

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293209 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.02

(22) Дата подачи заявки
2021.05.06

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ АНТИГЕНОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/021,215; 62/706,131; 63/198,420;
63/131,394

(32) 2020.05.07; 2020.08.03; 2020.10.16;
2020.12.29

(33) US

(86) PCT/US2021/031055

(87) WO 2021/226321 2021.11.11

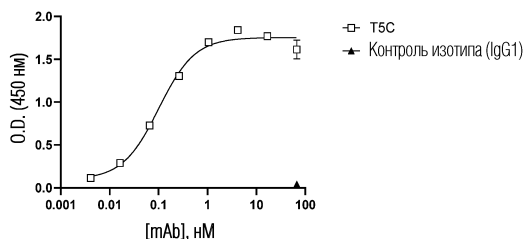
(88) 2021.12.16

(71) Заявитель:
ФЕЙНЗ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
У Хойвэнь, Цзя Хайцюнь, Цзоу Хой,
Ван Минхань (US)

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

(57) Описаны антитела против ТАА и их антигенсвязывающие фрагменты. Также описаны нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, композиции, содержащие антитела, и способы получения антител, и применение антител для лечения или профилактики заболеваний, таких как рак и/или воспалительное заболевание.



A1

202293209

202293209

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 575870EA/061

АНТИТЕЛА ПРОТИВ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ АНТИГЕНОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой США № 63/021215, поданной 7 мая 2020 г.; предварительной заявкой США № 62/706131, поданной 3 августа 2020 г.; предварительной заявкой США № 63/198420, поданной 16 октября 2020 г.; и заявкой США № 63/131394, поданной 29 декабря 2020 г. Описание каждой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам против опухолеассоциированных антигенов (ТАА), нуклеиновым кислотам и векторам экспрессии, кодирующим антитела, рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и композициям, содержащим антитела. Также предложены способы получения антител и способы применения антител для лечения заболеваний, включая рак и воспалительные заболевания и/или связанные с ними осложнения.

ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0003] Данная заявка содержит список последовательностей, который представлен в электронном виде через EFS-Web в виде списка последовательностей в формате ASCII с именем файла «065799.34WO1 Sequence List» и датой создания 28 апреля 2021 г. и размером 150 КБ. Список последовательностей, представленный через EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЮ

[0004] «Опухлеассоциированный антиген (ТАА)» относится к пептиду клеточной поверхности и/или антигену или комбинации пептида клеточной поверхности и/или антигена и его посттрансляционной модифицирующей части (такой как гликозилирование), которые присутствуют на более высоком уровне в опухоли чем в нормальных тканях. Некоторые опухолеассоциированные антигены, присутствующие специфически в опухолях, также известны как опухолеспецифические антигены (TSA). Примерами опухолеассоциированных антигенов являются вирусные белки, кодируемые онкогенными вирусами; мутировавшие онкопротеины или супрессоры опухолей; нормальные белки, сверхэкспрессированные на опухолевых клетках и/или в них; посттрансляционные модификации белков клеточной поверхности; онкофетальные белки, экспрессия которых обычно ограничена на стадиях развития, но не во взрослых тканях; и белки, специфичные для клеточного типа, экспрессия которых ограничена несущественными тканями.

[0005] Тах-взаимодействующий белок 1 (TIP-1, также известный как Tax1bp3 или белок, взаимодействующий с глутаминой, GIP) представляет собой внутриклеточный

белок, содержащий домен PDZ (PSD-95/большие диски/ZO-1 гомологичный) (124 аминокислоты у человека и мыши). Единственный домен PDZ, охватывающий остатки 13-112 белка из 124 аминокислот (Olalla, et al., FEBS Lett 2001; 488:116-122) является единственной функциональной и структурной единицей, которую можно идентифицировать в TIP-1, что предполагает что TIP-1 уникален среди PDZ-содержащих белков и может выполнять свою функцию исключительно посредством межбелковых взаимодействий. TIP-1 взаимодействует со многими внутриклеточными белками через домен PDZ, включая глутаминазу L, β -катенин, FAS, HTLV Tax, HPV E6, Rhotekin и Kir 2.3 (Zoetewey et al., Biochemistry 2011; 50:3528-3539). Однако точная биологическая функция TIP-1 остается неясной. Повышенная экспрессия TIP-1 была обнаружена в клетках инвазивного рака молочной железы человека, и было показано, что она связана с адгезией, миграцией и легочными метастазами опухолевых клеток (Han et al., Biochem Biophys Res Commun 2012; 422:139-145). Недавно было обнаружено, что TIP-1 перемещается на поверхность раковых клеток при индукции облучением (Yan et al., Oncotarget 2016; 7:43352-43362), что позволяет предположить, что TIP-1 может быть раковым неоантигеном при индукции. Таким образом, моноклональное антитело против TIP-1 (mAb) можно использовать для избирательного нацеливания на раковые клетки и в качестве потенциального терапевтического средства.

[0006] Глипикан-3 (GPC3) представляет собой GPI-заякоренный гликопротеин клеточной поверхности, содержащий коровий белок 66 кДа и две полисахаридные цепи гепарансульфата (HS) гликозаминогликанов. Он принадлежит к семейству глипикановых, которое насчитывает 6 членов (от GPC1 до GPC6). GPC3 представляет собой онкофетальный белок, который экспрессируется только во время эмбрионального развития, но сверхэкспрессируется в >70% случаев гепатоцеллюлярной карциномы (НСС) (Baumhoer, D., et al., Am J Clin Pathol. 2008 Jun; 129(6):899-906). Ограниченная экспрессия в раковых клетках делает GPC3 опухолеспецифическим антигеном (TSA), который можно использовать для нацеливания на раковые клетки с помощью терапии на основе моноклональных антител. В дополнение к своей опухолеспецифической экспрессии GPC3 может также способствовать росту опухоли. GPC3 может регулировать пути передачи сигналов Wnt. Коровий белок GPC3 взаимодействует с Wnt и функционирует как корецептор для активации frizzled (FZD) и нижестоящей передачи сигналов через β -катенин и YAP (Capurro, MI, et al., Cancer Res. 2005 Jul 15; 65(14):6245-54). Действительно, передача сигналов Wnt часто активируется при НСС (Khalaf, AM., J Hepatocell Carcinoma. 2018; 5:61-73). Таким образом, GPC3 является многообещающей терапевтической мишенью для лечения НСС и любых других видов рака, гиперэкспрессирующих GPC3.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В одном общем аспекте изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают ТАА, такие как TIP-1 и GPC3.

[0008] Предложены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90, 91 и 92, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112 и 113, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 и 22, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35 и 36, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49 и 50, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62, 63 и 64, соответственно; или
- (7) SEQ ID NO: 73, 74, 75, 76, 77 и 78, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека.

[0009] Предложены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 93, 94, 95, 96, 97 и 98, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 114, 115, 116, 117, 118 и 119, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 и 28, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41 и 42, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55 и 56, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69 и 70, соответственно; или
- (7) SEQ ID NO: 79, 80, 81, 82, 83 и 84, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека.

[0010] Предложены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8, соответственно.

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает TTP-1, предпочтительно, TTP-1 человека.

[0011] Предложены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность

область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

(1) SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13 и 14, соответственно.

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает TTP-1, предпочтительно, TTP-1 человека.

[0012] В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 85, 106, 15, 29, 43, 57, 71 или 1, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 86, 107, 16, 30, 44, 58, 72 или 2.

[0013] В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:85, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:86;

(b) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:106, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:107

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

(d) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:30;

(e) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:43, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:44;

(f) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:58;

(g) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:71, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:72; или

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

[0014] В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с ТАА и способно индуцировать опосредованный эффектором лизис опухолевых клеток посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC); и/или опосредование набора конъюгированных препаратов; и/или образование биспецифического антитела с другим моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом с эффектом уничтожения рака.

[0015] В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

[0016] В некоторых вариантах осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизированное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную какой-либо из SEQ ID NO: 99-102, 120-123, 126-132, 139-140, 143-149, 153-156, 160-163, 183-197 или 202-205, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную какой-либо из SEQ ID NO: 103-105, 124-125, 133-138, 141-142, 150-152, 157-159, 164-166 или 198-201.

[0017] В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизированное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:99, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(2) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:99, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(3) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:100, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(4) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:100, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(5) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:101, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(71) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 187, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 104;

(72) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 187, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200;

(73) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 187, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 199;

(74) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 196, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 201; или

(75) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 197, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 201.

[0018] Предложены также выделенные биспецифические антитела, содержащие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

[0019] Предложены также выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, или биспецифические антитела по изобретению.

[0020] Предложены также векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, или биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

[0021] Предложены также клетки-хозяева, содержащие векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, или биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

[0022] В некоторых вариантах осуществления изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

[0023] Предложены также способы специфического нацеливания на ТАА (например, TIR-1 или GPC3) на поверхности раковых клеток у пациента, включающие введение пациенту фармацевтической композиции по изобретению.

[0024] Предложены способы лечения рака у пациента включающие введение пациенту фармацевтических композиций изобретения. Рак может представлять собой любой жидкий или солидный рак, например, он может быть выбран из, но не ограничиваясь ими, рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-

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

[0025] Предложены также способы лечения воспалительного заболевания у пациента, включающие введение пациенту фармацевтической композиции по изобретению.

[0026] Предложены также способы получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающие культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в условиях, обеспечивающих получение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

[0027] Предложены также способы получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающие объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

[0028] Предложены также способы определения уровня ТАА (например, TTP-1 или GPC3) у пациента. Способы включают (a) получение образца от пациента; (b) приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и (c) определение уровня ТАА у пациента. В некоторых вариантах осуществления изобретения образец представляет собой образец ткани. Образец ткани может, например, представлять собой образец раковой ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения образец представляет собой образец крови.

[0029] В другом общем аспекте изобретение относится к конструкции химерного антигенного рецептора (CAR), которая индуцирует уничтожение рака, опосредованное Т-клетками, где конструкция CAR содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, который специфически связывает GPC3 человека, шарнирную область, трансмембранная область и внутриклеточный сигнальный домен.

[0030] Предложены выделенные полинуклеотиды, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR). CAR может содержать (a) внеклеточный домен, содержащий по меньшей мере один

антигенсвязывающий домен, который специфически связывает GPC3; (b) шарнирную область; (c) трансмембранную область; и (d) внутриклеточный сигнальный домен.

[0031] В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90, 91 и 92, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112 и 113, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 и 22, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35 и 36, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49 и 50, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62, 63 и 64, соответственно; или
- (7) SEQ ID NO: 73, 74, 75, 76, 77 и 78, соответственно;

где антигенсвязывающий домен специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека.

[0032] В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 93, 94, 95, 96, 97 и 98, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 114, 115, 116, 117, 118 и 119, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 и 28, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41 и 42, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55 и 56, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69 и 70, соответственно; или
- (7) SEQ ID NO: 79, 80, 81, 82, 83 и 84, соответственно;

где антигенсвязывающий домен специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека.

[0033] В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 85, 106, 15, 29, 43, 57 или 71, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 86, 107, 16, 30, 44, 58 или 72.

[0034] В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен содержит:

a. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:85, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:86;

b. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:106, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:107;

c. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:15, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:16;

d. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:30;

e. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:43, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:44;

f. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:58; или

g. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:71, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:72.

[0035] В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен гуманизован и содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 99-102, 120-123, 126-132, 139-140, 143-149, 153-156, 160-163, 183-197 или 202-205, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 103-105, 124-125, 133-138, 141-142, 150-152, 157-159, 164-166 или 198-201.

[0036] В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен гуманизован и содержит:

(1) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:99, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(2) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:99, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(68) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 195, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200;

(69) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 194, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200;

(70) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 185, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200;

(71) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 187, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 104;

(72) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 187, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200;

(73) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 187, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 199;

(74) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 196, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 201; или

(75) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 197, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 201.

[0037] В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), который специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека.

[0038] В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен представляет собой гуманизованный одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), который специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизованный одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) содержит полипептидную последовательность по меньшей мере на 95% идентичную какой-либо из SEQ ID NO:167-182.

[0039] В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный антигенный рецептор (CAR) содержит один или несколько антигенсвязывающих доменов.

[0040] В некоторых вариантах осуществления изобретения внутриклеточный сигнальный домен содержит один или несколько костимулирующих доменов и один или несколько активирующих доменов.

[0041] Предложены также химерные антигенные рецепторы (CAR), кодируемые выделенными полинуклеотидами по изобретению.

[0042] Предложены также векторы, содержащие выделенные полинуклеотиды, включающие нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по изобретению.

[0043] Предложены также клетки-хозяева, содержащие векторы по изобретению.

[0044] В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой Т-клетку, предпочтительно, человеческую Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой НК-клетку, предпочтительно НК-клетку человека. Т-клетка или НК-клетка может быть, например, сконструирована таким образом, чтобы экспрессировать CAR по изобретению для лечения таких заболеваний, как рак.

[0045] Предложены также способы получения клетки-хозяина, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению. Способы включают трансдукцию Т-клетки или НК-клетки вектором, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по изобретению.

[0046] Предложены также способы получения CAR-Т-клетки или CAR-НК-клетки по изобретению. Способы включают культивирование Т-клеток или НК-клеток, содержащих выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению, в условиях, обеспечивающих получение CAR-Т-клеток или CAR-НК-клеток, и выделение CAR-Т-клеток или CAR-НК-клеток.

[0047] Предложены также способы получения популяции сконструированных с помощью РНК клеток, содержащих химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению. Способы включают приведение клетки в контакт с выделенным полинуклеотидом, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению, где выделенный полинуклеотид представляет собой РНК, транскрибируемую *in vitro*, или синтетическую РНК.

[0048] Предложены также способы лечения рака у пациента включающие введение пациенту CAR-Т-клеток и/или CAR-НК-клеток по изобретению. Рак может представлять собой любой жидкий или солидный рак, например, он может быть выбран, но этим не ограничиваясь, из рака легкого, рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфолейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

[0049] В некоторых вариантах осуществления изобретения способы лечения рака у пациента дополнительно включают введение пациенту агента, который повышает эффективность клетки, экспрессирующей молекулу CAR.

[0050] В некоторых вариантах осуществления изобретения способы лечения рака у пациента дополнительно включают введение пациенту агента, который ослабляет один или несколько побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей молекулу CAR.

[0051] В некоторых вариантах осуществления изобретения способы лечения рака у пациента дополнительно включают введение пациенту средства, которое лечит заболевание, связанное с GPC3.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0052] Предшествующее краткое описание, а также последующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящей заявки будут лучше понятны при чтении вместе с приложенными чертежами. Однако следует понимать, что применение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

[0053] На ФИГ. 1 показано связывание очищенного химерного анти-TIP-1 mAb T5C (области VH и VL мышинового mAb T5, слитые с константными областями тяжелой цепи и легкой каппа-цепи IgG1 человека, соответственно) с иммобилизованным TIP-1 в анализе ELISA. Антиген представлял собой человеческий TIP-1, помеченный Мус на С-конце (Origene, номер по каталогу: TP304776).

[0054] На ФИГ. 2А-2G показано связывание очищенного химерного анти-GPC3 mAb (области VH и VL мышинных анти-GPC3 mAb, слитых с константными областями тяжелой цепи и легкой каппа-цепи IgG1 человека, соответственно) с GPC3. ФИГ. 2А-2В, связывание анти-GPC3 mAb с иммобилизованным GPC3 человека [FLAG-huGPC3-His; гибридный белок GPC3 (25-559) человека с FLAG на N-конце и His-меткой на С-конце] в анализе ELISA; ФИГ. 2С-2Е, связывание анти-GPC3 mAb со стабильной клеточной линией HEK293, экспрессирующей GPC3 человека, с использованием анализа FACS; ФИГ. 2F-2G, связывание анти-GPC3 mAb при 26 нМ с контрольными клетками HEK293 (без экзогенно введенной экспрессии GPC3) с использованием анализа FACS. Контроль изотипа, отрицательное контрольное антитело; только вторичное антитело, только вторичное антитело добавляли в анализ в качестве отрицательного контроля.

[0055] На ФИГ. 3А-3О показано связывание гуманизированных анти-GPC3 mAb со стабильной клеточной линией HEK293, экспрессирующей GPC3 человека, с использованием анализа FACS. Контроль изотипа, отрицательное контрольное антитело; только 2-е антитело, только вторичное антитело добавляли в анализ в качестве отрицательного контроля. МЗ-С, химерная версия МЗ; такое же правило именования используется для 26А1, 36F8, 39Е1, 43В9 и F7.

[0056] На ФИГ. 4А-4Е показано связывание молекул анти-GPC3 scFv со стабильной клеточной линией HEK293, экспрессирующей GPC3 человека, с использованием анализа FACS. Контроль изотипа, отрицательное контрольное антитело; только 2-е антитело, только вторичное антитело добавляли в анализ в качестве отрицательного контроля.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0057] В предпосылках и по всему описанию цитируются или описываются различные публикации, статьи и патенты; каждая из этих ссылок полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей и тому подобное, которые были включены в настоящее описание, проводится с целью обеспечения контекста изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что любой или все эти вопросы составляют часть предшествующего уровня техники в отношении любых раскрытых или заявленных изобретений.

[0058] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное изобретение. В остальном некоторые используемые здесь термины имеют значения, указанные в описании.

[0059] Следует отметить, что используемые в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включает ссылку во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

[0060] Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем документе, следует понимать как измененные во всех случаях термином «около». Таким образом, числовое значение обычно включает $\pm 10\%$ указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом, диапазон концентраций от 1% до 10% (масса/объем) включает от 0,9% (масса/объем) до 11% (масса/объем). Как используется в настоящем документе, использование числового диапазона явно включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и доли значений, если в контексте явно не указано иное.

[0061] Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в ряду. Специалисты в данной области распознают или смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных здесь. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются изобретением.

[0062] Как используется в настоящем документе, термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «имеет», «имеющий», «состоит из» или «состоящий из» или любой другой их вариант следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел, и предполагается, что они не являются исключительными или открытыми. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которые содержат список элементов, не обязательно ограничены только этими элементами, но могут включать другие элементы, не указанные явно или присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если прямо не указано иное, «или» относится к включающему или, а не к

исключающему или, например, условию А или В, удовлетворяемому любым из следующих условий: А истинно (или присутствует), а В является ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует), В истинно (или присутствует), и оба А и В истинны (или присутствуют).

[0063] Как используется в настоящем документе, союзный термин «и/или» между несколькими указанными элементами понимается как охватывающий как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, когда два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к применимости первого элемента без второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента без первого. Третий вариант относится к совместному применению первого и второго элементов. Подразумевается, что любой из этих вариантов подпадает под это значение и, следовательно, удовлетворяет требованию термина «и/или», используемого в настоящем документе. Одновременное применение более чем одного из вариантов также понимается как подпадающее под это значение и, следовательно, удовлетворяющее требованию термина «и/или».

[0064] Как используется в настоящем документе, термин «состоит из» или варианты, такие как «состоит из» или «состоящий из», используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, но это никакое дополнительное целое число или группа целых чисел не могут быть добавлены к указанному методу, структуре или композиции.

[0065] Как используется в настоящем документе, термин «состоит по существу из» или варианты, такие как «по существу состоит из» или «состоит по существу из», используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, а также необязательное включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного метода, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. § 2111.03.

[0066] Как используется в настоящем документе, термин «пациент» означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека. Термин «млекопитающее», используемый в данном документе, охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т.д., более предпочтительно, человека.

[0067] Слова «правый», «левый», «нижний» и «верхний» обозначают направления на чертежах, на которые делается ссылка.

