGGAAGAACTGCTGTA CATCTTCAAACAGCCTTTTATGCGCCAGTGCAGACAACTCAGGAGGAAGAC GGCTGCTCTTGTCGGTTCCCCGAGGAAGAGGAAGGGGGATGTGAGCTGCGC GTGAAGTTTTCTCGAAGTGCCGATGCTCCTGCATATCAGCAGGGACAGAACC</p>

	<p>AGCTGTACAACGAGCTGAATCTGGGCCGGAGAGAGGAATACGACGTGCTGG ATAAGAGGGCGCGGCAGAGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCACGACGGAAA AACCCCCAGGAGGGGCTGTATAATGAACTGCAGAAGGACAAAATGGCCGAG GCTTACAGCGAAATCGGGATGAAGGGAGAGAGAAGGCGCGGAAAAGGCCA CGATGGACTGTATCAGGGCCTGAGCACTGCCACCAAGGACACCTACGATGCT CTGCACATGCAGGCACTGCCACCCAGGGGTAGCGGCGAGGGCAGAGGAAGT CTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTATGGGTCGGGGGC TGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCACATCGTCCTGTGGACGCGTATCGCCAG CACGATCCCACCGCACGTTTCAGAAGTTCGGTTAATAACGACATGATAGTCACT GACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACCTGTGTAAATTTTGTGATGTGA GATTTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCAC CTCCATCTGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAGAAAGAAT GACGAGAACATAACACTAGAGACAGTTTGCCATGACCCCAAGCTCCCCTACC ATGACTTTATTCTGGAAGATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATTATGAAGGAAAA AAAAAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCCCTGTAGCTCTGATGAGTGC AATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAATATAACACCAGCAATCCTGACTTGT TGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAGT TGCCATATCTGTCATCATCATCTTCTACTGCTACCGCGTTAACCGGCAG</p>
SEQ ID NO: 47	<p>MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGKRYFDYWGQGMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQP PSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGSNTVNWFRQLPGTAPKLLVYFNNQRPSGVPDR FSGSKSGTSASLAIGGLQSDDEADYYCVAWDDSLNAPVFGGGTKVTVLESKYG PPCPPCFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY DV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGEGRGSLTTCGDVEENPGPMGRGLL RGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFST CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKN DENITLETVCHDPKLPYHDFILED AASPKCIMKEKKKPGETFFMCS SCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDL LLVIFQVTGISL LPPLGVAISVIIIIFYCYRVNRQ</p>

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 переменный 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 содержащая 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, дополнительно содержащая 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 рецептор TGF- β типа 2 (TGF β RIIDN).
13. Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты по п. 1, кодируемая 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 Igc, 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.
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 TGF β RIIDN, 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 переменный фрагмент (scFv).
20. Клетка, содержащая
химерный антигенный рецептор (CAR) для GPC3, содержащий
антигенсвязывающий домен, где антигенсвязывающий домен предусматривает антитело, Fab или scFv, содержащие переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL),
где VH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39, и
где VL содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 43, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 44, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 45; и
армирующую молекулу TGF β RIIDN.
21. Клетка по п. 20, где VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 29.
22. Клетка по п. 20, где VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 30.

23. Клетка по любому из пп. 20-22, где химерный антигенный рецептор (CAR) для GPC3 и армирующие молекулы TGF β RIIDN содержат 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, где клетка содержит

а) химерный антигенный рецептор (CAR), специфический в отношении антигена клеточной поверхности, и

б) 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, SSX2, STEAP1, STEAP2, TACI, TIM3, TRBC1, VEGFR-2, EPCAM1, VCAM1, VIPR2, MAGЕ-A1, MAGЕ-A3, MAGЕ-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 TGF β RIIDN.

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

29. Способ по п. 31, 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.

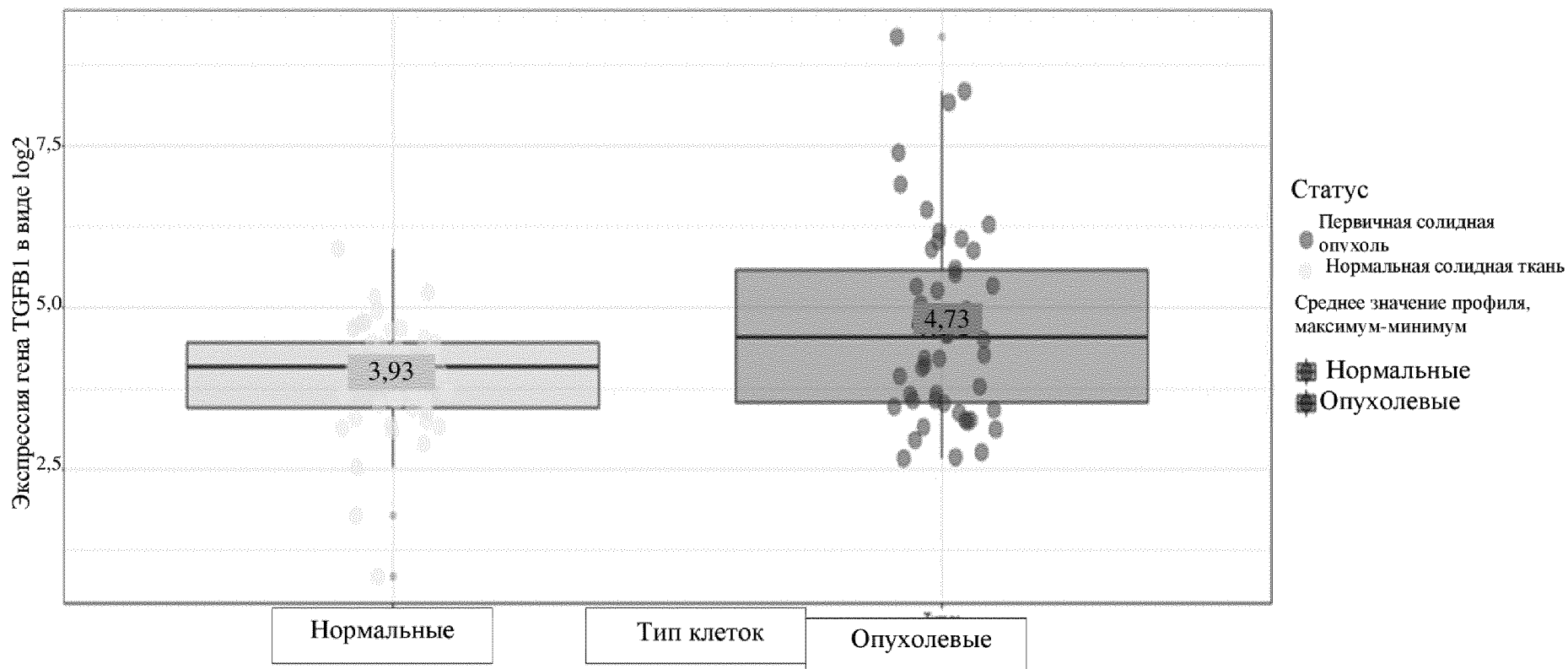
31. Способ по любому из пп. 25-30, где рак представляет собой солидную опухоль.

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.

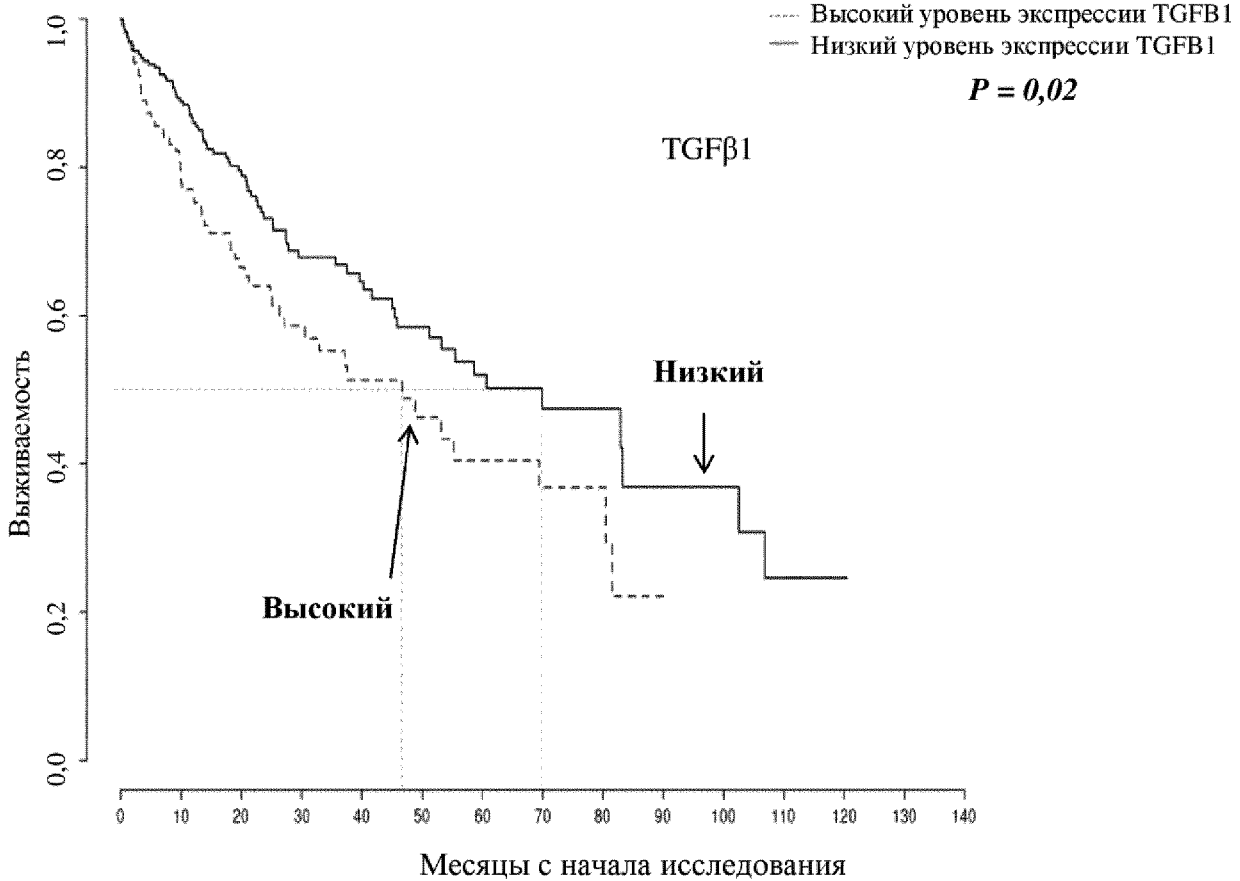
34. Способ по любому из пп. 26-33, дополнительно включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества противоракового антитела и/или химиотерапевтического компонента.