[0068] Следует также понимать, что термины «около», «приблизительно», «в целом», «по существу» и подобные им термины, используемые в настоящем документе применительно к размеру или характеристике компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанный размер/характеристика не является жесткой границей или параметром и не исключает его незначительных вариаций, которые функционально одинаковы или аналогичны, как это будет понятно специалистам в данной

области техники. Как минимум, такие ссылки, которые включают числовой параметр, должны включать варианты, которые с использованием математических и промышленных принципов, принятых в данной области техники (например, округление, измерение или другие систематические ошибки, производственные допуски и т. д.), не изменяют младшую значащую цифру.

[0069] Термины «идентичный» или процент «идентичности» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов (например, антитела против ТАА и полинуклеотиды, которые их кодируют, полипептиды ТАА и полинуклеотиды ТАА, которые их кодируют, химерные антигенные рецепторы (CAR), содержащие антигенсвязывающие домены, специфичные для GPC3, и полинуклеотиды, которые их кодируют) относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент одинаковых аминокислотных остатков или нуклеотидов при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, измеренного с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального осмотра.

[0070] Для сравнения последовательностей обычно одна последовательность действует как эталонная последовательность, с которой сравниваются тестовые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей в компьютер вводятся тестовая и эталонная последовательности, при необходимости назначаются координаты подпоследовательностей и назначаются параметры программы алгоритма последовательности. Алгоритм сравнения последовательностей затем вычисляет процентную идентичность последовательности для тестируемой последовательности (последовательностей) по отношению к эталонной последовательности, основываясь на назначенных параметрах программы.

[0071] Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 1981; 2:482, с помощью алгоритма гомологического выравнивания Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 1970; 48:443, методом поиска сходства Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 1988; 85:2444, с помощью компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном пакете Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), или путем визуального осмотра (см. в целом Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc., 1995 Supplement (Ausubel)).

[0072] Примерами алгоритмов, подходящих для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST and BLAST 2.0 которые описан Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990; 215: 403-410 и Altschul et al., Nucleic Acids Res. 1997; 25: 3389-3402, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации. Этот алгоритм включает в себя сначала

идентификацию пар последовательностей с высокой оценкой (HSP) путем определения коротких слов длины W в последовательности запроса, которые либо соответствуют, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю T при сопоставлении со словом той же длины в последовательности базы данных. T упоминается как порог оценки соседнего слова (Altschul et al., см. выше). Эти начальные совпадения слов соседства действуют как исходные данные для инициирования поиска, чтобы найти более длинные HSP, содержащие их. Затем совпадения слов расширяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности настолько, насколько может быть увеличена совокупная оценка выравнивания.

[0073] Кумулятивные баллы рассчитывают с использованием для нуклеотидных последовательностей параметров M (поощрительный балл за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафной балл за несовпадающие остатки; всегда < 0). Для аминокислотных последовательностей используется матрица оценок для расчета кумулятивной оценки. Расширение совпадений слов в каждом направлении останавливается, когда: кумулятивный показатель выравнивания падает на величину X от максимально достигнутого значения; совокупная оценка становится равной нулю или ниже из-за накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательной оценкой; или достигнут конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует по умолчанию длину слова (W), равную 11, ожидание (E), равное 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепочек. Для аминокислотных последовательностей программа BLASTP использует по умолчанию длину слова (W), равную 3, ожидание (E), равное 10, и матрицу оценок BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 89:10915).

[0074] В дополнение к вычислению процентной идентичности последовательности алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 1993; 90:5873-5787). Одной из мер сходства, обеспечиваемой алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая указывает вероятность того, что совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями произойдет случайно. Например, нуклеиновая кислота считается подобной эталонной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее примерно 0,1, более предпочтительно менее примерно 0,01 и наиболее предпочтительно менее примерно 0,001.

[0075] Еще одно указание на то, что две последовательности нуклеиновых кислот или полипептидов по существу идентичны, заключается в том, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, является иммунологически перекрестно реактивным с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид обычно практически идентичен второму полипептиду,

например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим признаком того, что две последовательности нуклеиновых кислот по существу идентичны, является то, что две молекулы гибридизуются друг с другом в жестких условиях.

[0076] Как используется в настоящем документе, термин «выделенный» означает, что биологический компонент (такой как нуклеиновая кислота, пептид или белок) был по существу выделен, получен отдельно или очищен от других биологических компонентов организма, в котором этот компонент встречается в природе, то есть другие хромосомные и внехромосомные ДНК и РНК, а также белки. Таким образом, нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, которые были «выделены», включают нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными методами очистки. «Выделенные» нуклеиновые кислоты, пептиды и белки могут быть частью композиции и все же быть выделенными, если композиция не является частью нативной среды нуклеиновой кислоты, пептида или белка. Термин также охватывает нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, полученные путем рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты.

[0077] Как используется в настоящем документе, термин «полинуклеотид», синонимично обозначаемый как «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеотиды» или «нуклеиновые кислоты», относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК, или модифицированную РНК, или ДНК. «Полинуклеотиды» включают, без ограничения, одноцепочечную и двухцепочечную ДНК, ДНК, представляющую собой смесь одноцепочечных и двухцепочечных участков, одноцепочечную и двухцепочечную РНК и РНК, представляющую собой смесь одноцепочечных и двухцепочечных участков, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, что более типично, двухцепочечными или смесью одноцепочечных и двухцепочечных участков. Кроме того, «полинуклеотид» относится к трехцепочечным областям, содержащим РНК или ДНК, или РНК, и ДНК. Термин «полинуклеотид» также включает ДНК или РНК, содержащие одно или несколько модифицированных оснований, и ДНК или РНК с остовами, модифицированными для стабильности или по другим причинам. «Модифицированные» основания включают, например, тритилированные основания и необычные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; таким образом, «полинуклеотид» включает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, которые обычно встречаются в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. «Полинуклеотид» также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

[0078] Как используется в настоящем документе, термин «вектор» представляет собой репликон, в который может быть функционально вставлен другой сегмент нуклеиновой кислоты, чтобы вызвать репликацию или экспрессию сегмента.

[0079] Как используется в настоящем документе, термин «клетка-хозяин» относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по изобретению. «Клетка-хозяин» может представлять собой клетку любого типа, например, первичную клетку, клетку в культуре или клетку из клеточной линии. В одном варианте осуществления «клетка-хозяин» представляет собой клетку, трансфицированную молекулой нуклеиновой кислоты по изобретению. В другом варианте осуществления «клетка-хозяин» представляет собой потомство или потенциальное потомство такой трансфицированной клетки. Потомство клетки может быть или не быть идентичным родительской клетке, например, из-за мутаций или воздействий окружающей среды, которые могут возникать в последующих поколениях, или из-за интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

[0080] Термин «экспрессия», как используется в настоящем документе, относится к биосинтезу генного продукта. Термин охватывает транскрипцию гена в РНК. Термин также охватывает трансляцию РНК в один или несколько полипептидов и, кроме того, охватывает все встречающиеся в природе посттранскрипционные и посттрансляционные модификации. Экспрессированное антитело может находиться в цитоплазме клетки-хозяина, во внеклеточной среде, такой как среда для роста клеточной культуры, или может быть закреплено на клеточной мембране.

[0081] Как используется в настоящем документе, термины «пептид», «полипептид» или «белок» могут относиться к молекуле, состоящей из аминокислот, и могут быть признаны специалистами в данной области как белок. В настоящем документе используется обычный однобуквенный или трехбуквенный код аминокислотных остатков. Термины «пептид», «полипептид» и «белок» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может быть прерван неаминокислотами. Эти термины также охватывают полимер аминокислоты, который был модифицирован естественным путем или путем вмешательства; например, образование дисульфидной связи, гликозилирование, липидирование, ацетилирование, фосфорилирование или любые другие манипуляции или модификации, такие как конъюгация с метящим компонентом. Также в определение включены, например, полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислоты (включая, например, неприродные аминокислоты и т. д.), а также другие модификации, известные в данной области.

[0082] Описанные в настоящем документе пептидные последовательности записаны в соответствии с обычным соглашением, согласно которому N-концевая область пептида находится слева, а С-концевая область справа. Хотя известны изомерные формы аминокислот, представлена L-форма аминокислоты, если не указано иное.

Химерный антигенный рецептор (CAR)

[0083] Как используется в настоящем документе, термин «химерный антигенный рецептор» (CAR) относится к рекомбинантному полипептиду, содержащему по меньшей

мере внеклеточный домен, который специфически связывается с антигеном или мишенью, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, активирующий Т-клеточный рецептор. Взаимодействие внеклеточного домена CAR с целевым антигеном на поверхности клетки-мишени приводит к кластеризации CAR и доставляет стимул активации к CAR-содержащей клетке. CAR перенаправляют специфичность иммунных эффекторных клеток и запускают пролиферацию, продукцию цитокинов, фагоцитоз и/или продукцию молекул, которые могут опосредовать гибель клетки-мишени, экспрессирующей антиген, независимо от главной гистосовместимости (МНС).

[0084] В одном аспекте CAR содержит антигенсвязывающий домен, шарнирную область, костимулирующий домен, активирующий домен и трансмембранную область. В одном аспекте CAR содержит антигенсвязывающий домен, шарнирную область, два костимулирующих домена, активирующий домен и трансмембранную область. В одном аспекте CAR содержит два антигенсвязывающих домена, шарнирную область, костимулирующий домен, активирующий домен и трансмембранную область. В одном аспекте CAR содержит два антигенсвязывающих домена, шарнирную область, два костимулирующих домена, активирующий домен и трансмембранную область.

[0085] Как используется в настоящем документе, термин «сигнальный пептид» относится к лидерной последовательности на аминоконце (N-конце) формирующегося белка CAR, которая котрансляционно или посттрансляционно формирующийся белок в эндоплазматический ретикулум и последующую поверхностную экспрессию.

[0086] Как используется в настоящем документе, термин «внеклеточный антигенсвязывающий домен», «внеклеточный домен» или «внеклеточный лигандсвязывающий домен» относится к части CAR, расположенной вне клеточной мембраны и способной связываться с антигеном, мишенью или лигандом.

[0087] Как используется в настоящем документе, термин «шарнирная область» относится к части CAR, которая соединяет два соседних домена белка CAR, например, внеклеточный домен и трансмембранный домен.

[0088] Как используется в настоящем документе, термин «трансмембранный домен» относится к части CAR, которая проходит через клеточную мембрану и закрепляет CAR на клеточной мембране. Иногда его называют «трансмембранной областью».

Костимулирующие домены

[0089] Как используется в настоящем документе, химерные антигенные рецепторы могут включать костимулирующие (сигнальные) домены для повышения их эффективности. Костимулирующий (сигнальный) домен может быть получен из костимулирующей молекулы. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от антигенных рецепторов или их лигандов, которые необходимы для эффективного иммунного ответа. Костимулирующие домены могут быть получены из костимулирующих молекул, которые могут включать, но этим не ограничиваются, CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (альфа, бета, дельта, эпсилон, гамма, дзета), CD4, CD5, CD7, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD33, CD37,

CD40, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, запрограммированная смерть-1 (PD-1), индуцируемый костимулятор Т-клеток (ICOS), антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцитов (LFA-1; CD11a и CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (член суперсемейства фактора некроза опухоли 14; TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP10, рецептор Fc гамма, молекула MHC класса I, TNFR, интегрин, сигнальная молекула активации лимфоцитов, BTLA, рецептор Толл-подобного лиганда, ICAM-1, CDS, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, ITGAM, ITGAX, ITGB1, CD29, ITGB2 (CD18), ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD 160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганд CD83, цитокиновый рецептор, активирующие рецепторы NK-клеток, или их фрагменты, или любую их комбинацию.

Активация доменов

[0090] Как используется в настоящем документе, химерные антигенные рецепторы могут содержать активирующие домены. Активирующие домены могут включать, но этим не ограничивается, CD3. CD3 является элементом Т-клеточного рецептора нативных Т-клеток и, как было показано, является важным внутриклеточным активирующим элементом в CAR. В предпочтительном воплощении CD3 представляет собой CD3 дзета.

Шарнирная область

[0091] Как описано в настоящем документе, химерный антигенный рецептор может содержать шарнирную область. Это часть внеклеточного домена, иногда называемая «спейсерной» областью. В соответствии с изобретением можно использовать различные петли, включая костимулирующие молекулы, как обсуждалось выше, последовательности иммуноглобулина (Ig) или другие подходящие молекулы для достижения желаемого особого расстояния от клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения вся внеклеточная область включает шарнирную область.

Трансмембранная область

[0092] Как используется в настоящем документе, химерные антигенные рецепторы (CAR) могут содержать трансмембранную область/домен. CAR можно сконструировать таким образом, чтобы он содержал трансмембранный домен, слитый с внеклеточным доменом CAR. Аналогичным образом он может быть слит с внутриклеточным доменом CAR. В одном варианте осуществления изобретения используется трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен можно выбрать или модифицировать путем аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами того же или разных белков поверхностной мембраны, чтобы свести к минимуму

взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса. Трансмембранный домен может быть получен либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник является природным, домен может быть получен из любого связанного с мембраной или трансмембранного белка. Трансмембранные области, конкретно используемые в данном изобретении, могут быть получены из (то есть содержать или сконструированы из), но этим не ограничиваясь, CD28, CD28T, OX40, 4-1BB/CD137, CD2, CD3 (альфа, бета, дельта, эпсилон, гамма, дзета), CD4, CD5, CD7, CD9, CD16, CD22, CD27, CD30, CD33, CD37, CD40, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, запрограммированной смерти-1 (PD-1), индуцируемого костимулятора Т-клеток (ICOS), антигена-1, ассоциированного с функцией лимфоцитов (LFA-1; CD11a и CD18), CD247, CD276 (B7-H3), LIGHT (представитель 14 суперсемейства фактора некроза опухоли; 14; TNFSF14), NKG2C, Ig альфа (CD79a), DAP10, рецептора Fc гамма, молекулы МНС класса I, TNFR, интегрин, сигнальной молекулы активации лимфоцитов, BTLA, лиганда Толл-подобного рецептора, ICAM-1, CDS, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD8 альфа, CD8 бета, IL-2R бета, IL-2R гамма, IL-7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, ITGAM, ITGAX, ITGB1, CD29, ITGB2 (CD18), ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD 160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, лиганда CD83, цитокинового рецептора, активирующих рецепторы NK-клеток, белка иммуноглобулина или их фрагментов или любой их комбинации.

Иммунные клетки

[0093] В соответствии с конкретными аспектами изобретение относится к клеткам, которые представляют собой иммунные клетки, содержащие выделенные полинуклеотиды, или векторы, содержащие выделенные полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую CAR. Иммунные клетки, содержащие выделенные полинуклеотиды и/или векторы по изобретению, можно назвать «сконструированными иммунными клетками». Предпочтительно, сконструированные иммунные клетки происходят от человека (имеют человеческое происхождение до того, как их делают рекомбинантными).

[0094] Сконструированные иммунные клетки могут, например, представлять собой клетки лимфоидной линии. Неограничивающие примеры клеток лимфоидного происхождения могут включать Т-клетки и клетки-естественные киллеры (NK). Т-клетки экспрессируют Т-клеточный рецептор (TCR), при этом большинство клеток экспрессируют цепи α и β , а меньшая популяция экспрессирует цепи γ и δ . Т-клетки, используемые в качестве сконструированных иммунных клеток по изобретению, могут быть CD4⁺ или CD8⁺ и могут включать, но не ограничиваются ими, Т-хелперные клетки (CD4⁺), цитотоксические Т-клетки (также называемые цитотоксическими Т-лимфоцитами,

CTL; CD8⁺ клетки), и Т-клетки памяти, включая центральные Т-клетки памяти, стволоподобные Т-клетки памяти и эффекторные Т-клетки памяти, Т-клетки естественных киллеров, инвариантные Т-клетки, ассоциированные со слизистой оболочкой, и $\gamma\delta$ Т-клетки. Другие типичные иммунные клетки включают, но не ограничиваются ими, макрофаги, антигенпрезентирующие клетки (APC) или любую иммунную клетку, которая экспрессирует ингибитор клеточно-опосредованного иммунного ответа, например, рецептор пути ингибитора контрольной точки иммунного ответа (например PD-1). Клетки-предшественники иммунных клеток, которые можно использовать по изобретению, включают гемопоэтические стволовые и/или клетки-предшественники. Гемопоэтические стволовые клетки и/или клетки-предшественники могут быть получены из костного мозга, пуповинной крови, периферической крови взрослых после мобилизации цитокинов и тому подобное способами, известными в данной области. Иммунные клетки сконструированы для рекомбинантной экспрессии CAR по изобретению.

[0095] Иммунные клетки и их клетки-предшественники могут быть выделены способами, известными в данной области, включая коммерчески доступные способы (см., например, Rowland Jones et al., *Lymphocytes: A Practical Approach*, Oxford University Press, NY 1999). Источники иммунных клеток или их предшественников включают, но не ограничиваются ими, периферическую кровь, пуповинную кровь, костный мозг или другие источники гемопоэтических клеток. Для разделения клеток с целью выделения или обогащения желаемых иммунных клеток можно использовать различные методы. Например, методы негативной селекции можно использовать для удаления клеток, которые не являются желаемыми иммунными клетками. Кроме того, для выделения или обогащения нужными иммунными клетками или их предшественниками можно использовать методы положительной селекции, или можно использовать комбинацию методов положительной и отрицательной селекции. Если необходимо выделить определенный тип клеток, например конкретную Т-клетку, для разделения клеток можно использовать различные маркеры клеточной поверхности или комбинации маркеров (например, CD3, CD4, CD8, CD34).

[0096] Иммунные клетки или их клетки-предшественники могут быть аутологичными или неаутологичными по отношению к пациенту, которому их вводят в способах лечения по изобретению. Аутологичные клетки выделяют из пациента, которому должны быть введены сконструированные иммунные клетки, рекомбинантно экспрессирующие CAR. Необязательно клетки могут быть получены с помощью лейкофереза, при котором лейкоциты выборочно удаляются из взятой крови, делаются рекомбинантными, а затем ретранслируются донору. В качестве альтернативы можно использовать аллогенные клетки от неаутологичного донора, который не является пациентом. В случае неаутологичного донора клетки типизируют и сопоставляют с человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA) для определения соответствующего

уровня совместимости. Как аутологичные, так и неаутологичные клетки могут быть подвергнуты криоконсервации до тех пор, пока они не будут готовы к использованию.

[0097] Различные способы выделения иммунных клеток, которые можно использовать для рекомбинантной экспрессии CAR по изобретению, были описаны ранее и могут быть использованы, включая, но не ограничиваясь этим, использование периферических донорских лимфоцитов (Sadelain et al., *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3:35-45; Morgan et al., *Science* 2006; 314:126-9), с использованием культур лимфоцитов, полученных из инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), в биоптатах опухоли (Panelli et al., *J. Immunol.* 2000; 164:495-504; Panelli et al., *J. Immunol.* 2000; 164:4382-92) и с использованием селективно размноженных *in vitro* антиген-специфических лейкоцитов периферической крови с использованием искусственных антигенпрезентирующих клеток (AAPC) или дендритных клеток (Dupont et al., *Cancer Res.* 2005; 65:5417-427; Papanicolaou et al., *Blood* 2003; 102:2498-505). В случае использования стволовых клеток клетки могут быть выделены способами, хорошо известными в данной области (см., например, Klug et al., *Hematopoietic Stem Cell Protocols*, Humana Press, NJ 2002; Freshney et al., *Culture of Human Stem Cells*, John Wiley & Sons 2007).