TGFβ1
Данные по экспрессии TGFβ1 в НСС, сгруппированные с учетом типа клеток
Кратное изменение (опухолевые по сравнению с нормальными) = 1,743,
P = 0,00472328730971769



Фиг. 1А

Данные по OS для НСС, сгруппированные с учетом сравнения высокого уровня экспрессии TGFB1 с низким уровнем экспрессии TGFB1



126	91	55	36	25	17	12	10	7	1			
238	191	122	72	57	43	28	17	9	7	6	3	1

Высокий уровень экспрессии
Низкий уровень экспрессии

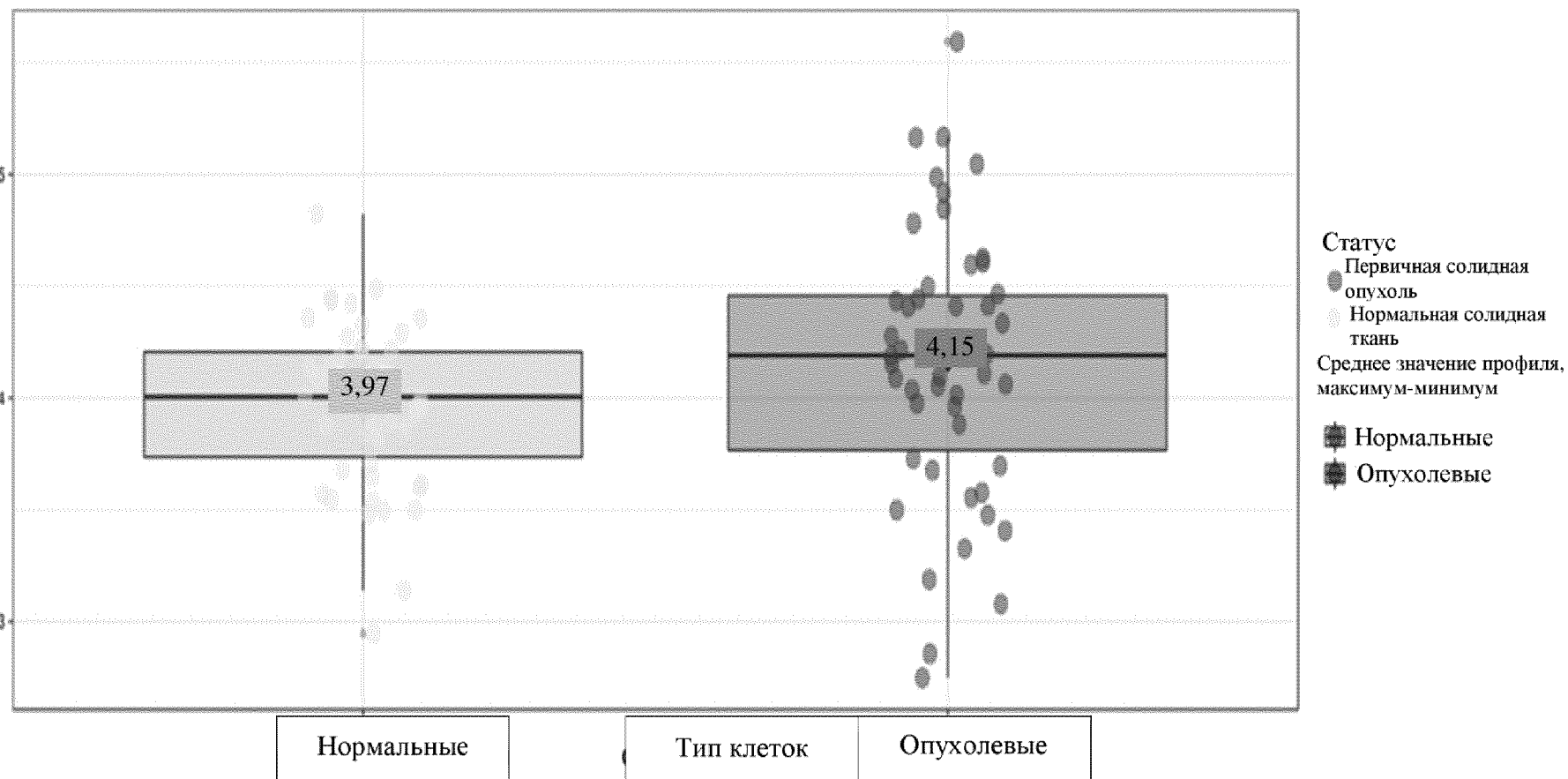
Фиг. 1В

Профиль экспрессии гена TGFβ

Данные по профилю ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА TGF БЕТА, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ СОБОЙ
ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК НСС, сгруппированные с учетом типа клеток

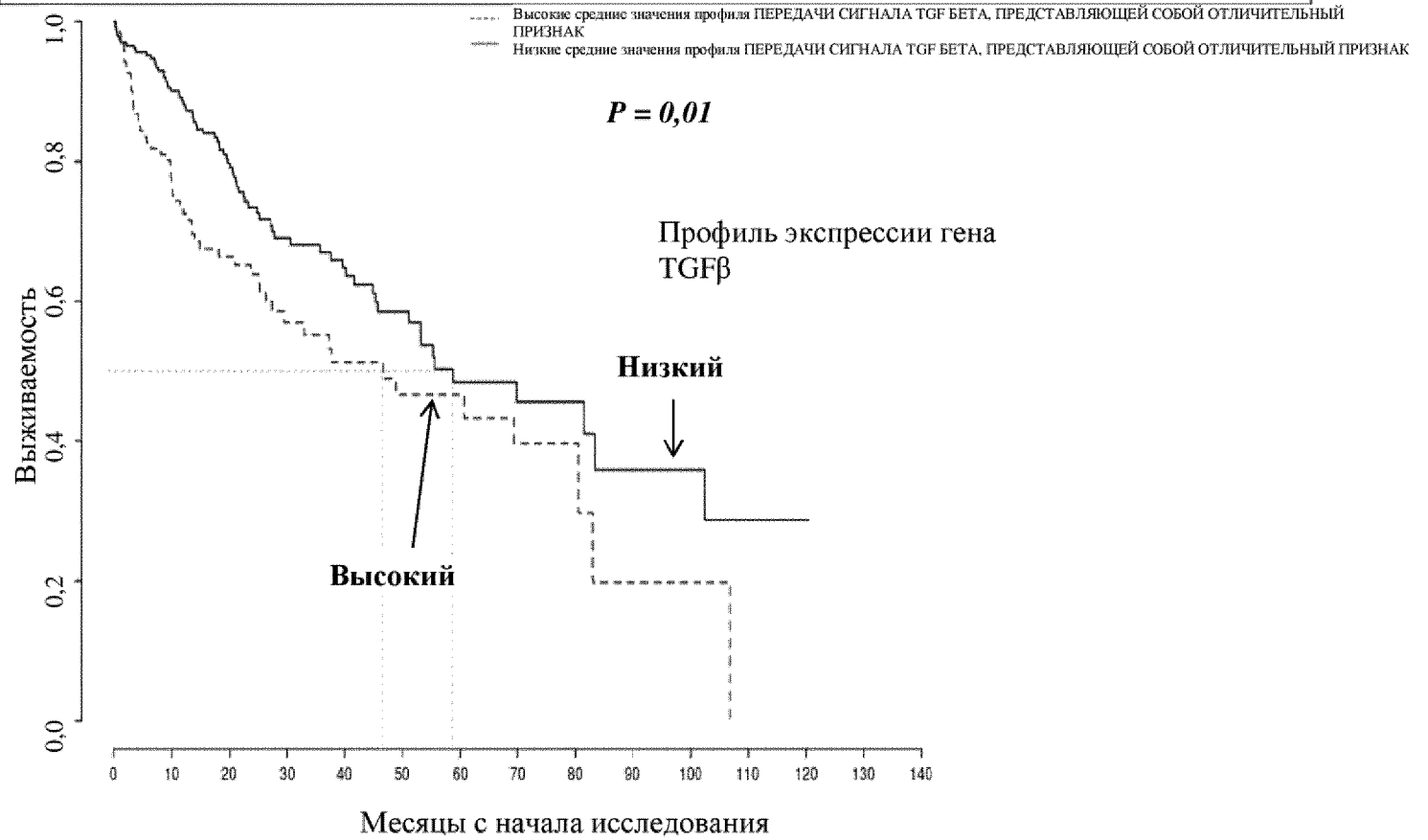
Кратное изменение (опухолевые по сравнению с нормальными) = 1,1317, P = 0,0438013875027299

среднее значение ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА TGF БЕТА, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ СОБОЙ
ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК, в виде log₂



Фиг. 1С

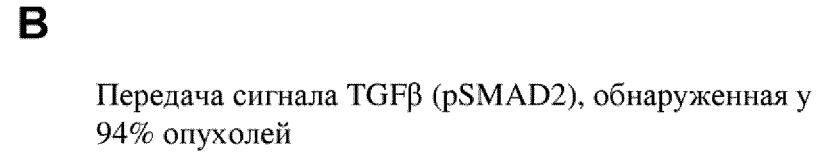
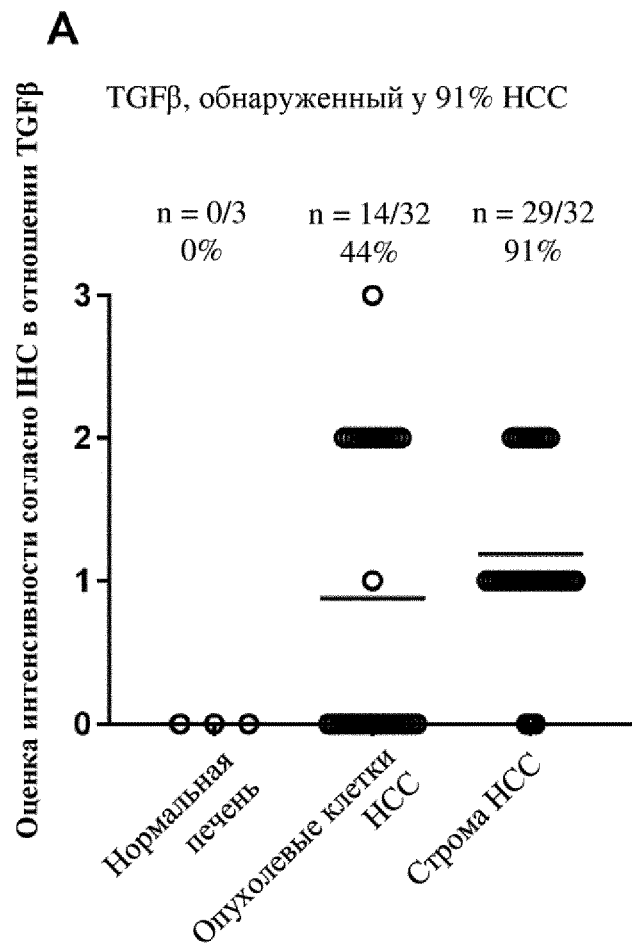
Сгруппированные с учетом ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА TGF БЕТА, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ СОБОЙ ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК, высокие средние значения профиля по сравнению с низкими средними значениями профиля