[0098] В соответствии с конкретными вариантами осуществления способ получения сконструированных иммунных клеток включает трансфекцию или трансдукцию иммунных эффекторных клеток, выделенных от индивидуума, так что иммунные эффекторные клетки экспрессируют один или несколько CAR согласно вариантам осуществления изобретения. Способы подготовки иммунных клеток для иммунотерапии описаны, например, в WO2014/130635, WO2013/176916 и WO2013/176915, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки. Отдельные стадии, которые можно использовать для получения сконструированных иммунных клеток, описаны, например, в WO2014/039523, WO2014/184741, WO2014/191128, WO2014/184744 и WO2014/184143, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки.

[0099] В конкретном варианте осуществления изобретения иммунные эффекторные клетки, такие как Т-клетки, генетически модифицируют с помощью CAR по изобретению (например, трансдуцируют вирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR), а затем активируют и размножают *in vitro*. В различных вариантах осуществления Т-клетки можно активировать и размножать до или после генетической модификации для экспрессии CAR с использованием способов, описанных, например, в US6352694, US6534055, US6905680, US6692964, US5858358, US6887466, US6905681, US7144575, US7067318, US7172869, US7232566, US7175843, US5883223, US6905874, US6797514, US6867041, US2006/121005, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки. Т-клетки могут быть размножены *in vitro* или *in vivo*. Как правило, Т-клетки по изобретению могут размножаться при контакте с поверхностью, к которой прикреплен агент, который стимулирует сигнал, связанный с комплексом CD3/TCR, и лиганд, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В

качестве неограничивающих примеров можно стимулировать популяции Т-клеток, как описано в настоящем документе, например, путем контакта с анти-CD3-антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, или анти-CD3-антителом, иммобилизованным на поверхности, или путем контакта с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с ионофором кальция, или путем активации самого CAR. Для костимуляции добавочной молекулы на поверхности Т-клеток используется лиганд, связывающий добавочную молекулу. Например, популяция Т-клеток может контактировать с анти-CD3 антителом и анти-CD28 антителом в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток. Условия, подходящие для культивирования Т-клеток, включают, например, подходящую среду (например, Minimal Essential Media or RPMI Media 1640 or, X-vivo 5 (Lonza)), которая может содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, эмбриональную бычью или сыворотка человека), цитокины, такие как IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21, инсулин, IFN- γ , GM-CSF, TGF β и/или любые другие добавки для роста клетки, известные специалисту в данной области. В других вариантах осуществления изобретения Т-клетки можно активировать и стимулировать к пролиферации фидерными клетками и соответствующими антителами и цитокинами с использованием способов, таких как описанные в US 6040177, US 5827642 и WO 2012129514, которые включены в настоящий документ в качестве ссылки.

[00100] Антитела и антигенсвязывающие домены

[00101] Изобретение в основном относится к выделенным антителам против ТАА (например, антитела к TIR-1 или анти-GPC3), химерным антигенным рецепторам (CAR), нуклеиновым кислотам и векторам экспрессии, кодирующим антитела и CAR, рекомбинантным клеткам, содержащим векторы и композиции, содержащие антитела, CAR и рекомбинантные клетки, экспрессирующие CAR. Способы получения антител и CAR и способы применения антител и CAR для лечения заболеваний, включая рак и воспалительные заболевания. Антитела и антигенсвязывающие домены CAR по изобретению обладают одним или несколькими желательными функциональными свойствами, включая, помимо прочего, высокоаффинное связывание с ТАА, высокую специфичность к ТАА, способность стимулировать комплементзависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и/или антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) в отношении клеток, экспрессирующих ТАА, а также способность ингибировать рост опухоли у пациентов и животных моделей при введении отдельно или в комбинации с другими противоопухолевыми препаратами. терапии.

[00102] В общем аспекте изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают ТАА (например, TIR-1 или GPC3).

[00103] Как используется в настоящем документе, термин «антитело» используется в широком смысле и включает иммуноглобулин или молекулы антител, включая

человеческие, гуманизированные, составные и химерные антитела и фрагменты антител, которые являются моноклональными или поликлональными. Как правило, антитела представляют собой белки или пептидные цепи, обладающие специфичностью связывания с конкретным антигеном. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины могут быть отнесены к пяти основным классам (то есть IgA, IgD, IgE, IgG и IgM), в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела по изобретению могут относиться к любому из пяти основных классов или соответствующих подклассов. Предпочтительно антитела по изобретению представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител позвоночных видов могут быть отнесены к одному из двух четко различающихся типов, а именно каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. Соответственно, антитела по изобретению могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антитела по изобретению включают константные области тяжелой и/или легкой цепи антител крысы или человека. В дополнение к константным доменам тяжелой и легкой цепи антитела содержат антигенсвязывающую область, состоящую из вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи, каждая из которых содержит три домена (то есть определяющие комплементарность области 1-3; CDR1, CDR2 и CDR3). Домены вариабельной области легкой цепи альтернативно обозначаются как LCDR1, LCDR2 и LCDR3, а домены вариабельной области тяжелой цепи альтернативно обозначаются как HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

[00104] Как используется в настоящем документе, термин «выделенное антитело» относится к антителу, которое практически не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с ТАА (например, TIP-1 или GPC3), практически не содержит антител, которые не связываются с тем же ТАА (например, TIP-1 или GPC3)). Кроме того, выделенное антитело практически не содержит другого клеточного материала и/или химических веществ.

[00105] Как используется в настоящем документе, термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, то есть отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела по изобретению могут быть получены гибридным методом, технологией фагового дисплея, технологией клонирования одного гена лимфоцита или методами рекомбинантной ДНК. Например, моноклональные антитела могут быть получены гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного животного, отличного от человека, такого как трансгенная мышь или крыса, имеющего геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи.

[00106] Как используется в настоящем документе, термин «антигенсвязывающий фрагмент» и/или «антигенсвязывающий домен» относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, Fab, Fab', F(ab')₂, фрагмент Fv, стабилизированный дисульфидом фрагмент Fv (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидом диатело (ds диатело), молекула одноцепочечного антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), димер scFv (двухвалентное диатело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей один или несколько CDR, верблюжий однодоменный домен антитела, нанотело, доменное антитело, бивалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полной структуры антитела. Антигенсвязывающий фрагмент способен связываться с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело или исходный фрагмент антитела. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, константную область легкой цепи и Fd-сегмент тяжелой цепи. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab'). Антигенсвязывающий домен способен связываться с тем же антигеном, с которым связывается родительское антитело. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антигенсвязывающий домен содержит молекулу одноцепочечного антитела (scFv).

[00107] Как используется в настоящем документе, термин «одноцепочечное антитело» относится к обычному одноцепочечному антителу в данной области, которое содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, соединенные коротким пептидом от примерно 15 до примерно 20 аминокислот. Как используется в настоящем документе, термин «однодоменное антитело» относится к обычному однодоменному антителу в данной области, которое содержит переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи или которое содержит только переменную область тяжелой цепи.

[00108] Как используется в настоящем документе, термин «человеческое антитело» относится к антителу, продуцируемому человеком, или к антителу, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую антителу, продуцируемому человеком, полученному с использованием любого метода, известного в данной области. Это определение антитела человека включает интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид тяжелой и/или легкой цепи человека.

[00109] Как используется в настоящем документе, термин «гуманизированное антитело» и/или «гуманизированный антигенсвязывающий домен» относится к нечеловеческому антителу и/или нечеловеческому антигенсвязывающему домену, который модифицирован для увеличения гомологии последовательности до гомологии последовательности человеческого антитела и/или антигенсвязывающий домен человека,

так что антигенсвязывающие свойства антитела и/или антигенсвязывающего домена сохраняются, но его антигенность в организме человека снижается.

[00110] Как используется в настоящем документе, термин «химерное антитело» и/или «химерный антигенсвязывающий домен» относится к антителу и/или антигенсвязывающему домену, в котором аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина происходит от двух или более видов. Варибельная область как легкой, так и тяжелой цепей часто соответствует варибельной области антитела и/или антигенсвязывающему домену, происходящему от одного вида млекопитающих (например, мыши, крысы, кролика и т. д.), имеющего желаемую специфичность, аффинность, и способность, в то время как константные области соответствуют последовательностям антитела и/или антигенсвязывающего домена, полученного от другого вида млекопитающего (например, человека), чтобы избежать возникновения иммунного ответа у этого вида.

[00111] Как используется в настоящем документе, термин «мультиспецифическое антитело» относится к антителу, которое содержит множество последовательностей варибельных доменов иммуноглобулина, где первая последовательность варибельного домена иммуноглобулина из множества обладает специфичностью связывания в отношении первого эпитопа и второго иммуноглобулина. последовательность варибельного домена из множества обладает специфичностью связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления изобретения первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления изобретения первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В одном варианте осуществления изобретения первый и второй эпитопы не перекрываются или практически не перекрываются. В одном варианте осуществления изобретения первый и второй эпитопы находятся на разных антигенах, например, на разных белках (или на разных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления изобретения мультиспецифическое антитело содержит третий, четвертый или пятый варибельный домен иммуноглобулина. В одном варианте осуществления изобретения полиспецифическое антитело представляет собой молекулу биспецифического антитела, молекулу триспецифического антитела или молекулу тетраспецифического антитела.

[00112] Как используется в настоящем документе, термин «биспецифическое антитело» относится к мультиспецифичному антителу, которое связывает не более двух эпитопов или двух антигенов. Биспецифическое антитело характеризуется последовательностью первого варибельного домена иммуноглобулина, обладающей специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и последовательностью второго варибельного домена иммуноглобулина, обладающей специфичностью связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления первый

и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы находятся на разных антигенах, например, на разных белках (или на разных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит половину антитела или его фрагмент, обладающего специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и половину антитела или его фрагмента, обладающего специфичностью связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит scFv или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания в отношении первого эпитопа, и scFv или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания в отношении второго эпитопа. В одном варианте осуществления первый эпитоп расположен на ТАА по данному изобретению, а второй эпитоп расположен на PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG-3, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD33, CD3, CD73, CD47, TIG-1, GPC3, апелин, DLL3, альфа-рецептор фолиевой кислоты, клаудин 18.2 и/или другие иммуносупрессоры, ассоциированные с опухолью, или поверхностные антигены. В одном варианте осуществления первый и второй эпитопы расположены на одной и той же ТАА по настоящему изобретению.

[00113] Как используется в настоящем документе, термин «антитело и/или антигенсвязывающий домен, который «специфически связывается с ТАА», относится к антителу и/или антигенсвязывающему домену, который связывается с ТАА, предпочтительно с ТАА человека (например, TIG-1 или GPC3), 1×10^{-7} М или меньше, предпочтительно, 1×10^{-8} М или меньше, более предпочтительно, 5×10^{-9} М или меньше, 1×10^{-9} М или меньше, 5×10^{-10} М или меньше или 1×10^{-10} М или меньше. Термин «KD» относится к константе диссоциации, которую получают из отношения K_d к K_a (то есть K_d/K_a) и выражают в виде молярной концентрации (М). Значения KD для антител и/или антигенсвязывающих доменов можно определить с использованием способов, известных в данной области техники, с учетом настоящего изобретения. Например, KD антитела и/или антигенсвязывающих доменов можно определить с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с помощью биосенсорной системы, например, системы Biacore®, или с помощью технологии биослойной интерферометрии, такой как система Octet RED96.

[00114] Чем меньше значение KD антитела и/или антигенсвязывающего домена, тем выше аффинность, с которой антитело и/или антигенсвязывающий домен связываются с антигеном-мишенью.

[00115] В соответствии с конкретным аспектом изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или химерному антигенному рецептору (CAR), содержащему антигенсвязывающий домен, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющими полипептидные последовательности, представленные:

- (1) SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90, 91 и 92, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112 и 113, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 и 22, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35 и 36, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49 и 50, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62, 63 и 64, соответственно; или
- (7) SEQ ID NO: 73, 74, 75, 76, 77 и 78, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его антигенсвязывающий домен специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека.

[00116] В соответствии с конкретным аспектом изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или химерному антигенному рецептору (CAR), содержащему антигенсвязывающий домен, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную последовательность, представленную:

- (1) SEQ ID NO: 93, 94, 95, 96, 97 и 98, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 114, 115, 116, 117, 118 и 119, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 и 28, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41 и 42, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55 и 56, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69 и 70, соответственно; или
- (7) SEQ ID NO: 79, 80, 81, 82, 83 и 84, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий или его антигенсвязывающий домен специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека.

[00117] В соответствии с конкретным аспектом изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную последовательность, представленную:

- (1) SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8, соответственно.

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает T1P-1, предпочтительно, T1P-1 человека.

[00118] В соответствии с конкретным аспектом изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную последовательность, представленную:

(1) SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13 и 14, соответственно.

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает T1P-1, предпочтительно, T1P-1 человека.

[00119] В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или химерному антигенному рецептору (CAR), содержащему антигенсвязывающий домен, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющей полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную одной из SEQ ID NO: 85, 106, 15, 29, 43, 57, 71 или 1, или вариабельную область легкой цепи, имеющей полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную одной из SEQ ID NO: 86, 107, 16, 30, 44, 58, 72 или 2. В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или его антигенсвязывающий домен по изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющей полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO: 85, 106, 15, 29, 43, 57, 71 или 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO: 86, 107, 16, 30, 44, 58, 72 или 2, соответственно.

[00120] В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или его антигенсвязывающему домену по изобретению, содержащему:

а. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:85, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:86;

b. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:106, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:107;

c. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:16;

d. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:29, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:30;

e. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:43, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:44;

f. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:57, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:58;

g. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:71, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:72; or

h. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:2.

[00121] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8, соответственно. В другом варианте осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:2. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:2.

[00122] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную

последовательность SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 и 22, соответственно. В другом варианте осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:16. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:16.

[00123] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную последовательность SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35 и 36, соответственно. В другом варианте осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:29, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:30. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:29, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:30.

[00124] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную последовательность SEQ ID NO: SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49 и 50, соответственно. В другом варианте осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:43, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%,

на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:44. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:43, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:44.

[00125] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную последовательность SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62, 63 и 64, соответственно. В другом варианте осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:58. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:58.

[00126] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную последовательность SEQ ID NO: 73, 74, 75, 76, 77 и 78, соответственно. В другом варианте осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:71, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:72. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:71, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:72.

[00127] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную

последовательность SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90, 91 и 92, соответственно. В другом варианте осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:85, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:86. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:85, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:86.

[00128] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную последовательность SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112 и 113, соответственно. В другом варианте осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:106, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:107. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:106, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:107.

[00129] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную последовательность SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13 и 14, соответственно. В другом варианте осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98%

или на 99% идентичную SEQ ID NO:2. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:1, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:2.

[00130] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную последовательность SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 и 28, соответственно. В другом варианте осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:15, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:16. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:15, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:16.

[00131] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную последовательность SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41 и 42, соответственно. В другом варианте осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:30. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:30.

[00132] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную

последовательность SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55 и 56, соответственно. В другом варианте осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:43, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:44. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:43, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:44.

[00133] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную последовательность SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69 и 70, соответственно. В другом варианте осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:57, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:58. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:57, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:58.

[00134] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную последовательность SEQ ID NO: 79, 80, 81, 82, 83 и 84, соответственно. В другом варианте осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:71, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98%

или на 99% идентичную SEQ ID NO:72. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:71, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:72.

[00135] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную последовательность SEQ ID NO: 93, 94, 95, 96, 97 и 98, соответственно. В другом варианте осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:85, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:86. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:85, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:86.

[00136] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющему полипептидную последовательность SEQ ID NO: 114, 115, 116, 117, 118 и 119, соответственно. В другом варианте осуществления изобретения выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:106, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или больше, например, на 95%, на 96%, на 97%, на 98% или на 99% идентичную SEQ ID NO:107. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:106, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:107.

[00137] В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

[00138] В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

[00139] В соответствии с другим конкретным аспектом гуманизированное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную какой-либо из SEQ ID NO: 99-102, 120-123, 126-132, 139-140, 143-149, 153-156, 160-163, 183-197 или 202-205, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную какой-либо из SEQ ID NO: 103-105, 124-125, 133-138, 141-142, 150-152, 157-159, 164-166 или 198-201.

[00140] В соответствии с другим конкретным аспектом гуманизированное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(1) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:99, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(2) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:99, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(3) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:100, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(4) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:100, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(5) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:101, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(6) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:101, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(7) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:102, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:105;

(8) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:120, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:124;

(74) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 196, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 201; or

(75) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 197, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 201.

[00141] В соответствии с другим конкретным аспектом антигенсвязывающий домен гуманизирован и содержит варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 99-102, 120-123, 126-132, 139-140, 143-149, 153-156, 160-163, 183-197 или 202-205, или варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 103-105, 124-125, 133-138, 141-142, 150-152, 157-159, 164-166 или 198-201.

[00142] В соответствии с другим конкретным аспектом антигенсвязывающий домен гуманизирован и содержит:

(1) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:99, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(2) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:99, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(3) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:100, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(4) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:100, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(5) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:101, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(6) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:101, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(7) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:102, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:105;

(73) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 187, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 199;

(74) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 196, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 201; or

(75) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 197, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 201.

[00143] В соответствии с другим конкретным аспектом антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), который специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека.

[00144] В некоторых вариантах осуществления изобретения кодируемый антигенсвязывающий домен представляет собой гуманизированный одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), который специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий домен представляет собой гуманизированный одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), который специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизированный одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv) содержит полипептидную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную какой-либо из SEQ ID NO:167-182. В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизированный одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv) содержит полипептидную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:167-182.

[00145] В соответствии с другим конкретным аспектом химерный антигенный рецептор содержит один или несколько антигенсвязывающих доменов.

[00146] В соответствии с другим конкретным аспектом внутриклеточный сигнальный домен содержит один или несколько костимулирующих доменов и один или несколько активирующих доменов.

[00147] В другом общем аспекте изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. В другом общем аспекте изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит его антигенсвязывающий домен по изобретению. Специалистам в данной области будет понятно, что кодирующая последовательность белка может быть изменена (например, заменена, удалена, вставлена и т. д.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно,

специалистам в данной области будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, могут быть изменены без изменения аминокислотных последовательностей белков.

[00148] В другом общем аспекте изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или CAR по изобретению. Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области в свете настоящего изобретения, такой как плаزمид, космид, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой рекомбинантный вектор экспрессии, такой как плазмид. Вектор может включать любой элемент для установления обычной функции вектора экспрессии, например, промотор, элемент связывания рибосомы, терминатор, энхансер, маркер селекции и точку начала репликации. Промотор может быть конститутивным, индуцируемым или репрессируемым промотором. Ряд экспрессионных векторов, способных доставлять нуклеиновые кислоты в клетку, известен в данной области и может быть использован здесь для продукции антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке. Для создания рекомбинантного вектора экспрессии в соответствии с вариантами осуществления изобретения можно использовать обычные методы клонирования или синтез искусственных генов.

[00149] В другом общем аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Любая клетка-хозяин, известная специалистам в данной области в связи с настоящим описанием, может быть использована для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева представляют собой клетки *E. coli* TG1 или BL21 (для экспрессии, например, антитела scFv или Fab), клетки CHO-DG44 или CHO-K1 или клетки HEK293 (для экспрессии, например, антитела IgG). В соответствии с конкретными вариантами осуществления рекомбинантный вектор экспрессии трансформируют в клетки-хозяева обычными способами, такими как химическая трансфекция, тепловой шок или электропорация, где он стабильно интегрируется в геном клетки-хозяина, так что рекомбинантная нуклеиновая кислота эффективно экспрессируется.

[00150] В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, обеспечивающих получение

моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента изобретения и выделения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры (например, из супернатанта). Экспрессированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть собраны из клеток и очищены в соответствии с обычными способами, известными в данной области, как описано в настоящем документе.

[00151] В другом общем аспекте изобретение к клетке, трансдуцированной вектором, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по изобретению. Термин «трансдуцированный» или «трансдукция» относится к процессу, посредством которого экзогенная нуклеиновая кислота переносится или вводится в клетку-хозяин. «Трансдуцированная» клетка представляет собой клетку, которая была трансдуцирована экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка включает первичную подлежащую клетку и ее потомство. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой CAR-T-клетку, предпочтительно CAR-T-клетку человека, причем Т-клетка сконструирована так, чтобы экспрессировать CAR по изобретению для лечения таких заболеваний, как рак. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой CAR-NK-клетку, предпочтительно CAR-NK-клетку человека, где NK-клетка, сконструированная для экспрессии CAR по изобретению, используется для лечения таких заболеваний, как рак.

[00152] В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения CAR-T-клетки путем трансдукции Т-клетки вектором, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по изобретению.

[00153] В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения CAR-T-клеток по изобретению, включающему культивирование Т-клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению, в условиях для получения клетки CAR-T и восстановление клетки CAR-T.

[001541] В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения CAR-NK-клетки путем трансдукции NK-клетки вектором, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR по изобретению.

[00155] В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения CAR-NK-клеток по изобретению, включающему культивирование NK-клеток, содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие их химерный антигенный рецептор (CAR), в условиях, обеспечивающих получение CAR-NK-клетки, и выделение CAR-NK-клетки.

[00156] В другом общем аспекте изобретение относится к способу создания популяции РНК-инженерных клеток, содержащих химерный антигенный рецептор (CAR) по изобретению. Способы включают контактирование популяции клеток с выделенными полинуклеотидами, содержащими нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR по изобретению, где выделенные полинуклеотиды представляют собой РНК, транскрибируемую *in vitro*, или синтетическую РНК.

[00157] Фармацевтические композиции

[00158] В другом общем аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, выделенный полинуклеотид, выделенный полипептид, клетку-хозяина, и/или сконструированную иммунную клетку по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

[00159] Термин «фармацевтическая композиция», как используется в настоящем документе, означает продукт, содержащий выделенный полинуклеотид по настоящему изобретению, выделенный полипептид по настоящему изобретению, клетку-хозяина по настоящему изобретению, сконструированную иммунную клетку по настоящему изобретению, анти-TIP-1 или анти-GPC3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или биспецифическое антитело по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Полинуклеотиды, полипептиды, клетки-хозяева, сконструированные иммунные клетки по изобретению, анти-TIP-1 или анти-GPC3 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или биспецифическое антитело по изобретению и композиции, содержащие их, также применимы в производство упомянутого здесь лекарственного средства для терапевтического применения.

[00160] Как используется в настоящем документе, термин «носитель» относится к любому эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферу, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, липидсодержащей везикуле, микросфере, липосомальной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области для использования в фармацевтических препаратах. Понятно, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от пути введения для конкретного применения. Как используется в настоящем документе, термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному материалу, который не влияет на эффективность композиции по изобретению или биологическую активность композиции по изобретению. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, принимая во внимание настоящее изобретение, в изобретении можно использовать любой фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для применения в фармацевтической композиции антитела.

[00161] Состав фармацевтически активных ингредиентов с фармацевтически приемлемыми носителями известен в данной области, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, 21-е издание (2005 г.) и любые более поздние издания). Неограничивающие примеры дополнительных ингредиентов включают буферы, разбавители, растворители, агенты, регулирующие тоничность, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие агенты. Один или несколько фармацевтически приемлемых носителей могут быть использованы при составлении фармацевтических композиций по изобретению.

[00162] В одном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция представляет собой жидкий состав. Предпочтительным примером жидкого состава является водный состав, то есть состав, содержащий воду. Жидкий состав может включать раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и тому подобное. Водный состав обычно содержит по меньшей мере 50% мас./мас. воды или по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или по меньшей мере 95% мас./мас. воды.

[00163] В одном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде инъекционного препарата, который можно вводить, например, с помощью инъекционного устройства (например, шприца или инфузионного насоса). Инъекцию можно вводить, например, подкожно, внутримышечно, внутривенно, интравитреально или интравитреально.

[00164] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция представляет собой твердый состав, например лиофилизированную или распылительно-высушенную композицию, которую можно использовать как есть, или к которой врач или пациент добавляют растворители и/или разбавители перед применением. Твердые лекарственные формы могут включать таблетки, такие как прессованные таблетки и/или таблетки с покрытием, и капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы). Фармацевтическая композиция также может быть, например, в виде пакетиков, драже, порошков, гранул, пастилок или порошков для восстановления.

[00165] Лекарственные формы могут быть с немедленным высвобождением, и в этом случае они могут содержать водорастворимый или диспергируемый носитель, или они могут быть с отсроченным высвобождением, пролонгированным высвобождением или модифицированным высвобождением, и в этом случае они могут содержать водонерастворимые полимеры, которые регулируют скорость растворения лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте или под кожей.

[00166] В других вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция может быть доставлена интраназально, интрабуккально или сублингвально.

[00167] pH в водном составе может быть между pH 3 и pH 10. В одном варианте осуществления изобретения pH состава составляет от около 7,0 до около 9,5. В другом варианте осуществления изобретения pH состава составляет от около 3,0 до около 7,0.

[00168] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит буфер. Неограничивающие примеры буферов включают: аргинин, аспарагиновую кислоту, бицин, цитрат, динатрийгидрофосфат, фумаровую кислоту, глицин, глицилглицин, гистидин, лизин, малеиновую кислоту, яблочную кислоту, ацетат натрия, карбонат натрия, дигидрофосфат натрия, фосфат натрия, сукцинат, винную кислоту, трицин и трис(гидроксиметил)аминометан и их смеси. Буфер может присутствовать отдельно или в совокупности в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 50 мг/мл, например, от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические

композиции, содержащие каждый из этих конкретных буферов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00169] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит консервант. Неограничивающие примеры консервантов включают: хлорид бензетония, бензойную кислоту, бензиловый спирт, бронопол, бутил-4-гидроксibenзоат, хлорбутанол, хлоркрезол, хлоргексидин, хлорфенезин, о-крезол, м-крезол, п-крезол, этил 4-гидроксibenзоат, имимочевину, метил 4-гидроксibenзоат, фенол, 2-феноксietанол, 2-фенилэтанол, пропил 4-гидроксibenзоат, дегидроацетат натрия, тиомеросал и их смеси. Консервант может присутствовать отдельно или в совокупности в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 50 мг/мл, например, от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных консервантов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00170] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит изотонический агент. Неограничивающие примеры изотонических агентов включают соль (такую как хлорид натрия), аминокислоту (такую как глицин, гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, аспарагиновая кислота, триптофан и треонин), альдит (такой как глицерин, 1,2-пропандиол, пропиленгликоль), 1,3-пропандиол и 1,3-бутандиол), полиэтиленгликоль (например, PEG400) и их смеси. Другой пример изотонического агента включает сахар. Неограничивающими примерами сахаров могут быть моно-, ди- или полисахариды или водорастворимые глюкоаны, включая, например, фруктозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрин, альфа- и бета-HPCD, растворимый крахмал, гидроксietилкрахмал и карбоксиметилцеллюлоза натрия. Другим примером изотонического агента является сахарный спирт, где термин «сахарный спирт» определяется как углеводород C(4-8), имеющий по меньшей мере одну группу -ОН. Неограничивающие примеры сахарных спиртов включают маннит, сорбит, инозитол, галактит, дульцит, ксилит и арабит. Изотонический агент может присутствовать отдельно или в совокупности в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 50 мг/мл, например, от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных изотонических средств, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00171] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит хелатирующий агент. Неограничивающие примеры хелатирующих агентов включают лимонную кислоту, аспарагиновую кислоту, соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и их смеси. Хелатирующий агент может присутствовать индивидуально или в совокупности в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 50 мг/мл, например, от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных хелатирующих агентов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00172] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит стабилизатор. Неограничивающие примеры стабилизаторов включают один или несколько ингибиторов агрегации, один или несколько ингибиторов окисления, одно или несколько поверхностно-активных веществ и/или один или несколько ингибиторов протеазы.

[00173] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит стабилизатор, где указанный стабилизатор представляет собой карбокси-/гидроксицеллюлозу и ее производные (такие как НРС, НРС-SL, НРС-L и НРМС), циклодекстрины, 2-метилтиоэтанол, полиэтиленгликоль (такой как ПЭГ 3350), поливиниловый спирт (ПВС), поливинилпирролидон, соли (такие как хлорид натрия), серосодержащие вещества, такие как монотиоглицерин) или тиогликолевая кислота. Стабилизатор может присутствовать индивидуально или в совокупности в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 50 мг/мл, например, от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных стабилизаторов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00174] В дополнительных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит одно или несколько поверхностно-активных веществ, предпочтительно поверхностно-активное вещество, по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество или два разных поверхностно-активных вещества. Термин «поверхностно-активное вещество» относится к любым молекулам или ионам, которые состоят из водорастворимой (гидрофильной) части и жирорастворимой (липофильной) части. Поверхностно-активное вещество может быть выбрано, например, из группы, состоящей из анионных поверхностно-активных веществ, катионных поверхностно-активных веществ, неионогенных поверхностно-активных веществ и/или цвиттерионных поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активное вещество может присутствовать индивидуально или в совокупности в концентрации от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных поверхностно-активных веществ, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00175] В дополнительном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит один или несколько ингибиторов протеазы, таких как, например, ЭДТА и/или бензамидинхлористоводородная кислота (HCl). Ингибитор протеазы может присутствовать индивидуально или в совокупности в концентрации от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих специфических ингибиторов протеазы, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00176] В другом общем аспекте изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и/или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающему объединение

моноклонального антитела или его антигенсвязывающий фрагмент и/или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

[00177] Способы применения

[00178] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения рака у пациента включающему введение пациенту CAR-T-клеток и/или CAR-NK-клеток по изобретению. Рак может быть выбран, например, без ограничения, из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

[00179] В другом общем аспекте изобретение относится к способу нацеливания на ТАА (например, TTP-1 или GPC3) на поверхность раковых клеток у пациента для достижения уничтожения клеток, способу, включающему введение пациенту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает ТАА, или фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или биспецифическое антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Связывание моноклонального или биспецифического антитела или антигенсвязывающего фрагмента ТАА с ТАА может опосредовать комплементзависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) и/или антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или другие эффекты, которые приводит к гибели раковой клетки-мишени. Моноклональное или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут, например, служить для рекрутирования конъюгированных лекарственных средств и/или могут образовывать биспецифическое антитело с другим моноклональным антителом для опосредования гибели раковой клетки-мишени.

[00180] Функциональную активность антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают ТАА (например, TTP-1 или GPC3), можно охарактеризовать способами, известными в данной области, и как описано в настоящем документе. Способы характеристики антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают ТАА, включают, но не ограничиваются ими, анализы аффинности и специфичности, включая анализ Biacore, ELISA и OctetRed, а также обнаружение связывания антител и антигенсвязывающих фрагментов с ТАА на клетках (либо клетках, трансфицированных ТАА, либо клетках, которые естественным образом экспрессируют

ТАА) с помощью FACS. В соответствии с конкретными вариантами осуществления способы характеристики антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают ТАА, включают способы, описанные ниже.

[00181] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения рака у пациента включающему введение пациенту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или биспецифического антитела или антигенсвязывающего фрагмента, его специфически связывает ТАА (например, TIP-1 или GPC3) или фармацевтическую композицию по изобретению. Рак может быть выбран, например, без ограничения, из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

[00182] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения воспалительного заболевания у пациента, включающему введение пациенту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или биспецифического антитела или антигенсвязывающего его фрагмент, который специфически связывает ТАА (например, TIP-1 или GPC3), или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению.

[00183] В соответствии с вариантами осуществления изобретения CAR-T-клетка или CAR-NK-клетки содержат терапевтически эффективное количество экспрессированных CAR по изобретению, и фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество анти-ТАА антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, анти-TIP-1 антитело или анти-GPC3 антитело). Как используется в настоящем документе, термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству активного ингредиента или компонента, которое вызывает желаемый биологический или лекарственный ответ у пациента. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели.

[00184] Как используется в настоящем документе в отношении CAR термин «терапевтически эффективное количество» означает количество молекулы CAR, экспрессируемой в трансдуцированной Т-клетке или NK-клетке, которое модулирует иммунный ответ у пациента, нуждающегося в этом. Кроме того, как используется в настоящем документе в отношении CAR, терапевтически эффективное количество означает количество молекулы CAR, экспрессируемой в трансдуцированной Т-клетке или NK-клетке, что приводит к лечению заболевания, расстройства или состояния;

предотвращает или замедляет прогрессирование заболевания, расстройства или состояния; или уменьшает или полностью облегчает симптомы, связанные с заболеванием, нарушением или состоянием.

[00185] Как используется в настоящем документе в отношении CAR-T-клеток или CAR-NK-клеток, терапевтически эффективное количество означает количество CAR-T-клеток или CAR-NK-клеток, которое модулирует иммунный ответ у пациента. Кроме того, как используется в настоящем документе в отношении CAR-T-клеток или CAR-NK-клеток, терапевтически эффективное количество означает количество CAR-T-клеток или CAR-NK-клеток, которое приводит к лечению заболевания, расстройства или состояния; предотвращает или замедляет прогрессирование заболевания, расстройства или состояния; или уменьшает или полностью облегчает симптомы, связанные с заболеванием, нарушением или состоянием.

[00186] Как используется в настоящем документе в отношении антител против ТАА или их антигенсвязывающих фрагментов терапевтически эффективное количество означает количество антитела против ТАА или его антигенсвязывающего фрагмента, которое модулирует иммунный ответ у пациента. Кроме того, как используется в настоящем документе в отношении антител против ТАА или их антигенсвязывающих фрагментов, терапевтически эффективное количество означает количество антитела против ТАА или его антигенсвязывающего фрагмента, которое приводит к лечению заболевания, расстройства или состояния; предотвращает или замедляет прогрессирование заболевания, расстройства или состояния; или уменьшает или полностью облегчает симптомы, связанные с заболеванием, нарушением или состоянием.

[00187] В соответствии с конкретными вариантами осуществления заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, представляет собой рак, предпочтительно рак, выбранный из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, представляет собой воспалительное заболевание.

[00188] В соответствии с конкретными вариантами осуществления терапевтически эффективное количество относится к количеству терапевтического средства, достаточного для достижения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) снижение или облегчение тяжести заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптомом; (ii) уменьшение продолжительности

[00190] В соответствии с конкретными вариантами осуществления композиции, описанные в настоящем документе, составлены таким образом, чтобы они подходили для предполагаемого пути введения пациенту. Например, композиции, описанные в настоящем документе, могут быть составлены таким образом, чтобы они подходили для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

[00192] Фармацевтические композиции, содержащие клетки по изобретению, экспрессирующие CAR по изобретению, могут быть предоставлены в виде стерильных

жидких препаратов, как правило, изотонических водных растворов с клеточными суспензиями или, необязательно, в виде эмульсий, дисперсий и тому подобное, которые обычно забуферены до выбранного pH. Композиции могут содержать носители, например, воду, физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор и тому подобное, подходящие для обеспечения целостности и жизнеспособности клеток и для введения клеточной композиции.

[00193] Стерильные растворы для инъекций можно приготовить путем включения клеток по изобретению в подходящее количество соответствующего растворителя с различными другими ингредиентами по желанию. Такие композиции могут включать фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент, такой как стерильная вода, физиологический раствор, глюкоза, декстроза и тому подобное, которые подходят для применения с клеточной композицией и для введения пациенту, например, человеку. Подходящие буферы для получения клеточной композиции хорошо известны в данной области. Любое используемое средство, разбавитель или добавка совместимы с консервантом.

[00194] Клетки по изобретению можно вводить в любом физиологически приемлемом носителе. Популяция клеток, содержащая клетки по изобретению, может включать очищенную популяцию клеток. Специалисты в данной области могут легко определить клетки в клеточной популяции, используя различные хорошо известные способы. Диапазоны чистоты в клеточных популяциях, содержащих генетически модифицированные клетки по изобретению, могут составлять от около 50% до около 55%, от около 55% до около 60%, от около 60% до около 65%, от около 65% до около 70%, от около 70% до около 75%, от около 75% до около 80%, от около 80% до около 85%, от около 85% до около 90%, от около 90% до около 95% или от около 95% до около 100%. Дозировки могут быть легко отрегулированы специалистами в данной области, например, снижение чистоты может потребовать увеличения дозировки.

[00195] Клетки по изобретению обычно вводят в виде дозы, основанной на количестве клеток на килограмм (клеток/кг) массы тела пациента, которому вводят клетки. Как правило, клеточные дозы находятся в диапазоне от около 10^4 до около 10^{10} клеток/кг массы тела, например, от около 10^5 до около 10^9 , от около 10^5 до около 10^8 , от около 10^5 до около 10^7 или от около 10^5 до около 10^6 , в зависимости от режима и места введения. Как правило, в случае системного введения используют более высокую дозу, чем при регионарном введении, когда иммунные клетки по изобретению вводят в область опухоли и/или рака. Примерные диапазоны доз включают, но не ограничиваются ими, от 1×10^4 до 1×10^8 , от 2×10^4 до 1×10^8 , от 3×10^4 до 1×10^8 , от 4×10^4 до 1×10^8 , от 5×10^4 до 6×10^8 , от 7×10^4 до 1×10^8 , от 8×10^4 до 1×10^8 , от 9×10^4 до 1×10^8 , от 1×10^5 до 1×10^8 , от 1×10^5 до 9×10^7 , от 1×10^5 до 8×10^7 , от 1×10^5 до 7×10^7 , от 1×10^5 до 6×10^7 , от 1×10^5 до 5×10^7 , от 1×10^5 до 4×10^7 , от 1×10^5 до 4×10^7 , от 1×10^5 до 3×10^7 , от 1×10^5 до 2×10^7 , от 1×10^5 до 1×10^7 , от 1×10^5 до 9×10^6 , от 1×10^5 до 8×10^6 , от 1×10^5 до 7×10^6 , от 1×10^5 до 6×10^6 , от 1×10^5 до 5×10^6 , от 1×10^5 до 4×10^6 , от 1×10^5 до 4×10^6 , от 1×10^5 до 3×10^6 , от 1×10^5 до 2×10^6 , от 1×10^5 до

1×10^6 , от 2×10^5 до 9×10^7 , от 2×10^5 до 8×10^7 , от 2×10^5 до 7×10^7 , от 2×10^5 до 6×10^7 , от 2×10^5 до 5×10^7 , от 2×10^5 до 4×10^7 , от 2×10^5 до 4×10^7 , от 2×10^5 до 3×10^7 , от 2×10^5 до 2×10^7 , от 2×10^5 до 1×10^7 , от 2×10^5 до 9×10^6 , от 2×10^5 до 8×10^6 , от 2×10^5 до 7×10^6 , от 2×10^5 до 6×10^6 , от 2×10^5 до 5×10^6 , от 2×10^5 до 4×10^6 , от 2×10^5 до 4×10^6 , от 2×10^5 до 3×10^6 , от 2×10^5 до 2×10^6 , от 2×10^5 до 1×10^6 , от 3×10^5 до 3×10^6 клеток/кг и тому подобное. Кроме того, доза может быть скорректирована с учетом того, вводится ли однократная доза или вводятся многократные дозы. Точное определение того, что можно считать эффективной дозой, может быть основано на факторах, индивидуальных для каждого пациента.