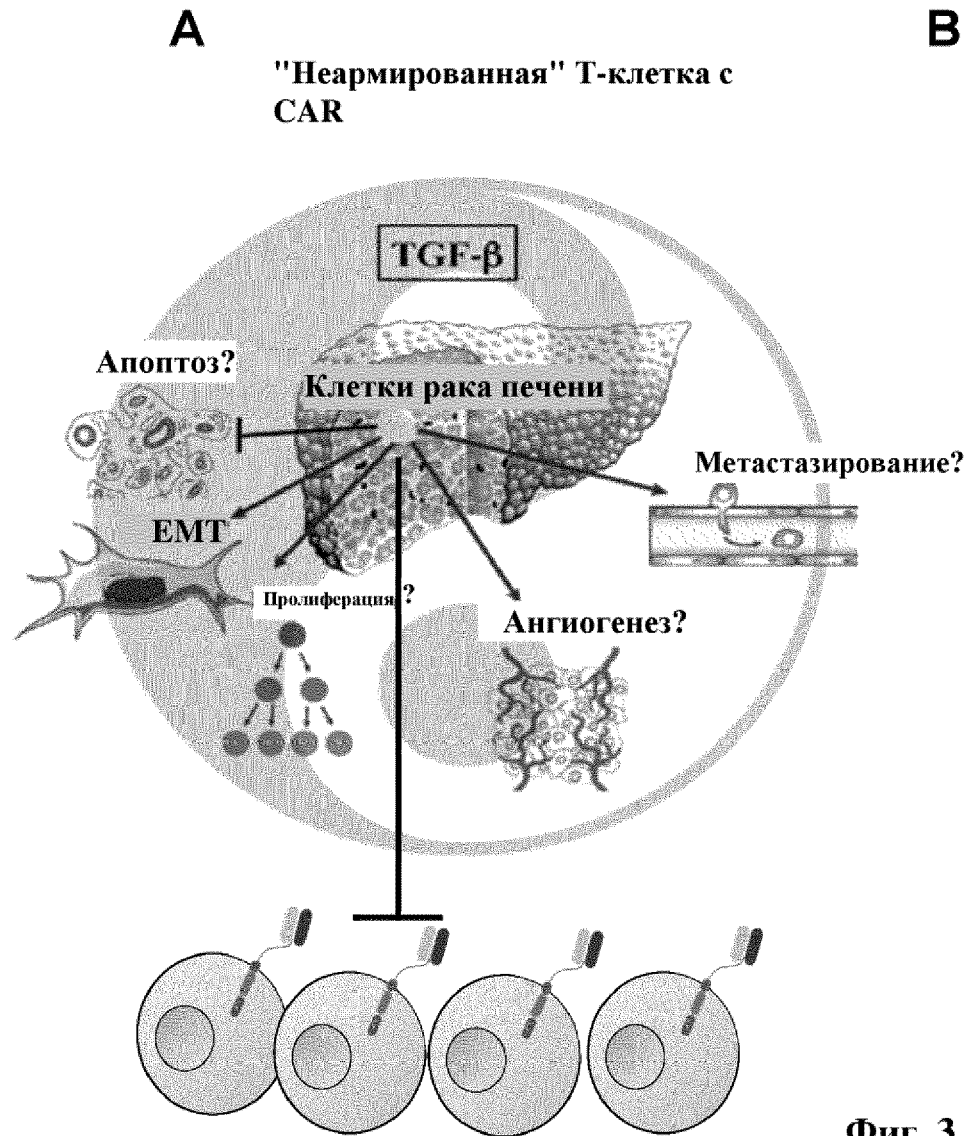
120	91	55	36	26	19	14	11	6	2	1		
200	191	122	72	56	41	26	16	10	6	5	3	1

Высокие средние значения профиля
Низкие средние значения профиля

Фиг. 1D

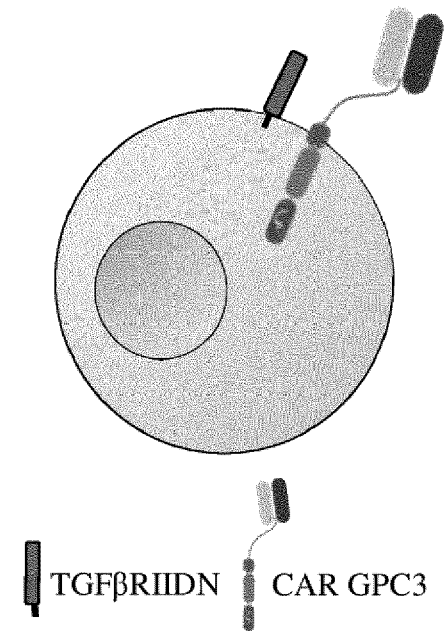


Фиг. 2



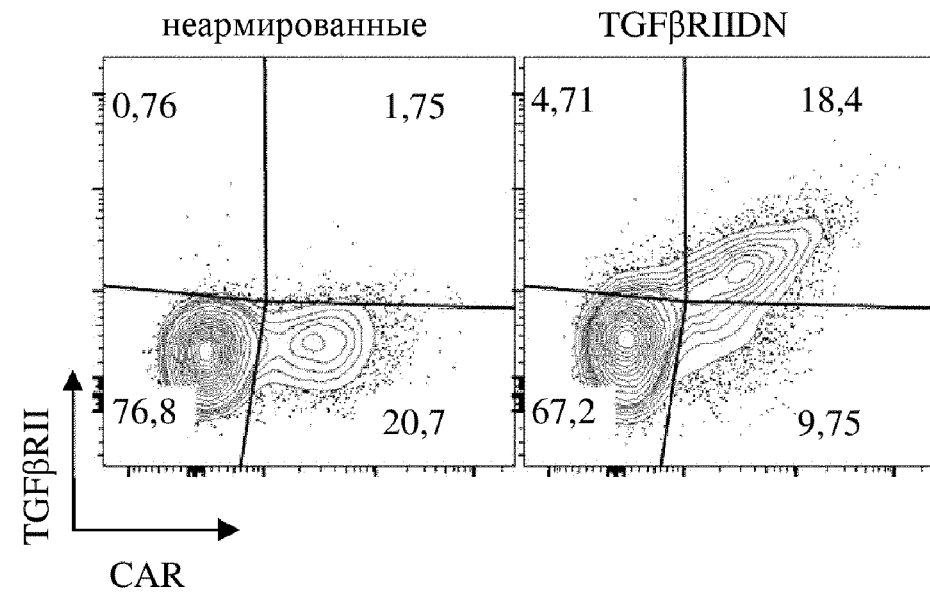
B "Армированная" с помощью TGF β RIIDN Т-клетка с CAR