[00196] Как используется в настоящем документе, термины «лечить», «лечение» и «излечение» предназначены для обозначения улучшения или изменения по меньшей мере одного измеримого физического параметра, относящегося к раку и/или воспалительному заболеванию, расстройству. или состояние, которое не обязательно различимо в пациенте, но может быть различимо в пациенте. Термины «лечить», «лечение» и «излечение» могут также относиться к вызыванию регрессии, предотвращению прогрессирования или, по крайней мере, замедлению прогрессирования заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления изобретения «лечить», «лечение» и «излечение» относятся к облегчению, предотвращению развития или возникновения или сокращению продолжительности одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием, нарушением или состоянием, таким как опухоль или, более предпочтительно, рак. В конкретном варианте осуществления «лечить», «лечение» и «излечение» относятся к предотвращению рецидива заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечение» и «излечение» относятся к увеличению выживаемости пациента, страдающего заболеванием, нарушением или состоянием. В конкретном варианте осуществления изобретения термины «лечить», «лечение» и «излечение» относятся к устранению заболевания, расстройства или состояния у пациента.

[00197] В соответствии с конкретными вариантами осуществления предложены композиции, применяемые для лечения рака и/или воспалительного заболевания, расстройства или состояния. Для лечения рака предлагаемые композиции можно использовать в сочетании с другим лечением, включая, но не ограничиваясь этим, химиотерапию, анти-CD20 mAb, анти-TIM-3 mAb, анти-LAG-3 mAb, анти-EGFR mAb, анти-HER-2 mAb, анти-CD19 mAb, анти-CD33 mAb, анти-CD47 mAb, анти-CD73 mAb, анти-DLL-3 mAb, анти-апелин mAb, анти-FOLR1 mAb, анти-CTLA-4 mAb, анти-PD-L1 mAb, анти-PD-1 mAb, анти-клаудин 18.2 mAb, другие иммуноонкологические препараты, антиангиогенный агент, лучевую терапию, конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), таргетную терапию или другие противораковые препараты. Антитела против данного ТАА можно использовать для конструирования биспецифических антител с партнерскими mAb против PD-1, PD-L1, LAG3, TIM-3, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD33, CD73, CD47, CD3, апелин, DLL-3, TIP-1, GPC3, клаудин 18.2, рецептор фолиевой кислоты альфа (FOLR1) и/или второй ТАА для лечения рака/опухолей, которые

экспрессируют оба ТАА. Два антитела, которые распознают два разных эпитопа на одном и том же ТАА, также можно использовать для конструирования биспецифического антитела для лечения рака/опухолей, которые экспрессируют ТАА.

[00198] В соответствии с конкретными вариантами осуществления способы лечения рака у пациента включают введение пациенту CAR-T-клеток и/или CAR-NK-клеток по изобретению в сочетании с агентом, повышающим эффективность клетки, экспрессирующей молекулу CAR. Такие агенты включают, но не ограничиваются ими, фрагмент антитела, который связывается с CD73, CD39, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3 или LAG3, или антагонист рецептора аденозина A2a.

[00199] В соответствии с конкретными вариантами осуществления способы лечения рака у пациента включают введение пациенту CAR-T-клеток и/или CAR-NK-клеток по изобретению в сочетании с агентом, который ослабляет один или несколько побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей молекулу CAR. Такие агенты включают, но не ограничиваются ими, стероид, ингибитор TNF α или ингибитор IL-6.

[00200] В соответствии с конкретными вариантами осуществления способы лечения рака у пациента включают введение пациенту CAR-T-клеток и/или CAR-NK-клеток по изобретению в комбинации с агентом, который лечит заболевание, связанное с ОПКЗ. Такие агенты включают, но не ограничиваются ими, моноклональное антитело против GPC3 или биспецифическое антитело.

[00201] Как используется в настоящем документе, термин «в комбинации» в контексте введения двух или более видов терапевтических средств пациенту относится к применению более чем одного вида терапевтического средства. Использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок, в котором пациенту вводят терапевтические средства. Например, первое терапевтическое средство (например, композиция, описанная в настоящем документе) может быть введена до (например, за 5 минут, за 15 минут, за 30 минут, за 45 минут, за 1 час, за 2 часа, за 4 часа, за 6 часов, за 12 часов, за 16 часов, за 24 часа, за 48 часов, за 72 часа, за 96 часов, за 1 неделю, за 2 недели, за 3 недели, за 4 недели, за 5 недель, за 6 недель, за 8 недель или за 12 недель), одновременно или после (например, через 5 минут, через 15 минут, через 30 минут, через 45 минут, через 1 час, через 2 часа, через 4 часа, через 6 часов, через 12 часов, через 16 часов, через 24 часа, через 48 часов, через 72 часа, через 96 часов, через 1 неделю, через 2 недели, через 3 недели, через 4 недели, через 5 недель, через 6 недель, через 8 недель или через 12 недель) введения второй терапии пациенту.

[00202] В другом общем аспекте изобретение относится к способу определения уровня ТАА (например, TTP-1 или GPC3) у пациента. Способы включают (a) получение образца от пациента; (b) приведение образца в контакт с моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и (c) определение уровня ТАА у пациента.

[00203] Как используется в настоящем документе, термин «образец» относится к биологическому образцу, выделенному от пациента, и может включать, но этим не ограничивается, цельную кровь, сыворотку, плазму, клетки крови, эндотелиальные клетки, биопсию ткани (например, раковой ткани), лимфатическую жидкость, асцитическую жидкость, интерстициальную жидкость, костный мозг, спинномозговую жидкость, слюну, слизь, мокроту, пот, мочу или любую другую секрецию, экскрецию или другие жидкости организма. «Образец крови» относится к цельной крови или любой ее фракции, включая клетки крови, сыворотку и плазму.

[00204] В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень ТАА (например, TTP-1 или GPC3) у пациента можно определить с использованием анализов, выбранных, но этим не ограничиваясь, из анализа вестерн-блоттинга, иммуногистохимии (ИГХ) и анализа ELISA. Относительные уровни белка можно определить с помощью вестерн-блоттинга и ИНС, и абсолютные уровни белка могут быть определены с использованием анализа ELISA. При определении относительных уровней ТАА уровни ТАА могут быть определены по крайней мере между двумя образцами, например, между образцами одного и того же пациента в разные моменты времени, между образцами разных тканей одного и того же пациента и/или между образцами разных пациентов. Альтернативно, при определении абсолютных уровней ТАА, например, с помощью анализа ELISA, абсолютный уровень ТАА в образце можно определить путем создания стандарта для анализа ELISA перед тестированием образца. Специалисту в данной области должно быть понятно, какие аналитические методики использовать для определения уровня ТАА в образце пациента с использованием антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению.

[00205] Использование способов определения уровня ТАА (например, TTP-1 или GPC3) в образце, взятом у пациента, может привести к диагностике аномальных (повышенных, сниженных или недостаточных) уровней ТАА при заболевании и принятию соответствующих терапевтических решений. Такое заболевание может быть выбрано из, но не ограничиваясь ими, рака и воспалительного заболевания. Кроме того, путем мониторинга уровней ТАА у пациента можно определить риск развития заболевания, как указано выше, на основе информации об уровне ТАА при конкретном заболевании и/или во время прогрессирования конкретного заболевания.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00206] Изобретение также охватывает следующие неограничивающие варианты осуществления.

[00207] Вариант осуществления изобретения 1 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

(1) SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90, 91 и 92, соответственно;

- (2) SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112 и 113, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 и 22, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35 и 36, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49 и 50, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62, 63 и 64, соответственно; или
- (7) SEQ ID NO: 73, 74, 75, 76, 77 и 78, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает GPC3, предпочтительно, специфически связывает GPC3 человека.

[00208] Вариант осуществления изобретения 2 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 93, 94, 95, 96, 97 и 98, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 114, 115, 116, 117, 118 и 119, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 и 28, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41 и 42, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55 и 56, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69 и 70, соответственно; или
- (7) SEQ ID NO: 79, 80, 81, 82, 83 и 84, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает GPC3, предпочтительно, специфически связывает GPC3 человека.

[00209] Вариант осуществления изобретения 3 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8, соответственно.

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает TTP-1, предпочтительно, TTP-1 человека.

[00210] Вариант осуществления изобретения 4 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13 и 14, соответственно.

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает TTP-1, предпочтительно, TTP-1 человека.

[00211] Вариант осуществления изобретения 5 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с

любым из вариантов осуществления 1-4, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 85, 106, 15, 29, 43, 57, 71 или 1, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 86, 107, 16, 30, 44, 58, 72 или 2.

[00212] Вариант осуществления изобретения 6 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-5, содержащий

(1) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:85, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:86;

(2) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:106, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:107;

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

(4) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:30;

(5) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:43, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:44;

(6) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:58;

(7) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:71, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:72; or

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

[00213] Вариант осуществления изобретения 7 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются химерными и/или человеческими или гуманизированными.

[00214] Вариант осуществления изобретения 8 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 7, где гуманизированное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую

полипептидную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную какой-либо из SEQ ID NO: 99-102, 120-123, 126-132, 139-140, 143-149, 153-156, 160-163, 183-197 или 202-205, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную какой-либо из SEQ ID NO: 103-105, 124-125, 133-138, 141-142, 150-152, 157-159, 164-166 или 198-201.

[00215] Вариант осуществления изобретения 9 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 8, где гуманизованное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:99, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(2) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:99, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(3) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:100, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(4) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:100, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(5) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:101, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(6) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:101, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(7) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:102, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:105;

(8) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:120, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:124;

(9) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:120, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:125;

(75) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 197, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 201.

[00216] Вариант осуществления изобретения 10 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-9, где выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны индуцировать опосредованный эффектором лизис опухолевых клеток посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC); опосредование набора конъюгированных препаратов; и/или образование биспецифического антитела с другим mAb или его антигенсвязывающим фрагментом, обладающим эффектом уничтожения рака.

[00217] Вариант осуществления изобретения 11 представляет собой выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-10.

[00218] Вариант осуществления изобретения 12 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления изобретения 1-10.

[00219] Вариант осуществления изобретения 13 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления изобретения 11.

[00220] Вариант осуществления изобретения 14 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления изобретения 12 или 13.

[002210] Вариант осуществления изобретения 15 представляет собой клетку-хозяин, содержащую вектор по варианту осуществления изобретения 14.

[00222] Вариант осуществления изобретения 16 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления изобретения 1-10 или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления изобретения 11 и фармацевтически приемлемый носитель.

[00223] Вариант осуществления изобретения 17 представляет собой способ нацеливания на ТАА на поверхность раковых клеток, и/или лечения рака, и/или лечения воспалительного заболевания у пациента включающий введение пациенту фармацевтической композиции по варианту осуществления изобретения 16, где, необязательно, рак выбран из группы, включающей рак легкого, рак желудка, рак пищевода, рак желчных протоков, холангиокарциному, рак толстой кишки, гепатоцеллюлярную карциному, почечно-клеточную карциному, уротелиальную карциному мочевого пузыря, метастатическую меланому, рак молочной железы, рак

яичников, рак шейки матки, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, глиому, глиобластому и другие солидные опухоли, а также неходжкинскую лимфому (NHL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелогенный лейкоз (CML), множественную миелому (MM), острый миелоидный лейкоз (AML) и другие жидкие опухоли.

[00224] Вариант осуществления изобретения 18 представляет собой способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления изобретения 1-10 или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по варианту осуществления изобретения 11, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в условиях, обеспечивающих получение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

[00225] Вариант осуществления изобретения 19 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления изобретения 1-10 или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления изобретения 11, включающий объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

[00226] Вариант осуществления изобретения 20 представляет собой способ определения уровня ТАА у пациента, включающий:

- а. получение образца от пациента;
- б. приведение образца в контакт с выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из вариантов осуществления изобретения 1-10; и
- с. определение уровня ТАА у пациента.

[00227] Вариант осуществления изобретения 21 представляет собой способ по варианту осуществления изобретения 20, где образец представляет собой образец ткани или образец крови, необязательно, при этом образец ткани представляет собой образец раковой ткани.

[00228] Вариант осуществления изобретения 22 представляет собой выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит:

- (a) внеклеточный домен, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, который специфически связывает GPC3;
- (b) шарнирную область;
- (c) трансмембранную область; и
- (d) внутриклеточный сигнальный домен.

[00229] Вариант осуществления изобретения 23 представляет собой выделенный полинуклеотид по варианту осуществления 22, где антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90, 91 и 92, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112 и 113, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 и 22, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35 и 36, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49 и 50, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62, 63 и 64, соответственно; или
- (7) SEQ ID NO: 73, 74, 75, 76, 77 и 78, соответственно;

где антигенсвязывающий домен специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека.

[00230] Вариант осуществления изобретения 24 представляет собой выделенный полинуклеотид по варианту осуществления 22, где антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 93, 94, 95, 96, 97 и 98, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 114, 115, 116, 117, 118 и 119, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 и 28, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41 и 42, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55 и 56, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69 и 70, соответственно; или
- (7) SEQ ID NO: 79, 80, 81, 82, 83 и 84, соответственно;

где антигенсвязывающий домен специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека.

[00231] Вариант осуществления изобретения 25 представляет собой выделенный полинуклеотид по любому из вариантов осуществления изобретения 22-24, где антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 85, 106, 15, 29, 43, 57 или 71, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 86, 107, 16, 30, 44, 58 или 72.

[00232] Вариант осуществления изобретения 26 представляет собой выделенный полинуклеотид по варианту осуществления 25, где антигенсвязывающий домен содержит:

a. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:85, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:86;

b. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:106, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:107

c. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:16;

d. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:29, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:30;

e. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:43, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:44;

f. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:57, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:58; или

g. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:71, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:72.

[00233] Вариант осуществления изобретения 27 представляет собой выделенный полинуклеотид по любому из вариантов осуществления изобретения 22-24, где антигенсвязывающий домен гуманизирован и содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 99-102, 120-123, 126-132, 139-140, 143-149, 153-156, 160-163, 183-197 или 202-205, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 103-105, 124-125, 133-138, 141-142, 150-152, 157-159, 164-166 или 198-201.

[00234] Вариант осуществления изобретения 28 представляет собой выделенный полинуклеотид по варианту осуществления 27, где антигенсвязывающий домен гуманизирован и содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:99, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(2) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:99, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(68) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 195, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200;

(69) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 194, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200;

(70) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 185, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200;

(71) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 187, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 104;

(72) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 187, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200;

(73) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 187, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 199;

(74) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 196, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 201; или

(75) варибельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 197, и варибельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 201.

[00235] Вариант осуществления изобретения 29 представляет собой выделенный полинуклеотид по любому из вариантов осуществления изобретения 22-28, где антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), который специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека.

[00236] Вариант осуществления изобретения 30 представляет собой выделенный полинуклеотид по варианту осуществления 29, где одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv) является гуманизированным.

[00237] Вариант осуществления изобретения 31 представляет собой выделенный полинуклеотид по варианту осуществления 29 или 30, где одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv) содержит полипептидную последовательность по меньшей мере на 95% идентичную какой-либо из SEQ ID NO: 167-182.

[00238] Вариант осуществления изобретения 32 представляет собой выделенный полинуклеотид по любому из вариантов осуществления изобретения 22-31, где химерный антигенный рецептор (CAR) содержит один или несколько антигенсвязывающих доменов.

[00239] Вариант осуществления изобретения 33 представляет собой выделенный полинуклеотид по любому из вариантов осуществления изобретения 22-32, где

внутриклеточный сигнальный домен содержит один или несколько костимулирующих доменов и один или несколько активирующих доменов.

[00240] Вариант осуществления изобретения 34 представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), кодируемый выделенным полинуклеотидом по любому из вариантов осуществления изобретения 22-33.

[00241] Вариант осуществления изобретения 35 представляет собой вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по любому из вариантов осуществления изобретения 22-33.

[00242] Вариант осуществления изобретения 36 представляет собой клетку-хозяин, содержащую вектор по варианту осуществления изобретения 35.

[00243] Вариант осуществления изобретения 37 представляет собой клетку-хозяин по варианту осуществления изобретения 36, где клетка-хозяин представляет собой Т-клетку, предпочтительно, человеческую Т-клетку.

[00244] Вариант осуществления изобретения 38 представляет собой клетку-хозяин по варианту осуществления изобретения 36, где клетка-хозяин представляет собой НК-клетку, предпочтительно НК-клетку человека.

[00245] Вариант осуществления изобретения 39 представляет собой способ получения клетки-хозяина, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), где способ включает трансдукцию Т-клетки вектором по варианту осуществления изобретения 35.

[00246] Вариант осуществления изобретения 40 представляет собой способ получения Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), включающий культивирование Т-клеток, содержащих выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по любому из вариантов осуществления изобретения 22-33 в условиях для получения CAR-Т-клетки и выделения CAR-Т-клетки.

[00247] Вариант осуществления изобретения 41 представляет собой способ получения клетки-хозяина, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), где способ включает трансдукцию НК-клетки вектором по варианту осуществления изобретения 35.

[00248] Вариант осуществления изобретения 42 представляет собой способ получения химерного антигенного рецептора (CAR)-НК-клетки, где способ культивирование НК-клеток, содержащих выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по любому из вариантов осуществления изобретения 22-33 в условиях для получения клетки CAR-НК и выделения клетки CAR-НК.

[00249] Вариант осуществления изобретения 43 представляет собой способ получения клетки, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), где способ включает приведение клетки в контакт с выделенным полинуклеотидом, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по любому из

вариантов осуществления изобретения 22-33, где выделенный полинуклеотид представляет собой транскрибируемую *in vitro* РНК или синтетическую РНК.

[00250] Вариант осуществления изобретения 44 представляет собой способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту клетки-хозяина по любому из вариантов осуществления изобретения 36-38, где, необязательно, рак выбран из рака легкого, рака желудка, рака пищевода, рака желчных протоков, холангиокарциномы, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

[00251] Вариант осуществления изобретения 45 представляет собой способ по варианту осуществления изобретения 44, дополнительно включающий введение пациенту агента, повышающего эффективность клеток, экспрессирующих CAR.

[00252] Вариант осуществления изобретения 46 представляет собой способ по варианту осуществления изобретения 44, дополнительно включающий введение пациенту агента, который ослабляет один или несколько побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей CAR.

[00253] Вариант осуществления изобретения 47 представляет собой способ по варианту осуществления изобретения 44, дополнительно включающий введение пациенту средства для лечения заболевания, связанного с GPC3.

ПРИМЕРЫ

[00254] Пример 1: Идентификация анти-ТАА моноклональных антител

[00255] Мышей иммунизировали антигенами, получали гибридомы и подвергали скринингу с помощью ELISA и/или FACS. Положительные клоны выделяли и секвенировали.

[00256] Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей (области VH и VL, соответственно) для анти-ТАА моноклональных антител представлены в таблицах 1 и 2, а области CDR для анти-ТАА моноклональных антител представлены в таблицах 3-6.