Армированная с помощью TGF β RIIDN Т-клетка с CAR



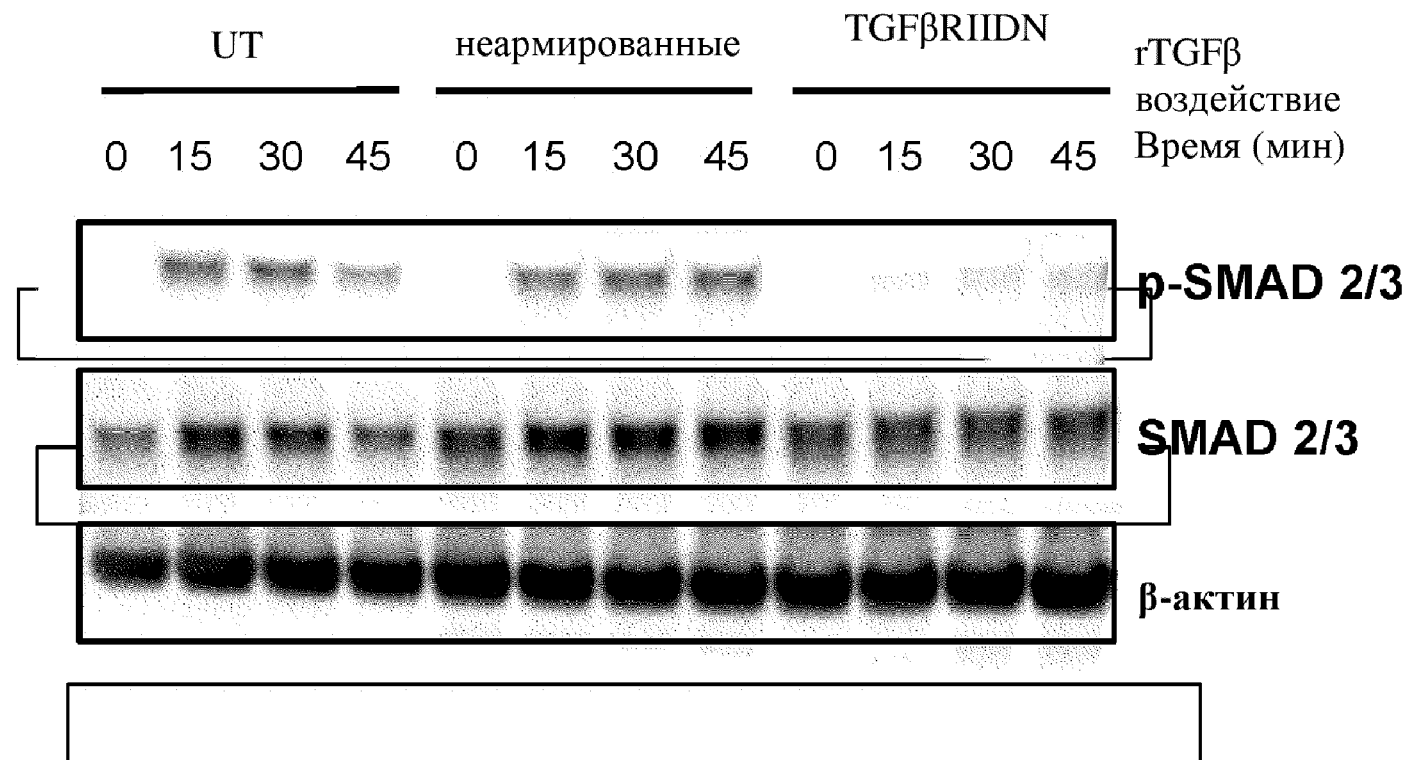
Фиг. 3

Гейтирование: CD8⁺

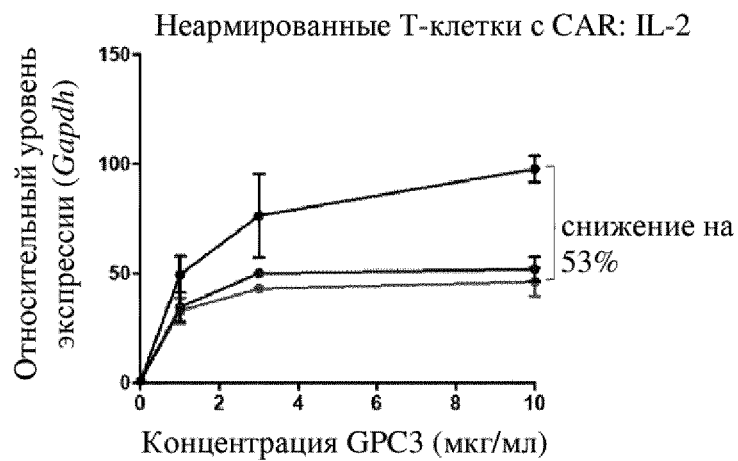
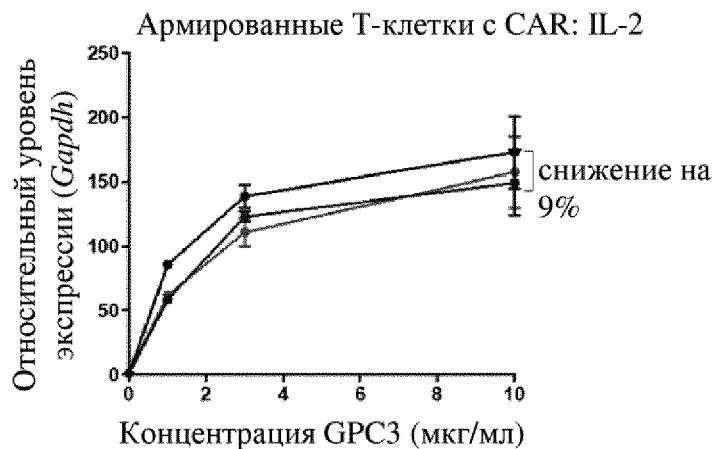
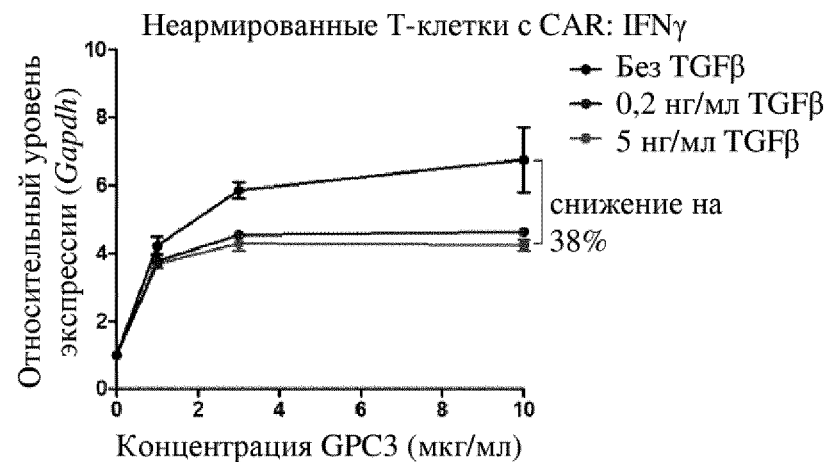


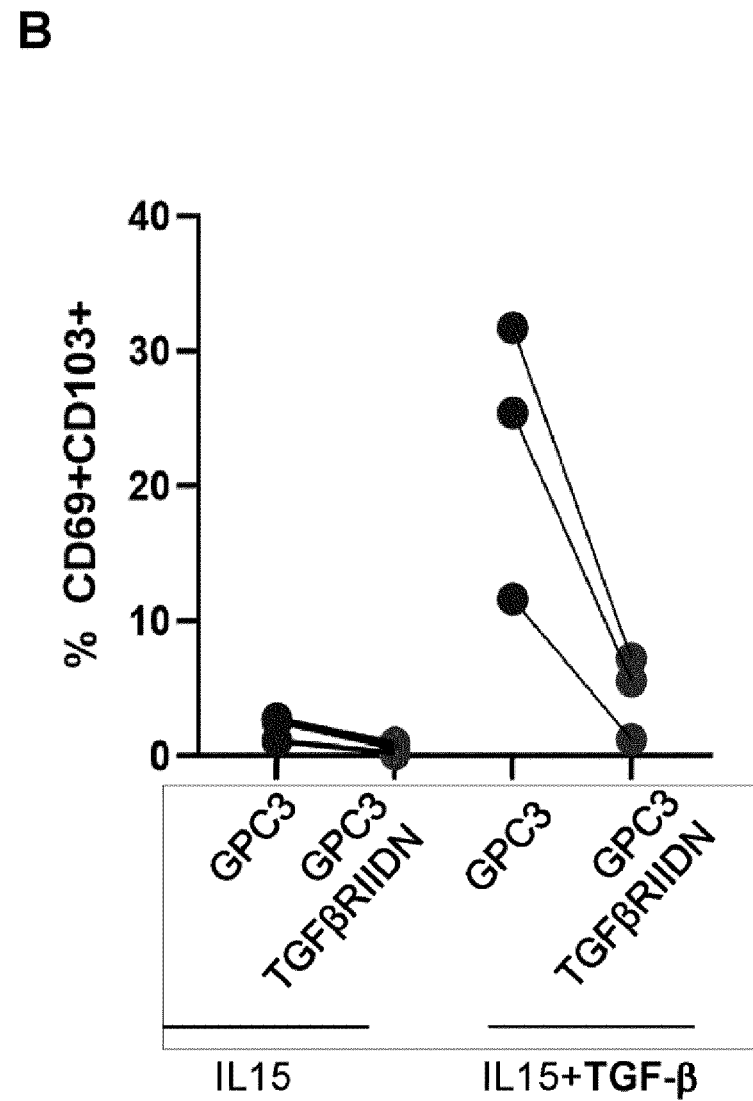
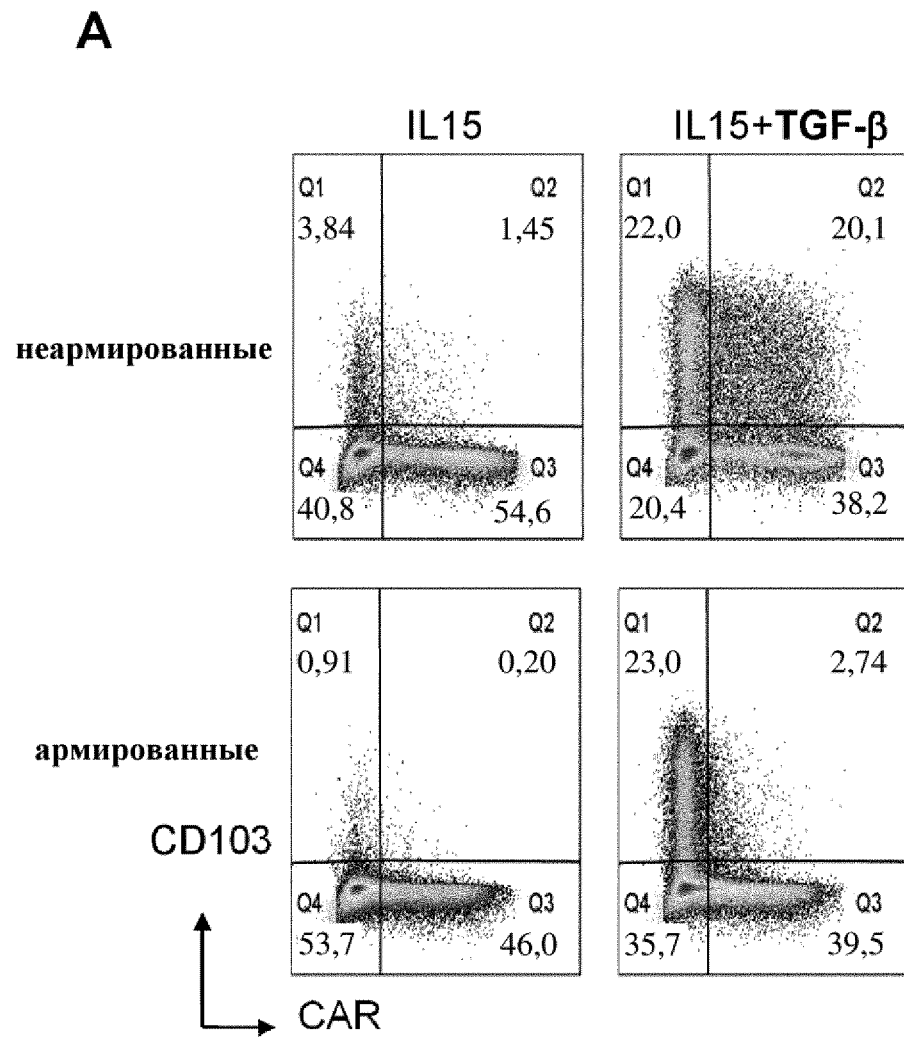
7/23