Таблица 1: Последовательности переменных областей тяжелой цепи для mAb

Мишень	Клоны mAb	VH	SEQ ID NO:
TIP-1	T5	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSMHWVKQAP GKGLKWMGWIKTETGKPIYTDDFKGRFAFSLETSASTAYLQI	1

		NNLKNEDTATYFCAPTGM DYWGQGT SVTVSS	
GPC3	26A1	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQR PGQGLEWIGEIDPFDSYTYYNQKFKGKATLTVDKSSNTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARRDGVYKWFYFDVWGAGTTVTVSS	15
GPC3	30D11	QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYEMHWVKET PVHGLEWIGAIDPENGGAIFNQKFKDKATLSADKSSSTAYME LRSLTYEDSAVYYCTREEIYNDYDGVYWGQGTTLTVSS	29
GPC3	36F8	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSNSWMNWVKQR PGKGLEWIGWIYPGDGDTNYNGKFKGKATLAADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYFCARSGPITMGFTYWGQGTTLTVSA	43
GPC3	39E1	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQR PGQGLEWIGEIDPFDSYTYYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARHYGYDRWYFDVWGAGTTVTVSS	57
GPC3	43B9	QVQLQQSGPELLKPGASVKISCKASGYAFSDYWMNWVKQR PGEGLEWIGRIYPGDGDTNYSKGKFKGKATLTADKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYFCARLSFGAWFAYWGQGTTLTVSA	71
GPC3	M3	QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTDYEMHWVKQT PVHGLEWIGAIDPETGDTAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYM DLRSLTSEDSAVYYCTRYFSFAYWGQGTTLTVSA	85
GPC3	F7	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSKVASGFTFSNYWMNWVRQS PEKGLEWVAQIRLKSDNYATHYAESVKGRFTISRDDSKSSVY LQMNNLRAEDTGIYYCTVGGNYWGQGT SVTVSS	106

VH: переменная область тяжелой цепи

Таблица 2: Последовательности переменных областей легкой цепи для mAb

Мишень	Клоны mAb	VL	SEQ ID NO:
TIP-1	T5	DVVM TQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWL LQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISR V EAEDLG VYYCWQGT HFPRTFGGGTKLEIK	2
GPC3	26A1	DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKASQDINKSI AWYQH KPG KGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFISNLEPEDIAT YYCLQYDSL L YTFGGGTKLEIK	16
GPC3	30D11	DVVM TQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLNWL QQRPGQSPKRLMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSETDFTLKISR	30

		VEAEDLGVYYCLQVTTYYPYTFGGGKLEIK	
GPC3	36F8	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLSWYQQKPD GTVKLLIYYTSNLHSGVPSRFSGSESGTDYSLTITNLEPEDIA TYYCQQYSKFPWTFGGGKLEIK	44
GPC3	39E1	DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKASQDINKYIVWYQHKPG KGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFISISNLEPEDIAT YCYCQQYDNLLRTFGGGKLEIK	58
GPC3	43B9	DIQMTQSPSSLSASLGKVTITCKASRDINKYIGWYQHKPG KGPRLLIHYTSTLQPGTPSRFSGSGSGRDYSFISISNLEPEDIA TYYCLQYDNLTYTFGGGKLEIK	72
GPC3	M3	DVVMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLRHSNGNTYLQW YLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGIYFCYQSKHVPYTFGGGKLEIK	86
GPC3	F7	AIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISGNLWLQQKPH GTIKRLIYAATTLDSGV PKRFSGSRSGSDYTLTISSESEDF DYYCLQYDSYPWTFGGGKLEIK	107

VL: переменная область легкой цепи

Таблица 3: Области CDR 1-3 тяжелой цепи для mAb

Мишень	Клоны mAb	HC CDR1	NO	HC CDR2	NO	HC CDR3	NO
TIP-1	T5	GYTFTDY S	3	IKTETGKP	4	APTGM DY	5
GPC3	26A1	GYTFTSY W	17	IDPFDSYT	18	ARRDGVYKWYF DV	19
GPC3	30D11	GYTFTDY E	31	IDPENGGI	32	TREEIYNDYDGV DY	33
GPC3	36F8	GYAFSNS W	45	IYPGDGDT	46	ARSGPITMGFTY	47
GPC3	39E1	GYTFTSY W	59	IDPFDSYT	60	ARHYGYDRWYF DV	61
GPC3	43B9	GYAFSDY W	73	IYPGDGDT	74	ARLSFGAWFAY	75
GPC3	M3	GYTFTDY E	87	IDPETGDT	88	TRYFSFAY	89
GPC3	F7	GFTFSNY	108	IRLKSDNYA	109	TVGGNY	110

		W		T			
--	--	---	--	---	--	--	--

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

CDR HC для анти-TAA mAb определяли с использованием метода IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

Таблица 4: Области CDR 1-3 легкой цепи для mAb

Мишень	Клоны mAb	LC CDR1	NO	LC CDR2	NO	LC CDR3	NO
TIP-1	T5	QSLDSDGKTY	6	LVS	7	WQGTHFPRT	8
GPC3	26A1	QDINKS	20	YTS	21	LQYDSLLYT	22
GPC3	30D11	QSLLYSDGKTY	34	QVS	35	LQVTYYPYT	36
GPC3	36F8	QGISNY	48	YTS	49	QQYSKFPWT	50
GPC3	39E1	QDINKY	62	YTS	63	QQYDNLLRT	64
GPC3	43B9	RDINKY	76	YTS	77	LQYDNLYT	78
GPC3	M3	QSLRHSNGNTY	90	KVS	91	YQSKHVPYT	92
GPC3	F7	QEISGN	111	AAT	112	LQYDSYPWT	113

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

CDR LC для анти-TAA mAb определяли с использованием метода IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

Таблица 5: Области CDR 1-3 тяжелой цепи для mAb

Мишень	Клоны mAb	HC CDR1	NO	HC CDR2	NO	HC CDR3	NO
TIP-1	T5	DYSMH	9	WIKTETGKPIYTDDFKG	10	TGMDY	11
GPC3	26A1	SYWMH	23	EIDPFDSYTYYNQKFKG	24	RDGVYKWYF DV	25
GPC3	30D11	DYEMH	37	AIDPENGGI AFNQKFKD	38	EEIYNDYDGV DY	39
GPC3	36F8	NSWMN	51	WIYPGDGDTNYNGKFKG	52	SGPITMGFTY	53
GPC3	39E1	SYWMH	65	EIDPFDSYTYYNQKFKG	66	HYGYDRWYF DV	67

GPC3	43B9	DYWMN	79	RIYPGDGDTNYSKG FKG	80	LSFGAWFAY	81
GPC3	M3	DYEMH	93	AIDPETGDTAYNQK FKG	94	YFSFAY	95
GPC3	F7	NYWMN	114	QIRLKSDNYATHYA ESVKG	115	GGNY	116

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

CDR HC для анти-TAA mAb определяли с использованием метода Kabat (Elvin A. Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. 1991).

Таблица 6: Области CDR 1-3 легкой цепи для mAb

Мишень	Клоны mAb	LC CDR1	NO	LC CDR2	NO	LC CDR3	NO
TIP-1	T5	KSSQSLLDSGKT YLN	12	LVSKLDS	13	WQGTHFPRT	14
GPC3	26A1	KASQDINKSIA	26	YTSTLQP	27	LQYDSLTYT	28
GPC3	30D11	KSSQSLLYSDGKT YLN	40	QVSKLDP	41	LQVTYYPYT	42
GPC3	36F8	SASQGISNYLS	54	YTSNLHS	55	QQYSKFPWT	56
GPC3	39E1	KASQDINKYIV	68	YTSTLQP	69	QQYDNLLRT	70
GPC3	43B9	KASRDINKYIG	82	YTSTLQP	83	LQYDNLYT	84
GPC3	M3	RSSQSLRHSNGNT YLQ	96	KVSNRFS	97	YQSKHVPYT	98
GPC3	F7	RASQEISGNLG	117	AATTLDS	118	LQYDSYPWT	119

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

CDR LC для анти-TAA mAb определяли с использованием метода Kabat (Elvin A. Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. 1991).

[00257] Пример 2: Получение и очистка mAb из культуральной среды трансфицированных клеток

[00258] Для получения рекомбинантных химерных mAb против TAA экспрессионные векторы, содержащие мышинные переменные области (VH и VL), слитые с константными областями тяжелой цепи и легкой каппа-цепи IgG1 человека, соответственно, временно трансфицировали в ExpiCHO-S или клетки Expi293F. Рекомбинантные антитела, полученные в суспензии клеток ExpiCHO-S или Expi293F, очищали с помощью аффинной хроматографии с белком А.

[00259] Пример 3: ELISA-анализ связывания очищенных химерных mAb

[00260] Очищенные химерные mAb тестировали в анализе ELISA на их способность связываться с иммобилизованным TIP-1. Рекомбинантный TIP-1 человека в буфере PBS наносили на 96-луночный планшет при комнатной температуре на 1 час. Планшет блокируют 5% BSA в TBST на 1 час при комнатной температуре. В каждой лунке индивидуального планшета МАТ в различных концентрациях инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшет промывали и определяли связывание с TIP-1 с помощью античеловеческого IgG, конъюгированного с пероксидазой хрена (hIgG-HRP) (hIgG-HRP) (ThermoFisher Scientific, номер по каталогу: H10007) при инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем, после промывки, проводили ELISA с использованием раствора для одноэтапного обнаружения (ThermoFisher Scientific, номер по каталогу: 34028) и измеряли как поглощение при 450 нм. Химерные антитела против GPC3 тестировали в аналогичном анализе, за исключением того, что использовали пластину с никелевым покрытием (ThermoFisher, номер по каталогу: 15442). Результаты показаны на ФИГ. 1 и на ФИГ. 2А-2В.

[00261] Пример 4: FACS-анализ связывания очищенных mAb

[00262] Клетки HEK293, экспрессирующие полноразмерный человеческий GPC3, переносили в 96-луночный планшет. Около 50 000 клеток инкубировали с очищенными химерными mAb против GPC3 (вариабельные области мышиных mAb, слитые с константными областями тяжелой цепи и легкой каппа-цепи IgG1 человека, соответственно) при различных концентрациях в течение 15 минут при температуре 4°C. В некоторых случаях использовали по 100000 клеток на лунку. Затем клетки центрифугировали в течение 5 минут и один раз промывали буфером FACS (HBSS с добавлением 5% BSA и 0,05% азида натрия). Затем клетки инкубировали с конъюгированным с Alexa Fluor 488 вторичным антителом против человеческого IgG (ThermoFisher, номер по каталогу: H10120) и инкубировали на льду еще 15 минут. Затем клетки однократно промывали буфером FACS и ресуспендировали в буфере FACS. Затем клетки пропускали через Attune NxT, и данные анализировали с помощью программного обеспечения Attune NxT. Результаты показаны на ФИГ. 2С-2Е. Клетки HEK293 без экспрессии GPC3 использовали в качестве отрицательного контроля (ФИГ. 2F-2G).

[00263] Пример 5: Гуманизирование анти-GPC3 mAb

[00264] Мышиные анти-GPC3 mAb гуманизировали для снижения потенциальной иммуногенности при использовании у пациентов-людей. Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей (VH и VL) сравнивали с последовательностями человеческих антител в базе данных Protein Data Bank (PDB) и строили модели гомологии. CDR как в тяжелой, так и в легкой цепях mAb мыши были пересажены в человеческие каркасы, которые имеют наивысшую вероятность сохранения надлежащей структуры, вероятно необходимой для связывания антигена. При необходимости конструировали обратные мутации человеческих остатков в мышиные остатки или другие мутации. Последовательности гуманизированных областей VH и VL показаны в таблице 7. Гуманизированные области VH и VL сливали с константными

областями тяжелой цепи и легкой каппа-цепи IgG1 человека соответственно. Связывание гуманизированных mAb с GPC3 оценивали с использованием анализа FACS (ФИГ. 3А-3О). М3-Н1L1 относится к гуманизированному mAb, сконструированному из тяжелой цепи М3-Н1 и легкой цепи М3-Л1, показанных в таблице 7; другие гуманизированные клоны следуют тому же правилу именования.

Таблица 7: Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей гуманизированных анти-GPC3 mAb

VH/VL	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	NO
M3-H1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQ GLEWIGAIDPETGDTAYNQKFQKGRATLTADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYFSFAYWGQGTLVTVSS	99
M3-H2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGH GLEWIGAIDPETGDTAYNQKFQKGRATLTADTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYFSFAYWGQGTLVTVSS	100
M3-H3	EVVLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYEMSWVRQAPGKG LEWIGAIDPETGDTYYADSVKGRATLSADKSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCTRYFSFAYWGQGTLVTVSS	101
M3-H4	EVQLVESGAEVKKPGESLKISCKASGYTFTDYEIGWVRQMPGKGL EWIGIIDPETGDTRYSPSFQGGQATLSADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCTRYFSFAYWGQGTMTVTVSS	102
M3-L1	DVQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRSSQSLRHSNGNTYLQWYQQK PGKAPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY FCYQSKHVPYTFGQGTKVEIK	103
M3-L2	EVVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSQSLRHSNGNTYLQWYQQKP GQAPRLLIYKVSNRFSGVPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYF CYQSKHVPYTFGGGQGTKVEIK	104
M3-L3	EVVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSQSLRHSNGNTYLQWYQQKP GQAPRLLIYKVSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYF CYQSKHVPYTFGQGTKVEIK	105
26A1-H1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWIGEIDPFDSYTYYNQKFQKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARRDGVYKWYFDVWGQGTLVTVSS	120
26A1-H2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGK GLEWIGEIDPFDSYTYYNQKFQKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARRDGVYKWYFDVWGQGTLVTVSS	121

26A1-H3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMHWVRQAPGK GLEWIGEIDPFDSYTYYNQKFKGRATLSVDKSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARRDGVYKWYFDVWGQGTLVTVSS	122
26A1-H4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGK GLEWIGEIDPFDSYTYYNQKFKGRATLSVDKSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARRDGVYKWYFDVWGQGTLVTVSS	123
26A1-L1	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASQDINKSIAWYQHKPGKAPK LLIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSGRDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYD SLLYTFGQGTKVEIK	124
26A1-L2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINKSIAWYQHKPGKAPKL LIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDS LLYTFGQGTKVEIK	125
30D11-H1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYEMHWVREAPGQ GLEWIGAIDPENGGAIAFNQKFKDRATLTADKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCTREEIYNDYDGVVDYWGQGTLVTVSS	126
30D11-H2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVREAPGQ GLEWIGAIDPENGGAIAFNQKFKDRATLTADKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCTREEIYNDYDGVVDYWGQGTLVTVSS	127
30D11-H3	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYEMHWVREAPGKG LEWIGAIDPENGGAIAFNQKFKDRATLSADKSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCTREEIYNDYDGVVDYWGQGTMTVTVSS	128
30D11-H4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEFHWVREAPGQ GLEWIGIIDPENGGISYAQKFGDRAILTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTREEIYNDYDGVVDYWGQGTLVTVSS	129
30D11-H5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVREAPGQ GLEWIGIIDPENGGISYAQKFGDRAILTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTREEIYNDYDGVVDYWGQGTLVTVSS	130
30D11-H6	EQQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYEISWVREAPGQG LEWIGSIDPENGGINYAQKFQGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTREEIYNDYDGVVDYWGQGTLVTVSS	131
30D11-H7	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYEMSWVREAPGQ GLEWIGAIDPENGGAIFAQKFQGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCTREEIYNDYDGVVDYWGQGTLVTVSS	132
30D11-L1	DVVMVTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSDGKTYLNWLQQK	133

	PGQPPKRLMYQVSKLDPGVDPDRFSGSGSETDFTLTISSLQAEDVAV YYCLQVTYYPYTFGQGTRLEIK	
30D11-L2	DVQMTQSPSTLSASVGDRVITITCRSSQSLLYSDGKTYLNWLQQKP GKAPKRLMYQVSKLDPGVPSRFSGSGSETEFTLTISSLQPDDFATY YCLQVTYYPYTFGQGGTKVEIK	134
30D11-L3	EVVMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSQSLLYSDGKTYLNWLEQKP GKAPKRLMYQVSSLQSGVPSRFSGSGSETEFTLTISSLQPEDFATY YCLQVTYYPYTFGQGTRLEIK	135
30D11-L4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSQSLLYSDGKTYLNWLEQKPG KAPKRLMYQVSKLQSGVPSRFSGSGSETEFTLTISSLQPEDFATYY CLQVTYYPYTFGQGTRLEIK	136
30D11-L5	DVQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRSSQSLLYSDGKTYLNWLQQKP GKAPKRLMYQVSSLQSGVPSRFSGSGSETDFTLTISSLQPEDFATY YCLQVTYYPYTFGQGGTKVEIK	137
30D11-L6	DVQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRSSQSLLYSDGKTYLNWLQQKP GKAPKRLMYQVSKLQSGVPSRFSGSGSETDFTLTISSLQPEDFATY YCLQVTYYPYTFGQGGTKVEIK	138
36F8-H1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSNSWMHWVRQAPGQ GLEWIGWIYPGDGDTNYAQKFQGRATLTADKSISTAYMELSRLRS DDTAVYFCARSGPITMGFTYWGQGTLLTVSS	139
36F8-H2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSNSWMNWVRQAPG QGLEWIGWIYPGDGDTNYAQKFQGRATLTADKSISTAYMELSRL RSDDTAVYFCARSGPITMGFTYWGQGTLLTVSS	140
36F8-L1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGISNYLSWYQQKPGQAVR LLIYYTSNRATGIPARFSGSESGTDYTLTISLEPEDFAVYYCQQYS KFPWTFGQGTKLEIK	141
36F8-L2	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGISNYLSWYQQKPGQAVR LLIYYTSNLHTGIPARFSGSESGTDYTLTISLEPEDFAVYYCQQYS KFPWTFGQGTKLEIK	142
39E1-H1	QVQLEESGPGLVKPSSETLSLTCSASGYTFTSYWMHWVRQPPGKGL EWIGEIDPFDSYTYYNQKFKGRATLSVDKSKNEASRLTSVTAADT AVYYCARHYGYDRWYFDVWGQGTLLTVSS	143
39E1-H2	QVQLEESGPGLVKPSSETLSLTCTASGYTFTSYWMHWVRQPPGKG LEWIGEIDPFDSYTYYNQKFKGRATISVDKSKNEASRLTSVTAAD	144

	TAVYYCARHYGYDRWYFDVWGQGLTVTVSS	
39E1-H3	QVQLEESGPGLVKPKSETLSLTCTASGYTFTSYWMHWVRQPPGKG LEWIGEIDPFDSYTYYNPKFKGRATISVDKSKNEASRLTSVTAAD TAVYYCARHYGYDRWYFDVWGQGLTVTVSS	145
39E1-H4	QVVLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWISWVRQAPGQG LEWIGGIDPFDSYTNYAQKFQGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARHYGYDRWYFDVWGQGLTVTVSS	146
39E1-H5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWIGEIDPFDSYTYA QKFQGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARHYGYDRWYFDVWGQGLTVTVSS	147
39E1-H6	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWIGEIDPFDSYTYYNQKFQGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARHYGYDRWYFDVWGQGLTVTVSS	148
39E1-H7	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYTFTSYWMHWVRQMPGK GLEWIGEIDPFDSYTYA PSFQGQATLSVDKSISTAYLQWSSLKAS DTAMYYCARHYGYDRWYFDVWGQGLTVTVSS	149
39E1-L1	DIVMTQSPSSLSASIGDRVITITCKASQDINKYIVWYQHKPGKAPKL LIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSGREYTLTIRSLQPEDFATYYCQQYD NLLRTFGQGGTKVEIK	150
39E1-L2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDINKYLVWYQHKPGKAPK LLIHYTSSLQSGVPSRFSGSGSGRDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYD NLLRTFGQGGTKVEIK	151
39E1-L3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINKYIVWYQHKPGKAPK LLIHYTSTLQSGVPSRFSGSGSGRDYTLTISSLQPEDFATYYCQQY DNLLRTFGQGGTKVEIK	152
43B9-H1	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGYAFSDYWMYWVRQAPGK GLEWIGLIYPGDGDTMYAEKFRGRATLTADKSTDYAYLESSLRSE DTAVYFCARLSFGAWFAYWGQGLTVSVSS	153
43B9-H2	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGYAFSDYWMNWVRQAPGK GLEWIGRIYPGDGDTNYAEKFRGRVTITADTSTDYAYLESSLRSE DTAVYYCARLSFGAWFAYWGQGT TVTVSS	154
43B9-H3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYAFSDYWMNWVRQAPGK GLEWIGRIYPGDGDTNYSKFKGRATLSADKSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYFCARLSFGAWFAYWGQGLTVTVSS	155

43B9-H4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYAFSDYWMNWVRQAPGK GLEWIGRIYPGDGDTNYSKGFKGRATLSADKSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYFCARLSFGAWFAYWGQGTLLTVSS	156
43B9-L1	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASRDINKYLGWYQHKPGKAPK LLIHYTSTLQSGVPSRFSGSGSGRSDYSLTINSLQPEDFATYYCLQY DNLYTFGGGGTKVEIK	157
43B9-L2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASRDINKYLGWYQQKPGKAPK LLIHYTSTLQSGVPSRFSGSGSGRDFSLTINSLQPEDFATYYCLQYD NLYTFGGGGTKVEIK	158
43B9-L3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASRDINKYIGWYQHKPGKAPK LLIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSGRSDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYD NLYTFGQGTKVEIK	159
F7-H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGKG LEWVAQIRLKSDNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLR AEDTAVYYCTVGGNYWGQGTLLTVSS	160
F7-H2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSNYWMNWVRQAPGK GLEWVAQIRLKSDNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNS LRAEDTAVYYCTVGGNYWGQGTLLTVSS	161
F7-H3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGK GLEWVAQIRLKSDNYATYYAESLEGRFTISRDDSKNSVYLQMNSL KTEDTAVYYCTVGGNYWGQGTLLTVSS	162
F7-H4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGK GLEWVAQIRLKSDNYATHYAESLEGRFTISRDDSKNSVYLQMNSL KTEDTAVYYCTVGGNYWGQGTLLTVSS	163
F7-L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQEISGNLGWLQQKPGKAIKR LIYAATTLDSGVPSRFSGSRSGSDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDS YPWTFGQGTKVEIK	164
F7-L2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQEISGNLGWLQQKPGKAIKR LIYAATNLADGVPSRFSGSRSGSDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYD SYPWTFGQGTKLEIK	165
F7-L3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQEISGNLGWLQQKPGKAIKR LIYAATTLADGVPSRFSGSRSGSDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYD SYPWTFGQGTKLEIK	166
M3-H5	QVQLVQSGSGVKKPGASVRVSCWASGYTFTDYEMHWVRQAPGQ	183

	GLEWIGAIDPETGDTAYNQKFKGRASLTADKDLFTAHMDIRGLTQ GDTATYYCTRYFSFAYWGRGTLIVVSS	
M3-H6	QVQLVQSGAEMKKPGASVKVSCASGYTFTDY EINWVRQAPGQ GLEWIGWMDPETGDTGYPQKFQGRATLTANKSISTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYFSFAYWGQGTTVTVSS	184
M3-H7	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYEMHWVRQAPGQ GLEWIGAIDPETGDTAYNQKFKGRATLTADKSTTTAYMELKSLQFD DTAVYYCTRYFSFAYWGQGTTVTVSS	185
M3-H8	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYEMHWVKQAPGQ GLEWIGAIDPETGDTAYNQKFKGKATLTADKSTTTAYMELKSLQF DDTAVYYCTRYFSFAYWGQGTTVTVSS	186
M3-H9	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYEMHWVRQAPGQ GLEWIGAIDPETGATAYNQKFKGRATLTADKSTTTAYMELKSLQF DDTAVYYCTRYFSFAYWGQGTTVTVSS	187
M3-H10	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDYEMHWVRQAPGQ GLEWIGAIDPETGATAYNQKFKGRATLTADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYFSFAYWGQGTLVTVSS	188
M3-H11	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDYEMHWVRQAPGH GLEWIGAIDPETGDTAYNQKFKGRATLTADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYFSFAYWGQGTLVTVSS	189
M3-H12	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDYEMHWVRQAPGH GLEWIGAIDPETGDTAYNQKFKGKATLTADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYFSFAYWGQGTLVTVSS	190
M3-H13	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDYEMHWVRQAPGH GLEWIGAIDPETGATAYNQKFKGKATLTADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYFSFAYWGQGTLVTVSS	191
M3-H14	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDYEMHWVRQAPGH GLEWIGAIDPETGDTAYNQKFKGKATLTADTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYFSFAYWGQGTLVTVSS	192
M3-H15	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDYEMHWVRQAPGH GLEWIGAIDPETGATAYNQKFKGKATLTADTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYFSFAYWGQGTLVTVSS	193
M3-H16	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDYEMHWVRQAPGH GLEWIGAIDPETGDTAYNQKFKGKATLTADKSTTTAYMELSSLQF	194

	DDTAVYYCTRYFSFAYWGQGLTVTVSS	
M3-H18	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYEMHWVKQAPGH GLEWIGAIDPETGDTAYNQKFKGKATLTADTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYFSFAYWGQGLTVTVSS	195
M3-H19	QVTLRSGPALVKPTQTLTLTCTASGYTFTDYEMHWVRQPPGKA LEWIGAIDPETGDTAYNQKFKGRATLSADKSKNQAVLTMTNMDP VDTATYYCTRYFSFAYWGQGLTVTVSS	196
M3-H20	QVTLRSGPALVKPTQTLTLTCKASGYTFTDYEMHWVKQPPGKA LEWIGAIDPETGDTAYNQKFKGKATLSADKSKNQAVLTMTNMDP VDTATYYCTRYFSFAYWGQGLTVTVSS	197
M3-L4	EVVMTQSPGTLSSLSPGETASLSCRSSQSLRHSNGNTYLQWYQQKP GQPPKLLIYKVSNRFSGIPDRFSGSGFGTQFTLTITRMEPEDFARYF CYQSKHVPYTFGQGTREIR	198
M3-L5	EVVMTQSPATLSSLSPGERATISCRSSQSLRHSNGNTYLQWYQQKP GQAPRLLIYKVSNRFSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYF CYQSKHVPYTFGGGKVEIK	199
M3-L6	EIVLTQSPATLSSLSPGERATISCRSSQSLRHSNGNTYLQWYQQKPG QAPRLLIYKVSNRFSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYFC YQSKHVPYTFGGGKVEIK	200
M3-L7	DVVMTQSPDSLVSLSGERATINCRSSQSLRHSNGNTYLQWYQQKP GQPPKLLIYKVSNRFSGVPRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY FCYQSKHVPYTFGGGKVEIK	201
F7-H5	QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGK GLEWVAQIRLKSDNYATHYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLMNS LRAEDTAVYYCTVGGNYWGQGLTVTVSS	202
F7-H6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQATGK GLEWVAQIRLKSDNYATHYPDSVKGRFTISRDAKNSVYLMNS LRAGDTAVYYCTVGGNYWGQGTTVTVSS	203
F7-H9	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGK GLEWVAQIRLKSDNYATHYAESVKGRFTISRDDAKNSVYLDMS LRAEDTAVYYCTVGGNYWGQGLTVTVSS	204
F7-H10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGK GLEWVAQIRLKSDNYATHYADSVKGRFTISRDDSKNTVYLMNS LRAEDTAVYYCTVGGNYWGQGLTVTVSS	205

NO: SEQ ID NO.

[00265] Пример 6: Конструирование молекул анти-GPC3 mAb scFv

[00266] Гуманизированные последовательности анти-GPC3 mAb использовали для конструирования молекул scFv, которые сливали с Fc-областью IgG1 человека. Последовательности сконструированных молекул scFv перечислены в таблице 8. Слитые молекулы экспрессировали в клетках CHO, очищали и тестировали на связывание с GPC3 с использованием анализа FACS (ФИГ. 4А-4Е).

Таблица 8: Последовательности вариабельного одноцепочечного фрагмента (ScFv) гуманизированных анти-GPC3 mAb

VH/VL	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	NO
M3-H1L1/VH-(G4S)4-VL	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQ GLEWIGAIDPETGDTAYNQKFQKGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCTRYFSFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSDVQMTQSPSSVSASVGDRVITICRSSLRHSNGNTYLQWY QQKPGKAPKLLIYKVSNNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYFCYQSKHVPYTFGQGTKVEIK	167
M3-H1L1/VH-(G4S)3-VL	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQ GLEWIGAIDPETGDTAYNQKFQKGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSE EDTAVYYCTRYFSFAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGD VQMTQSPSSVSASVGDRVITICRSSLRHSNGNTYLQWYQQK GKAPKLLIYKVSNNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYF CYQSKHVPYTFGQGTKVEIK	168
M3-H1L1/VL-(G4S)4-VH	DVQMTQSPSSVSASVGDRVITICRSSLRHSNGNTYLQWYQQK PGKAPKLLIYKVSNNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY FCYQSKHVPYTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGL EWIGAIDPETGDTAYNQKFQKGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTRYFSFAYWGQGTLLTVSS	169
M3-H1L1/VL-(G4S)3-VH	DVQMTQSPSSVSASVGDRVITICRSSLRHSNGNTYLQWYQQK PGKAPKLLIYKVSNNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY FCYQSKHVPYTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSG AEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWIGAI DPETGDTAYNQKFQKGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CTRYFSFAYWGQGTLLTVSS	170
26A1-H3L2/VH-	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYWMHWVRQAPGK GLEWIGEIDPFDSTYYNQKFQKGRATLSVDKSKNTAYLQMNSLR	171

(G4S)4-VL	AEDTAVYYCARRDGVYKWFYFDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINKSIA WYQHKPGKAPKLLIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQP EDFATYYCLQYDSLLYTFGQGGTKVEIK	
26A1- H3L2/VH- (G4S)3-VL	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMHWVRQAPGK GLEWIGEIDPFDSYTYYNQKFGRATLSVDKSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARRDGVYKWFYFDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINKSIAWYQHK PGKAPKLLIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSGRDFTLTISSLQPEDFATY YCLQYDSLLYTFGQGGTKVEIK	172
43B9- H1L2/VH- (G4S)4-VL	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGYAFSDYWMYWVRQAPGK GLEWIGLIYPGDGDTMYAEKFRGRATLTADKSTDYAYLELSSLRSE DTAVYFCARLSFGAWFAYWGQGTLSVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASRDINKYLGWYQQKP GKAPKLLIHYTSTLQSGVPSRFSGSGSGRDFSLTINSLQPEDFATYY CLQYDNLYTFGGGGTKVEIK	173
43B9- H1L2/VH- (G4S)3-VL	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGYAFSDYWMYWVRQAPG KGLEWIGLIYPGDGDTMYAEKFRGRATLTADKSTDYAYLELSSL RSEDYAVYFCARLSFGAWFAYWGQGTLSVSSGGGGSGGGGSGG GGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASRDINKYLGWYQQKPG KAPKLLIHYTSTLQSGVPSRFSGSGSGRDFSLTINSLQPEDFATYY CLQYDNLYTFGGGGTKVEIK	174
36F8- H2L1/VH- (G4S)4-VL	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSNSWMNWVRQAPG QGLEWIGWIYPGDGDTNYAQKFQGRATLTADKSISTAYMELSRLR SDDTAVYFCARSGPITMGFTYWGQGTSLTVSSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGISNYLSWYQ QKPGQAVRLLIYYTSNRATGIPARFSGSESGTDYTLTISSLEPEDFA VYYCQQYSKFPWTFGQGGTKLEIK	175
36F8- H2L1/VH- (G4S)3-VL	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSNSWMNWVRQAPG QGLEWIGWIYPGDGDTNYAQKFQGRATLTADKSISTAYMELSRL RSDDTAVYFCARSGPITMGFTYWGQGTSLTVSSGGGGSGGGGSGG GGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGISNYLSWYQQKPG QAVRLLIYYTSNRATGIPARFSGSESGTDYTLTISSLEPEDFAVYY CQQYSKFPWTFGQGGTKLEIK	176
39E1-	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPG	177

H6L3/VH- (G4S)4-VL	QGLEWIGEIDPFDSYTYYNQKFQGRATLTVDKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARHYGYDRWYFDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINKYIVW YQHKPGKAPKLLIHYTSTLQSGVPSRFSGSGSGRDTLTISLQPE DFATYYCQQYDNLLRTFGQGTKVEIK	
39E1- H6L3/VH- (G4S)3-VL	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPG QGLEWIGEIDPFDSYTYYNQKFQGRATLTVDKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARHYGYDRWYFDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINKYIVWYQHK PGKAPKLLIHYTSTLQSGVPSRFSGSGSGRDTLTISLQPEDFAT YYCQQYDNLLRTFGQGTKVEIK	178
F7- H1L1/VH- (G4S)4-VL	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGK GLEWVAQIRLKSDNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNS LRAEDTAVYYCTVGGNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQEISGNLGWLQQKP GKAIRLIYAATTLDSGVPSRFSGSRSGSDYTLTISLQPEDFATYY CLQYDSYPWTFGQGTKVEIK	179
F7- H1L1/VH- (G4S)3-VL	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGK GLEWVAQIRLKSDNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNS LRAEDTAVYYCTVGGNYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQEISGNLGWLQQKPGKAIR RLIYAATTLDSGVPSRFSGSRSGSDYTLTISLQPEDFATYYCLQY DSYPWTFGQGTKVEIK	180
26A1- H1L1/VH- (G4S)4-VL	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWIGEIDPFDSYTYYNQKFQGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARRDGVYKWFYFDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASQDINKSIAWY QHKPGKAPKLLIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSGRDTLTISLQPEDF ATYYCLQYDSLTYTFGQGTKVEIK	181
26A1- H1L1/VH- (G4S)3-VL	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQ GLEWIGEIDPFDSYTYYNQKFQGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARRDGVYKWFYFDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCKASQDINKSIAWYQHKPG KAPKLLIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSGRDTLTISLQPEDFATYYC LQYDSLTYTFGQGTKVEIK	182

NO: SEQ ID NO.

[00267] Специалистам в данной области техники будет понятно, что в описанные выше варианты осуществления могут быть внесены изменения без отклонения от их широкой изобретательской концепции. Таким образом, следует понимать, что данное изобретение не ограничивается описанными конкретными вариантами осуществления, но предназначено для охвата модификаций в пределах сущности и объема настоящего изобретения, как определено настоящим описанием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90, 91 и 92, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112 и 113, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 и 22, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35 и 36, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49 и 50, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62, 63 и 64, соответственно; или
- (7) SEQ ID NO: 73, 74, 75, 76, 77 и 78, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека.

2. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 93, 94, 95, 96, 97 и 98, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 114, 115, 116, 117, 118 и 119, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 и 28, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41 и 42, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55 и 56, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69 и 70, соответственно; или
- (7) SEQ ID NO: 79, 80, 81, 82, 83 и 84, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека.

3. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает TTP-1, предпочтительно, TTP-1 человека.

4. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13 и 14, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает T1P-1, предпочтительно, T1P-1 человека.

5. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 85, 106, 15, 29, 43, 57, 71 или 1, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 86, 107, 16, 30, 44, 58, 72 или 2.

6. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, содержащий:

a. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:85, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:86;

b. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:106, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:107;

c. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:15, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:16;

d. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:29, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:30;

e. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:43, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:44;

f. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:57, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:58;

g. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:71, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:72; или

h. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:1, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:2.

7. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются химерными и/или человеческими или гуманизированными.

8. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.7, где гуманизированное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную

последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную какой-либо из SEQ ID NO: 99-102, 120-123, 126-132, 139-140, 143-149, 153-156, 160-163, 183-197 или 202-205, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную какой-либо из SEQ ID NO: 103-105, 124-125, 133-138, 141-142, 150-152, 157-159, 164-166 или 198-201.

9. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.8, где гуманизированное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(1) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:99, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(2) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:99, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(3) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:100, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(4) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:100, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(5) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:101, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(6) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:101, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(7) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:102, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:105;

(8) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:120, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:124;

(9) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:120, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:125;

(10) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:121, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:124;

10. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны индуцировать опосредованный эффектором лизис опухолевых клеток посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC) и/или опосредование рекрутирования конъюгированных лекарственных средств и/или образование биспецифического антитела с другим mAb или его антигенсвязывающим фрагментом с эффектом уничтожения рака.

11. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10.

12. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10.

13. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11.

14. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.12 или 13.

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

16. Фармацевтическая композиция, содержащий выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10 или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.11 и фармацевтически приемлемый носитель.

17. Способ нацеливания на ТАА на поверхность раковых клеток, и/или лечения рака, и/или лечения воспалительного заболевания у пациента включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п.16, где, необязательно, рак выбран из группы, включающей рак легкого, рак желудка, рак пищевода, рак желчных протоков, холангиокарциному, рак толстой кишки, гепатоцеллюлярную карциному, почечно-клеточную карциному, уротелиальную карциному мочевого пузыря, метастатическую меланому, рак молочной железы, рак яичников, рак шейки матки, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, глиому, глиобластому и другие солидные опухоли, а также неходжкинскую лимфому (NHL), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелогенный лейкоз (CML), множественную миелому (MM), острый миелоидный лейкоз (AML) и другие жидкие опухоли.

18. Способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-10 или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.11, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в условиях, обеспечивающих получение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение моноклонального антитела или его

антигенсвязывающего фрагмента или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

19. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10 или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п.11, включающий объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

20. Способ определения уровня ТАА у пациента, включающий:

- a. получение образца от пациента;
- b. приведение образца в контакт с выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-10; и
- c. определение уровня ТАА у пациента.

21. Способ по п.20, где образец представляет собой образец ткани или образец крови, необязательно, при этом образец ткани представляет собой образец раковой ткани.

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

- (a) внеклеточный домен, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, который специфически связывает GPC3;
- (b) шарнирную область;
- (c) трансмембранную область; и
- (d) внутриклеточный сигнальный домен.

23. Выделенный полинуклеотид по п.22, где антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 87, 88, 89, 90, 91 и 92, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112 и 113, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 и 22, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 31, 32, 33, 34, 35 и 36, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49 и 50, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 59, 60, 61, 62, 63 и 64, соответственно; или
- (7) SEQ ID NO: 73, 74, 75, 76, 77 и 78, соответственно;

где антигенсвязывающий домен специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека.

24. Выделенный полинуклеотид по п.22, где антигенсвязывающий домен содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- (1) SEQ ID NO: 93, 94, 95, 96, 97 и 98, соответственно;

(2) SEQ ID NO: 114, 115, 116, 117, 118 и 119, соответственно;

(3) SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 и 28, соответственно;

(4) SEQ ID NO: 37, 38, 39, 40, 41 и 42, соответственно;

(5) SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55 и 56, соответственно; или

(6) SEQ ID NO: 65, 66, 67, 68, 69 и 70, соответственно;

(7) SEQ ID NO: 79, 80, 81, 82, 83 и 84, соответственно;

где антигенсвязывающий домен специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека.

25. Выделенный полинуклеотид по любому из пп.22-24, где антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 85, 106, 15, 29, 43, 57 или 71, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 86, 107, 16, 30, 44, 58 или 72.

26. Выделенный полинуклеотид по п.25, где антигенсвязывающий домен содержит:

а. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:85, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:86;

б. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:106, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:107;

с. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:16;

д. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:29, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:30;

е. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:43, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:44;

ф. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:57, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:58; или

г. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:71, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:72.

27. Выделенный полинуклеотид по любому из пп.22-24, где антигенсвязывающий домен гуманизирован и содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 99-102, 120-123, 126-132, 139-140, 143-149, 153-156, 160-163, 183-197 или 202-205, или

вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 103-105, 124-125, 133-138, 141-142, 150-152, 157-159, 164-166 или 198-201.