Фиг. 4

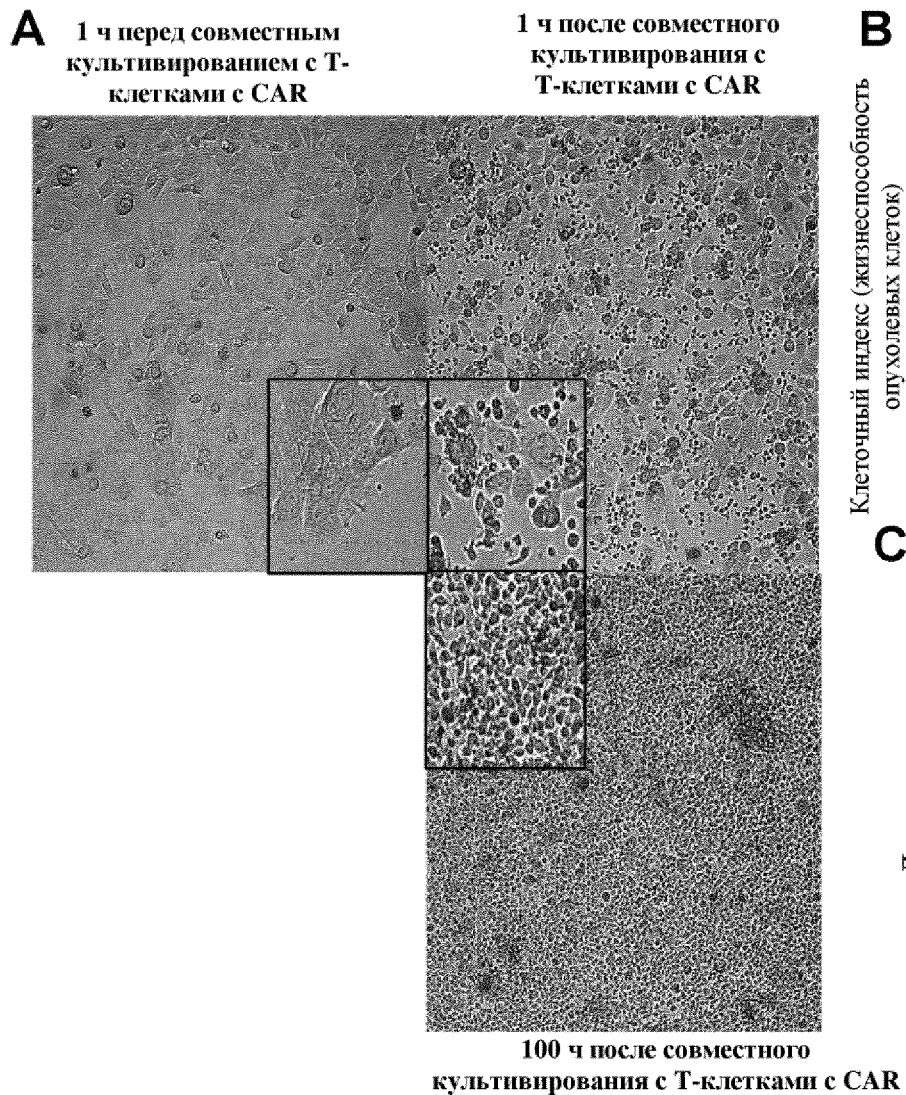


Фиг. 5

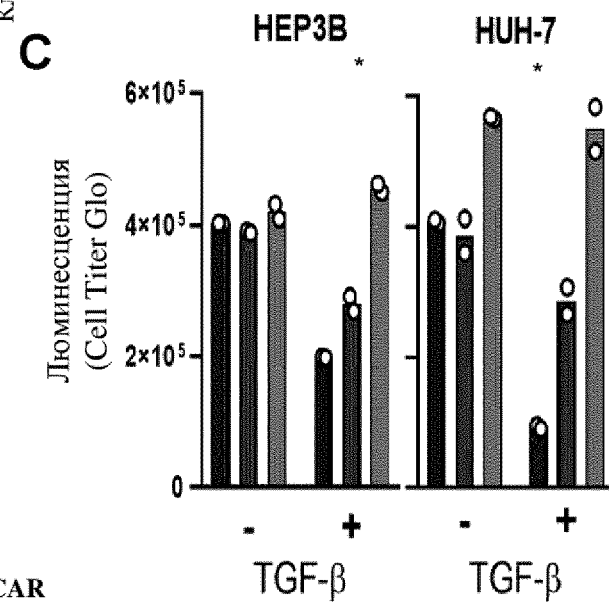
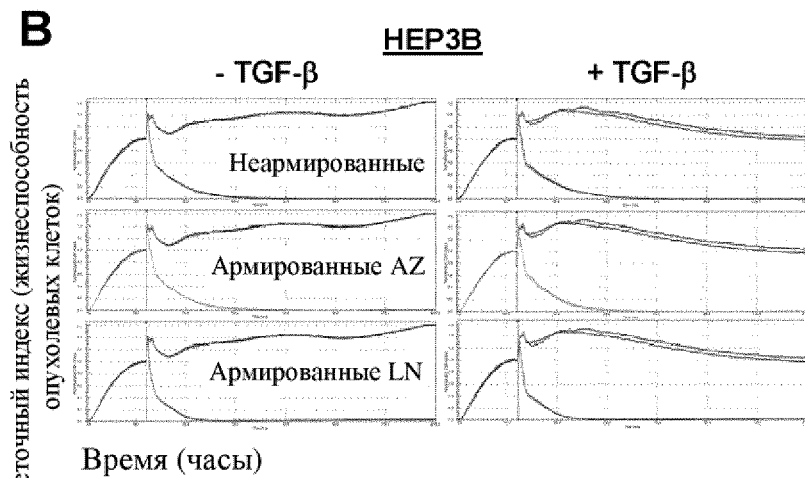
A**B****Фиг. 6**



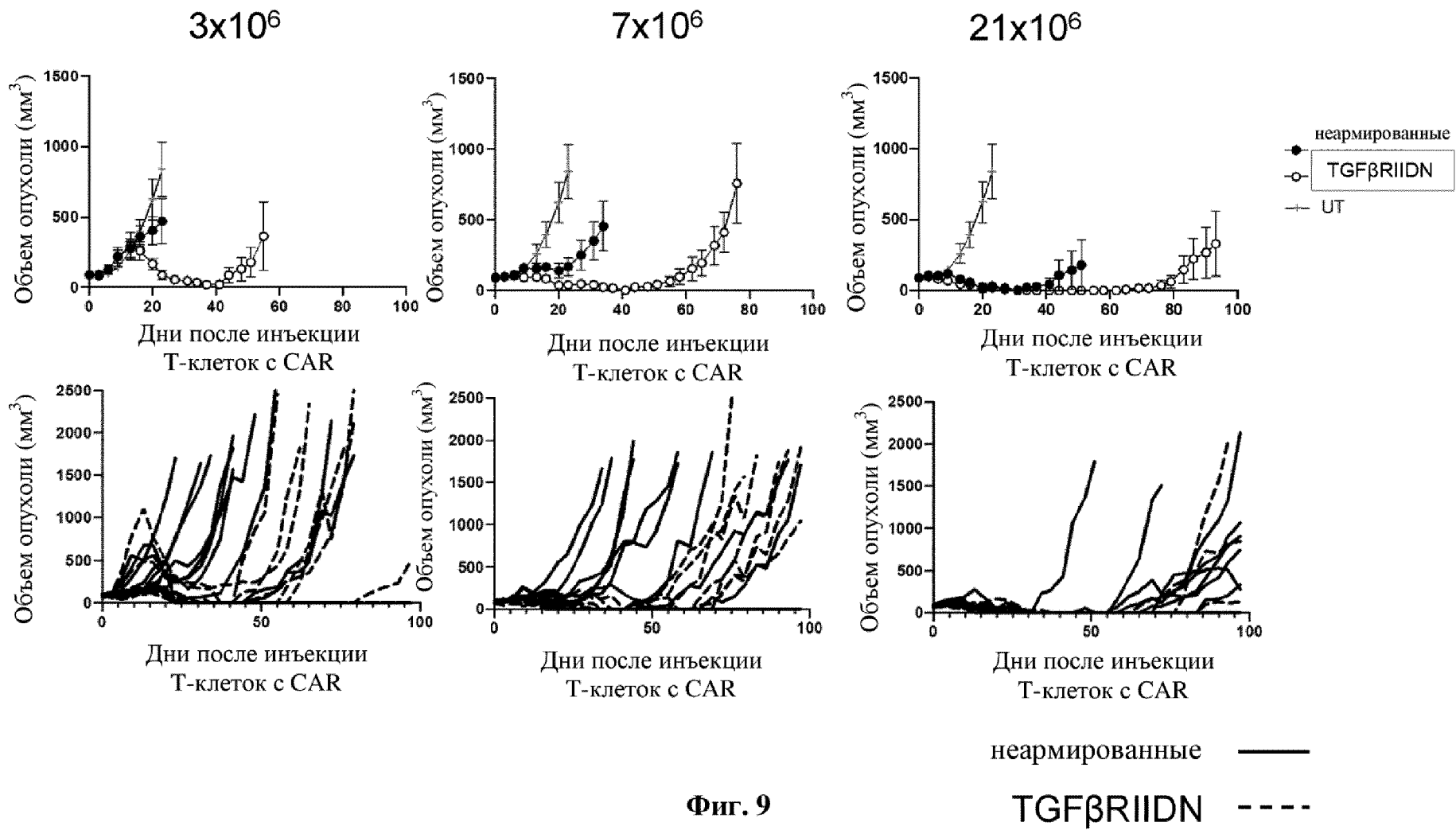
Фиг. 7



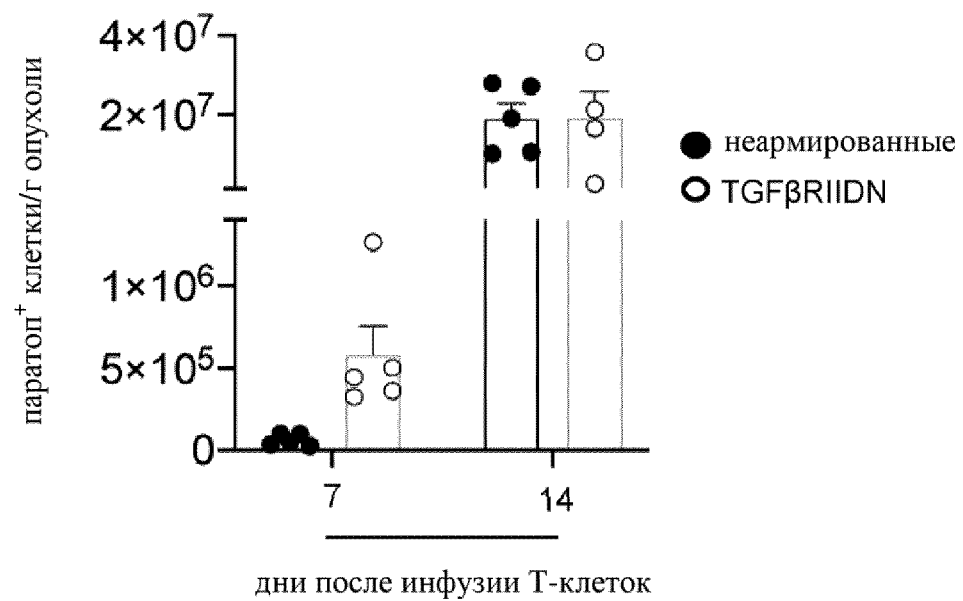
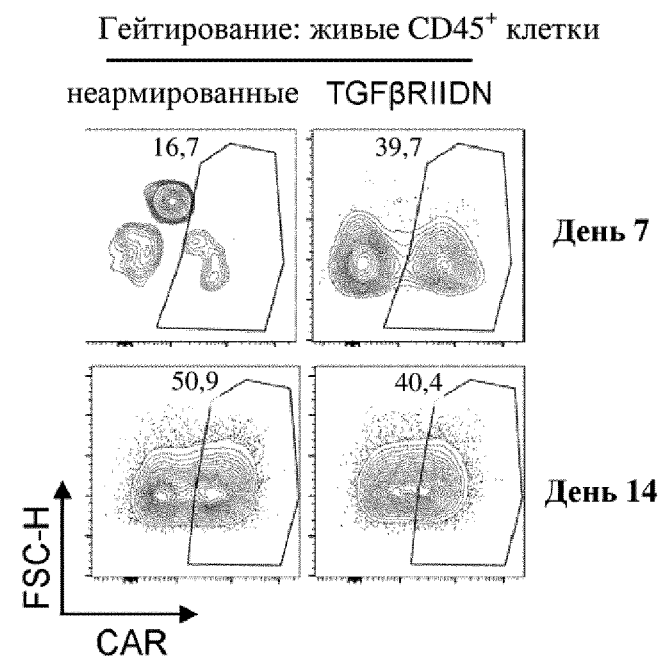
Фиг. 8



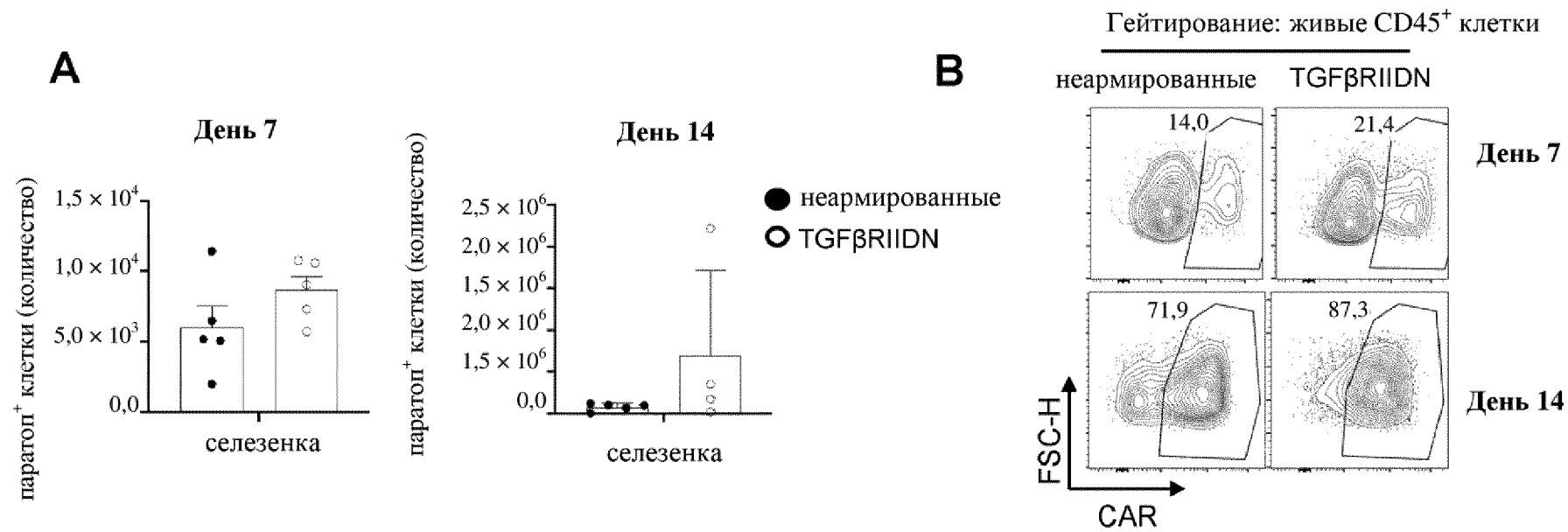
*Порядок столбцов в каждой группе, состоящей из 3 столбцов (от L до R): Неармированные / Армированные AZ / Армированные LN



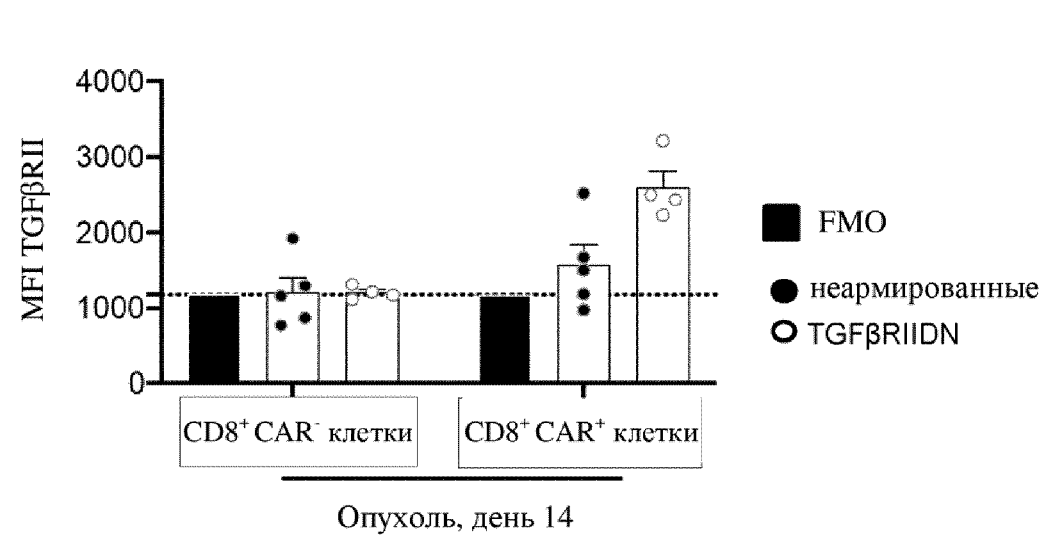
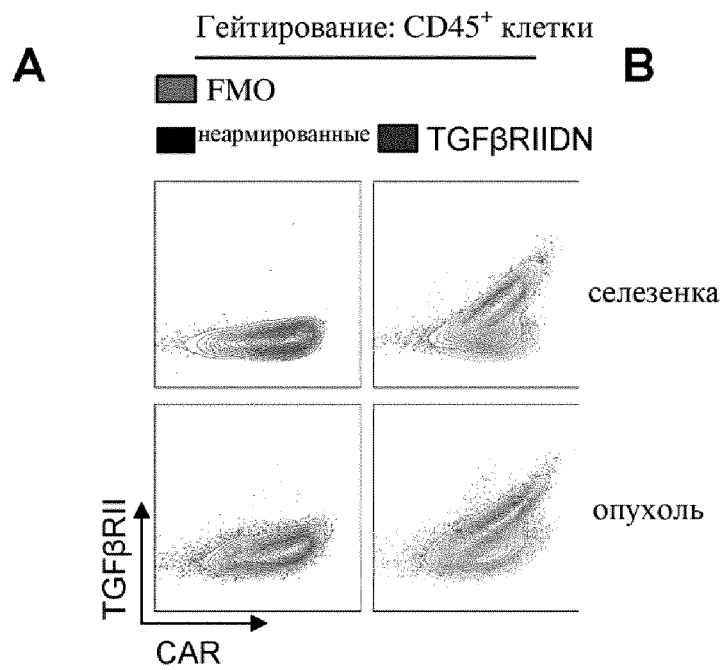
Фиг. 9

A**B**

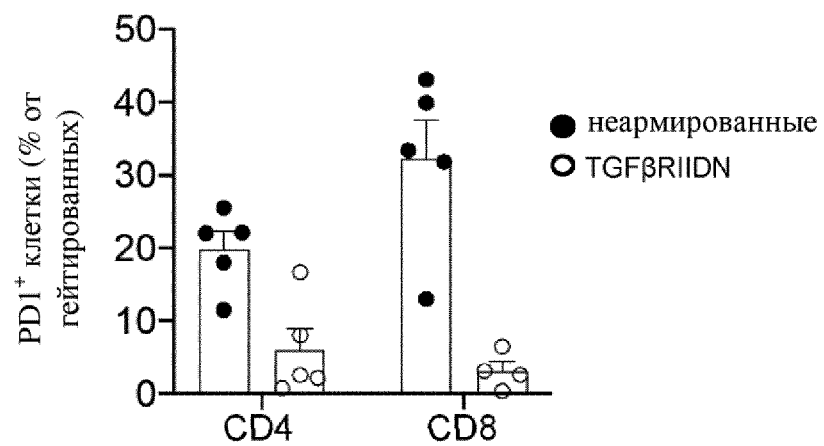
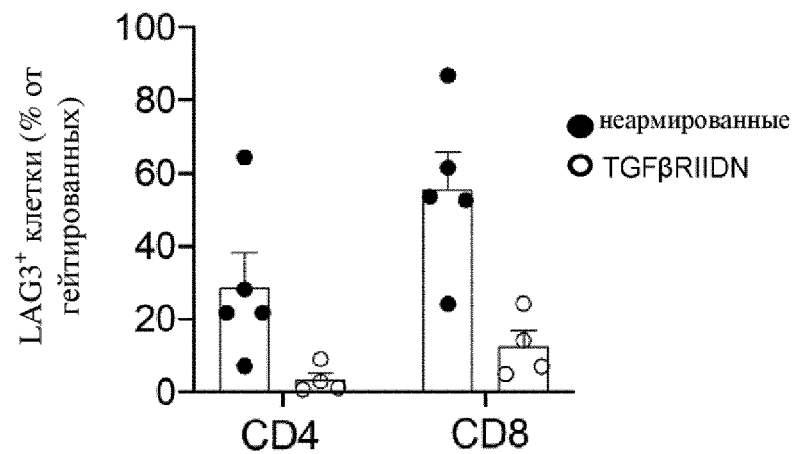
Фиг. 10

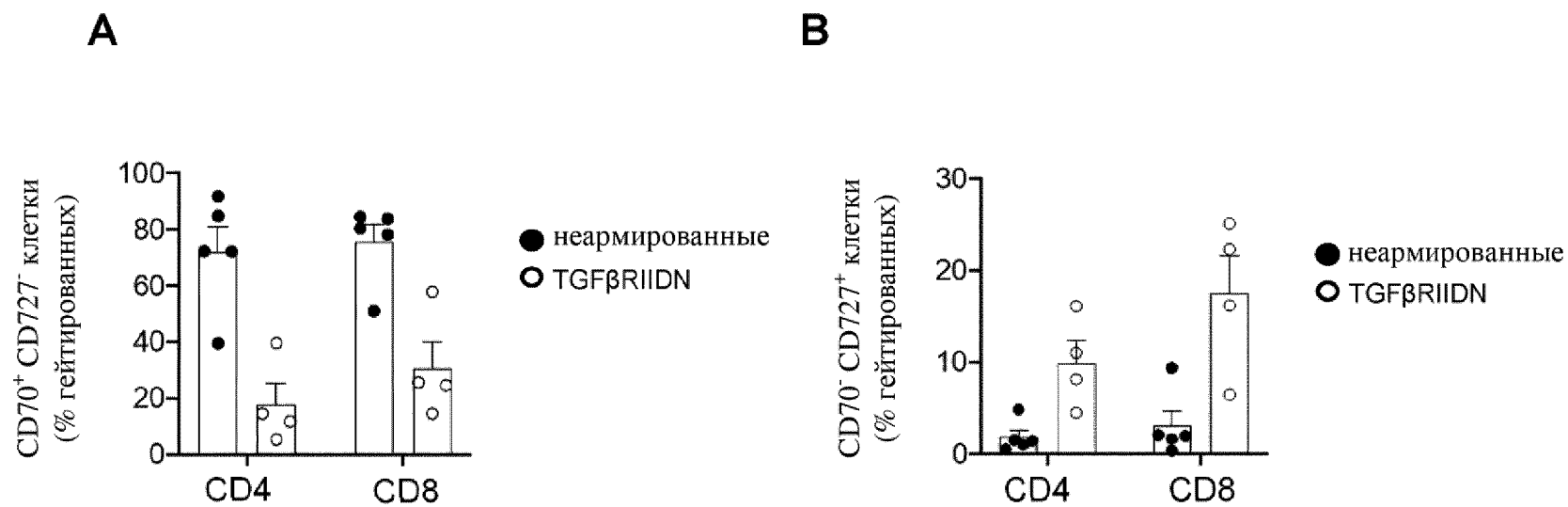


Фиг. 11

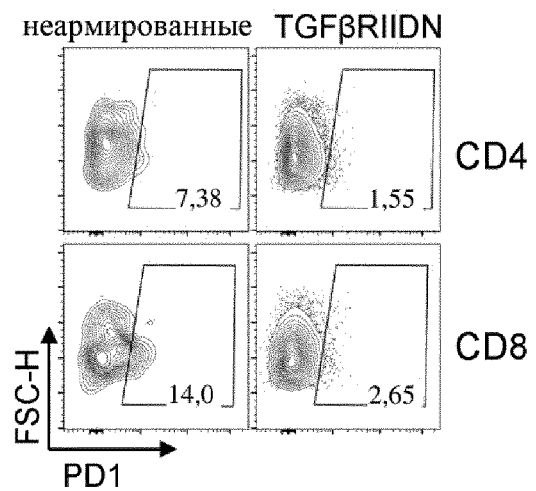
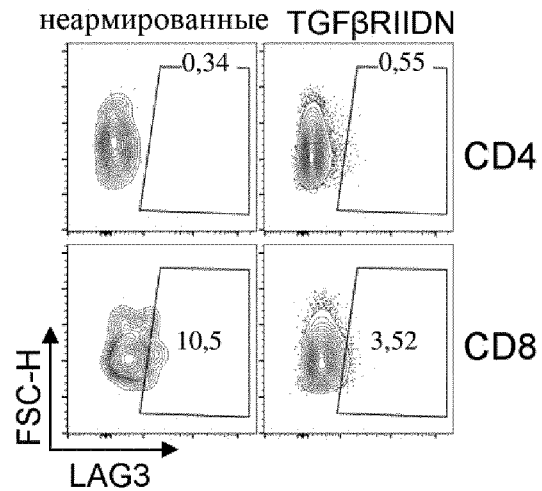
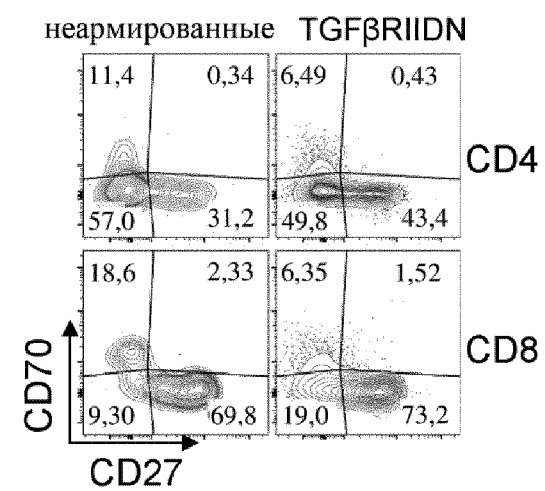


Фиг. 12

A**B****Фиг. 13**

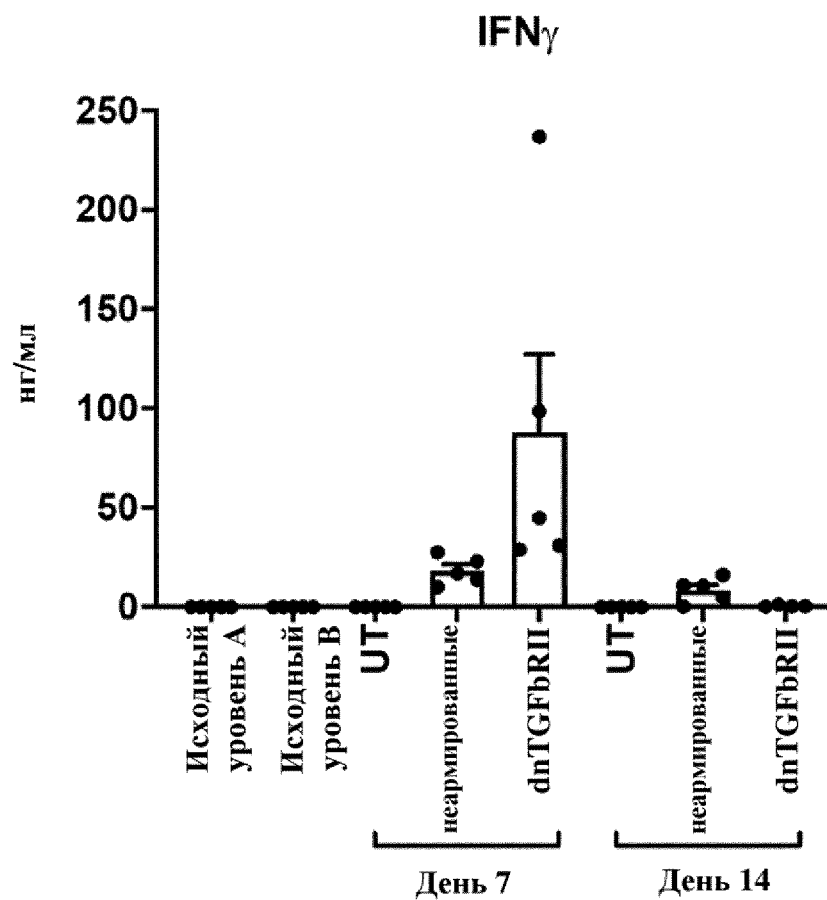


Фиг. 14

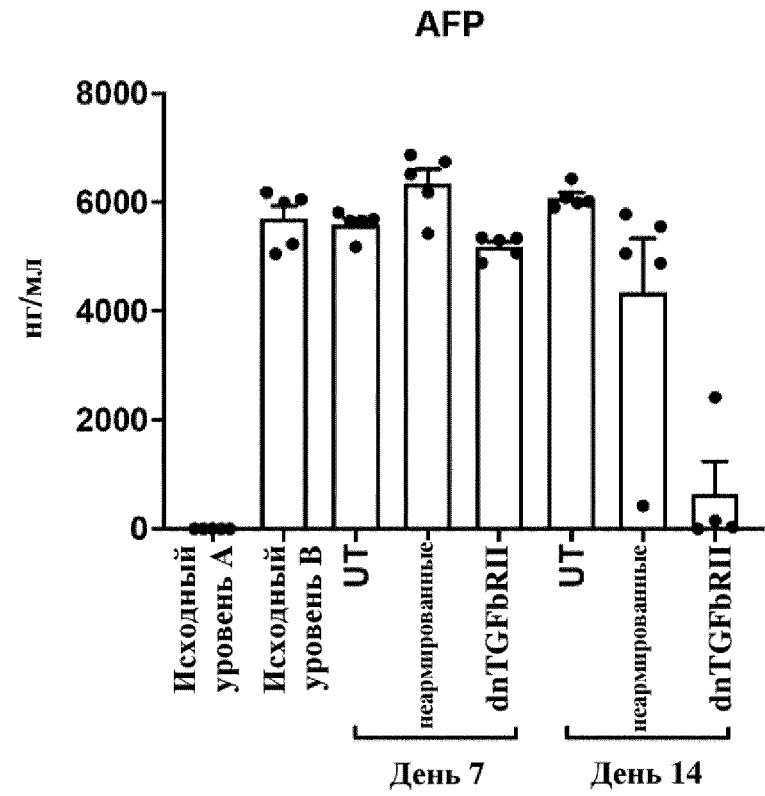
A**B****C**

Фиг. 15

Анализ *ex vivo*: более высокий уровень IFN γ в сыворотке крови мышей, получивших обработку с помощью армированных Т-клеток с CAR

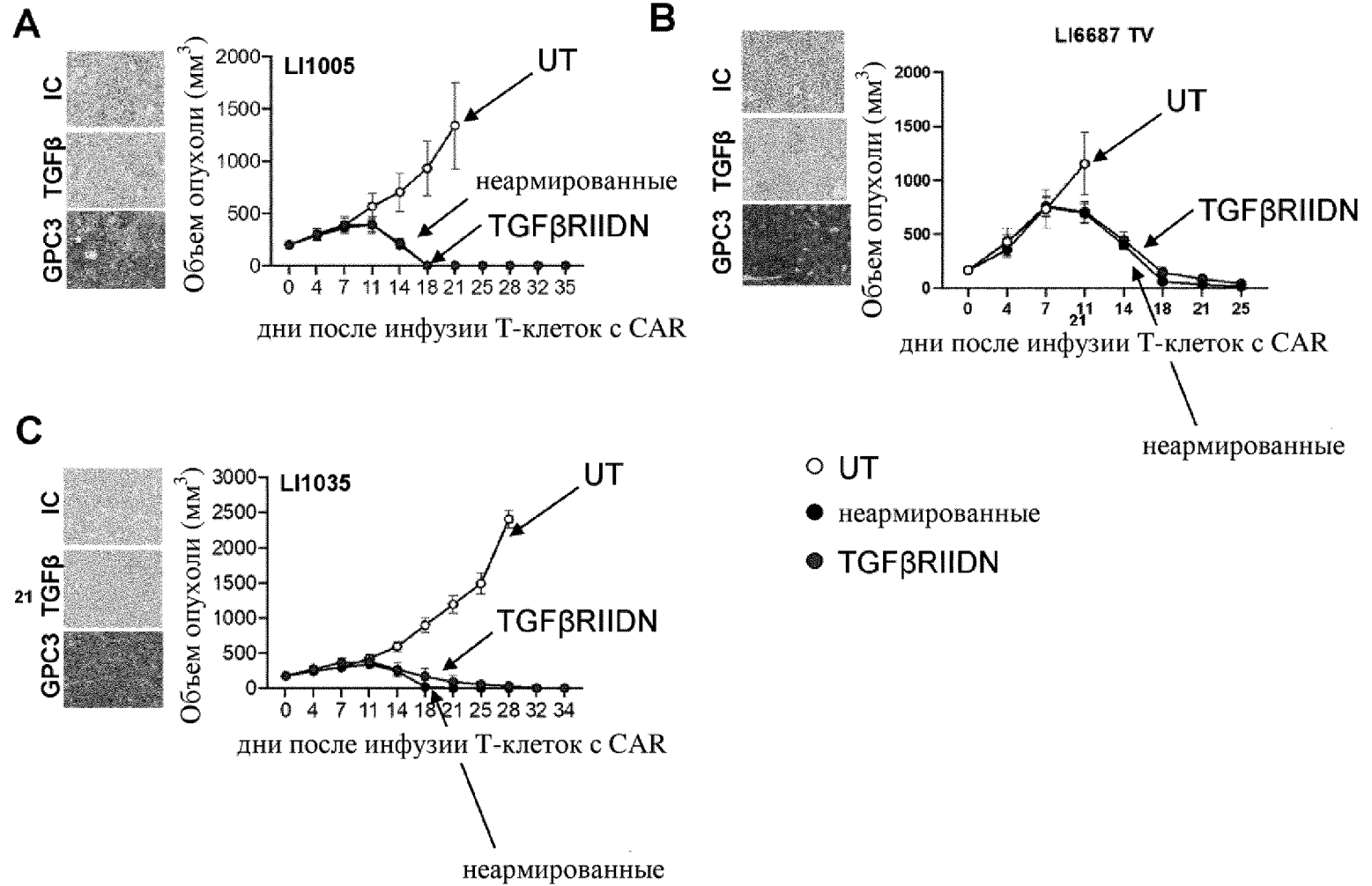


Фиг. 16



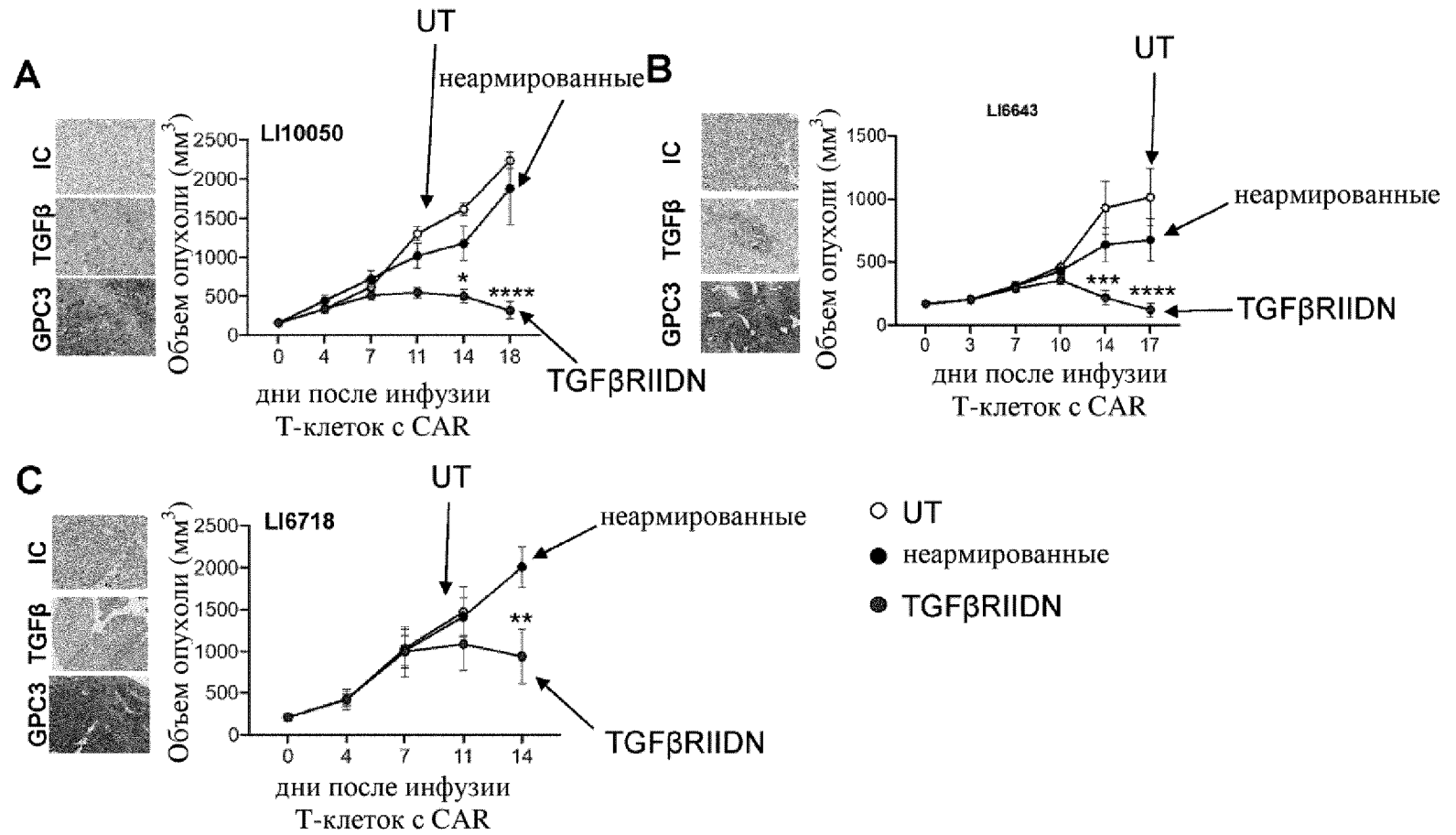
Фиг. 17

Оценка H для TGFβ < 5



Фиг. 18

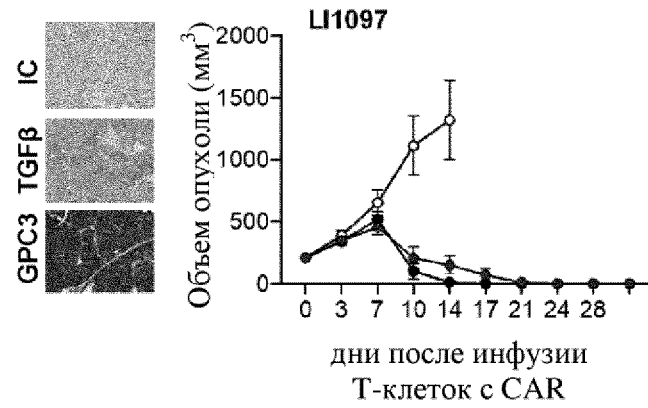
Оценка H для $TGF\beta > 20$



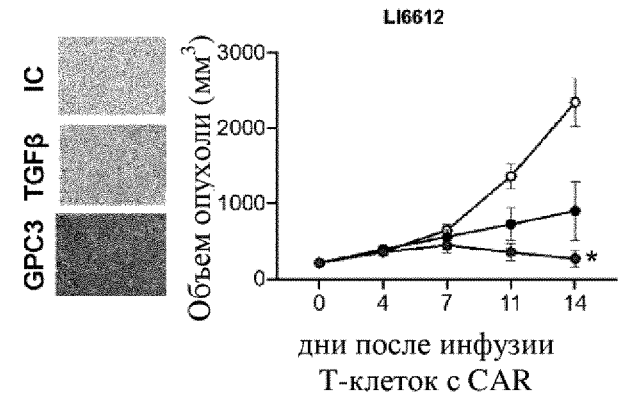
Фиг. 19

Оценка N для TGFβ > 20

D



E



Фиг. 19 (продолж.)