28. Выделенный полинуклеотид по п.27, где антигенсвязывающий домен гуманизирован и содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:99, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(2) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:99, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(3) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:100, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(4) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:100, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(5) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:101, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:103;

(6) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:101, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:104;

(7) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:102, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:105;

(8) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:120, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:124;

(9) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:120, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:125;

(10) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:121, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:124;

(11) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:121, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO:125;

(64) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 193, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200;

(65) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 186, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200;

(66) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 195, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 104;

(67) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 195, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 199;

(68) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 195, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200;

(69) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 194, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200;

(70) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 185, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200;

(71) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 187, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 104;

(72) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 187, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 200;

(73) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 187, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 199;

(74) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 196, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 201; или

(75) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 197, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 201.

29. Выделенный полинуклеотид по любому из пп.22-28, где антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), который специфически связывает GPC3, предпочтительно, GPC3 человека.

30. Выделенный полинуклеотид по п.29, где одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) является гуманизированным.

31. Выделенный полинуклеотид по п.29 или 30, где одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) содержит полипептидную последовательность по меньшей мере на 95% идентичную какой-либо из SEQ ID NO: 167-182.

32. Выделенный полинуклеотид по любому из пп.22-31, где химерный антигенный рецептор (CAR) содержит один или несколько антигенсвязывающих доменов.

33. Выделенный полинуклеотид по любому из пп.22-32, где внутриклеточный сигнальный домен содержит один или несколько костимулирующих доменов и один или несколько активирующих доменов.

34. Химерный антигенный рецептор (CAR), кодируемый выделенным полинуклеотидом по любому из пп.22-33.

35. Вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по любому из пп.22-33.

36. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.35.

37. Клетка-хозяин по п.36, где клетка-хозяин представляет собой Т-клетку, предпочтительно, человеческую Т-клетку.

38. Клетка-хозяин по п.36, где клетка-хозяин представляет собой НК-клетку, предпочтительно НК-клетку человека.

39. Способ получения клетки-хозяина, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), где способ включает трансдукцию Т-клетки вектором по п.35.

40. Способ получения Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR), включающий культивирование Т-клеток, содержащих выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по любому из пп.22-33 в условиях для получения CAR-Т-клетки и выделения CAR-Т-клетки.

41. Способ получения клетки-хозяина, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR), где способ включает трансдукцию НК-клетки вектором по п.35.

42. Способ получения химерного антигенного рецептора (CAR)-НК-клетки, где способ культивирование НК-клеток, содержащих выделенный полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по любому из пп.22-33 в условиях для получения клетки CAR-НК и выделения клетки CAR-НК.

43. Способ получения клетки, содержащей химерный антигенный рецептор (CAR), где способ включает приведение клетки в контакт с выделенным полинуклеотидом, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR) по любому из пп.22-33, где выделенный полинуклеотид представляет собой транскрибируемую *in vitro* РНК или синтетическую РНК.

44. Способ лечения рака у пациента, включающий введение пациенту клетки-хозяина по любому из пп.36-38, где, необязательно, рак выбран из рака легкого, рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной

карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичников, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфолейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

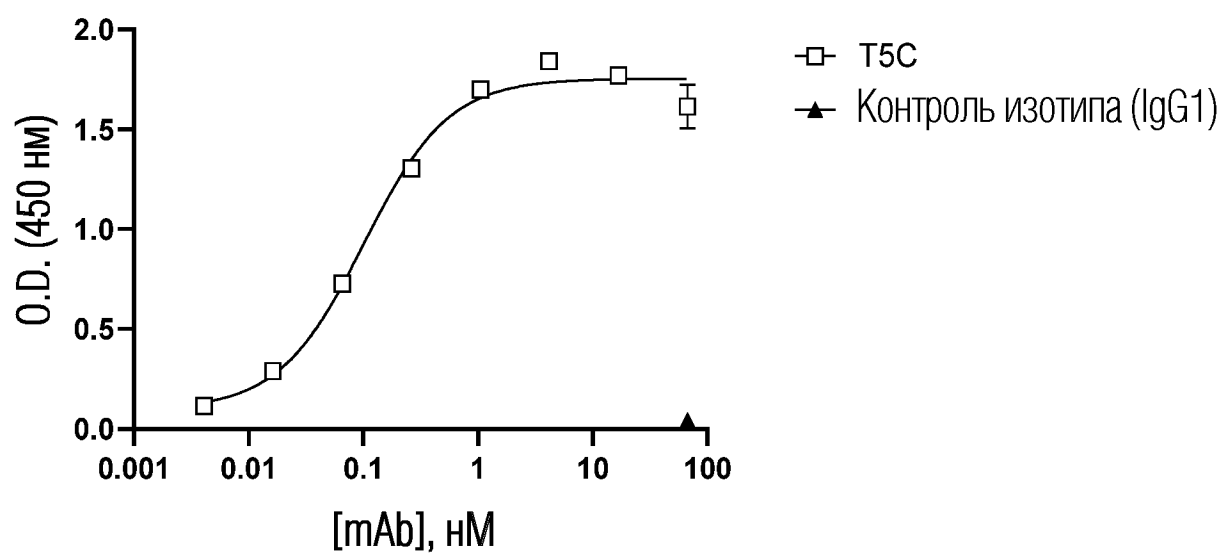
45. Способ по п.44, дополнительно включающий введение пациенту агента, повышающего эффективность клеток, экспрессирующих CAR.

46. Способ по п.44, дополнительно включающий введение пациенту агента, который ослабляет один или несколько побочных эффектов, связанных с введением клетки, экспрессирующей CAR.

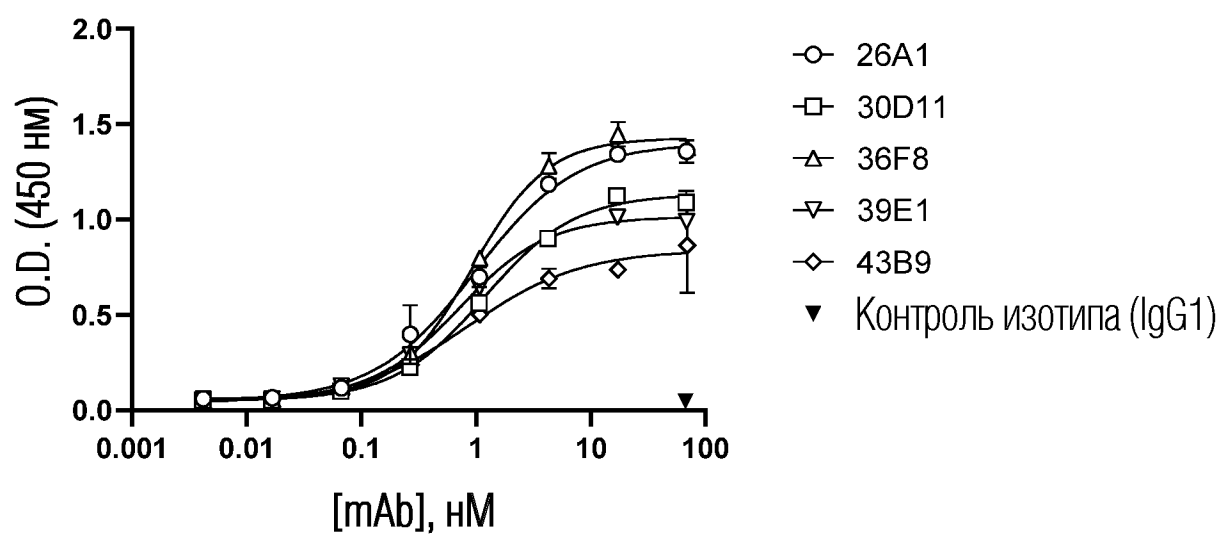
47. Способ по п.44, дополнительно включающий введение пациенту средства для лечения заболевания, связанного с GPC3.

По доверенности

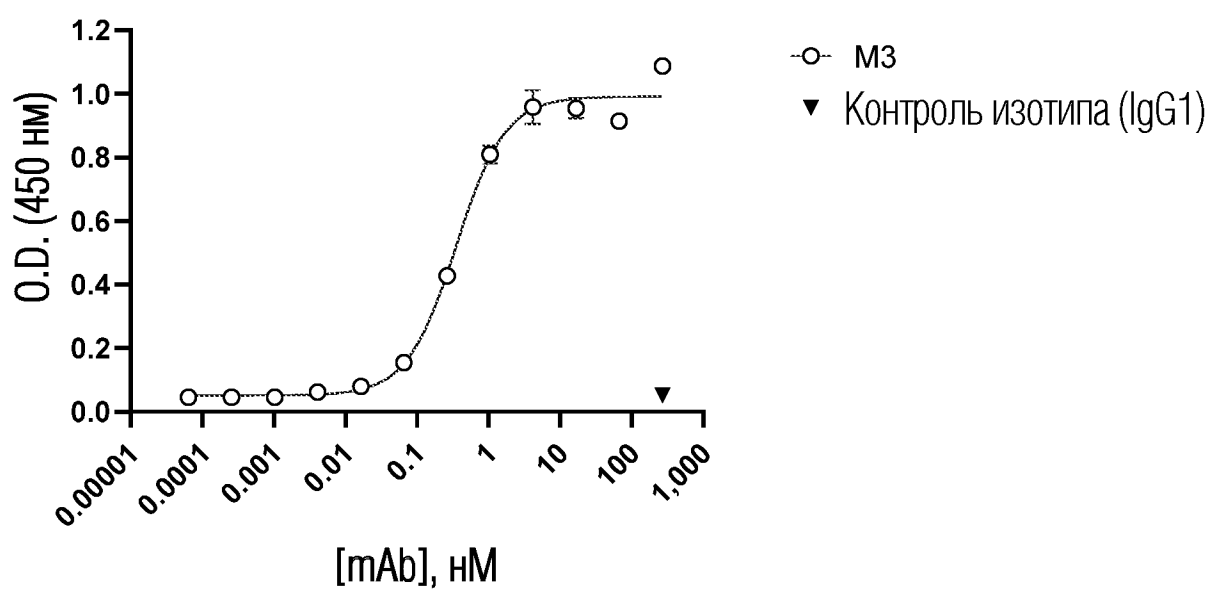
1/15



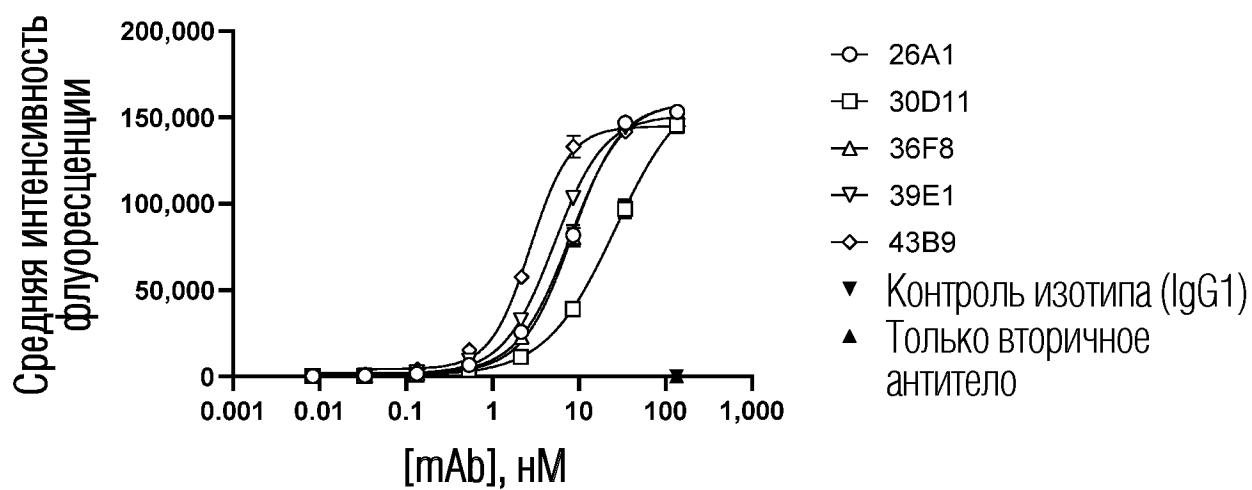
ФИГ. 1



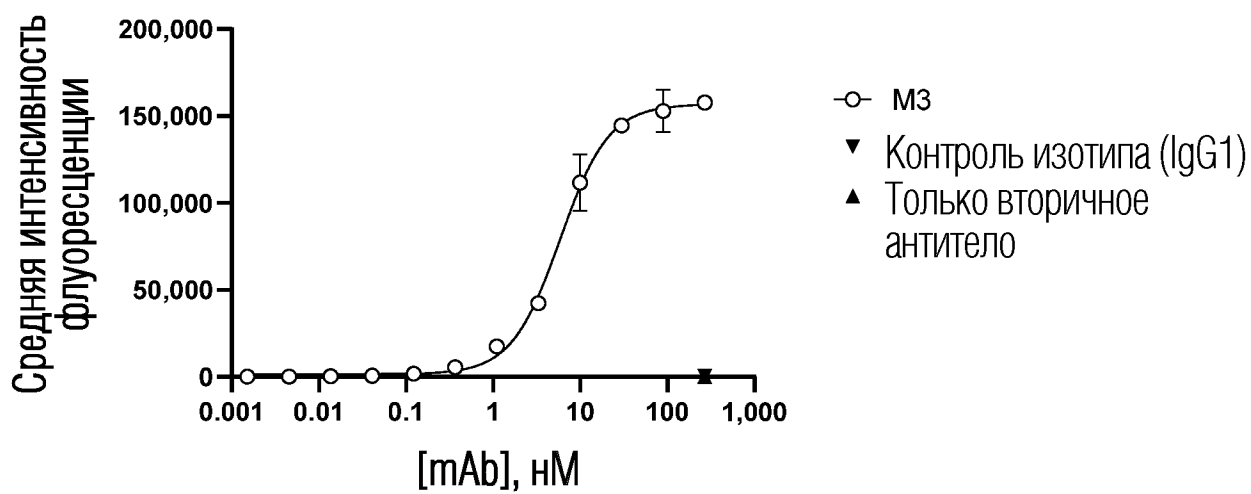
ФИГ. 2А



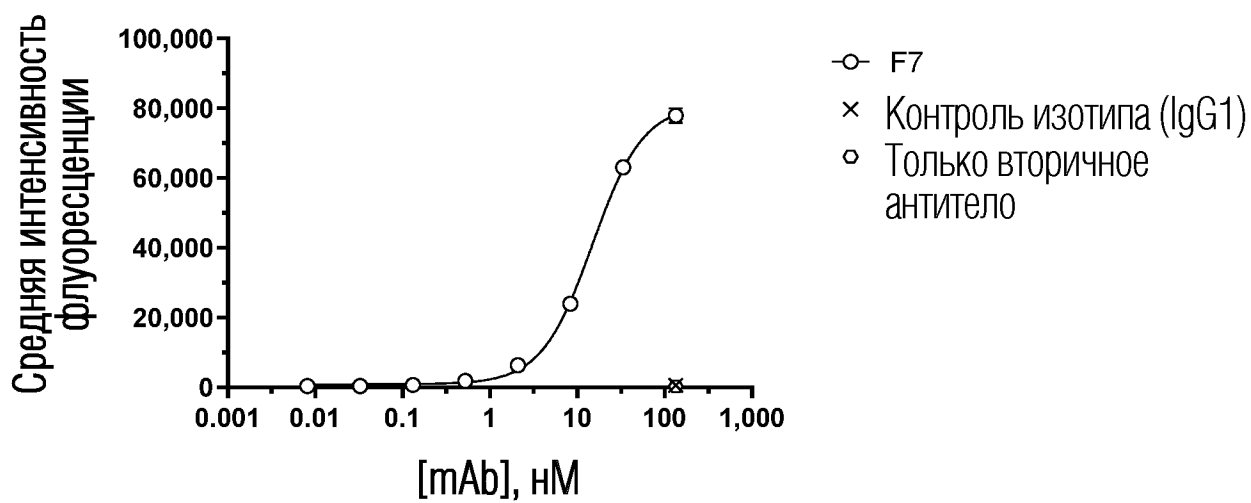
ФИГ. 2В



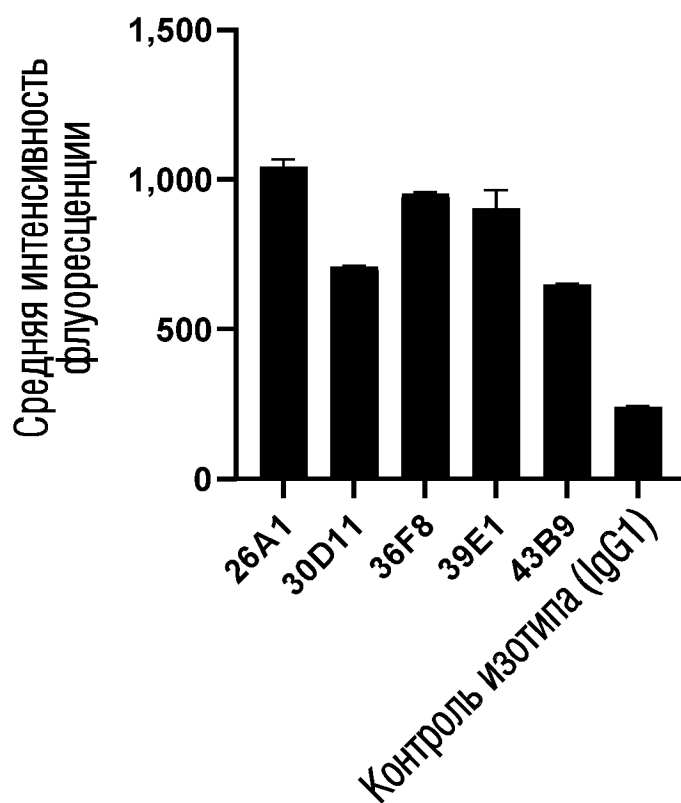
ФИГ. 2С



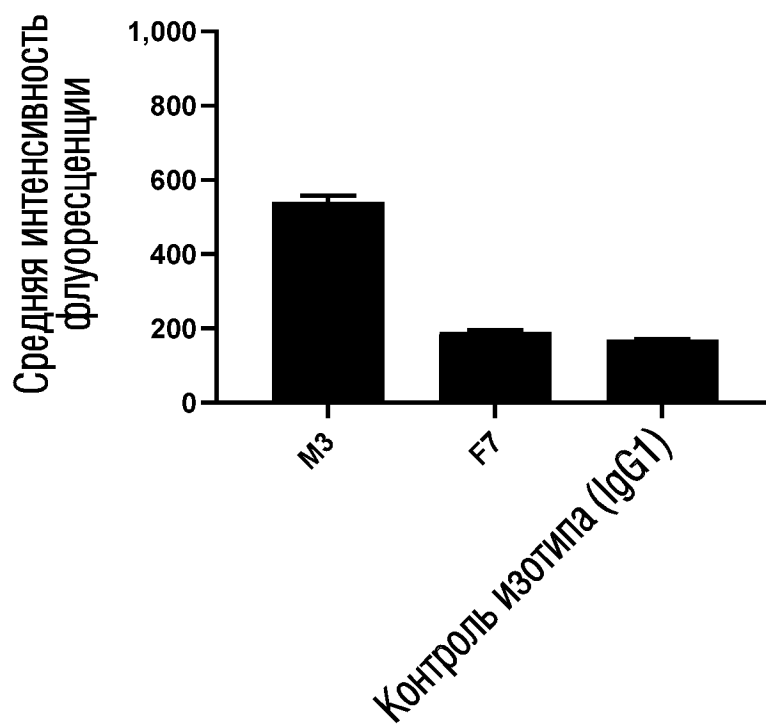
ФИГ. 2D



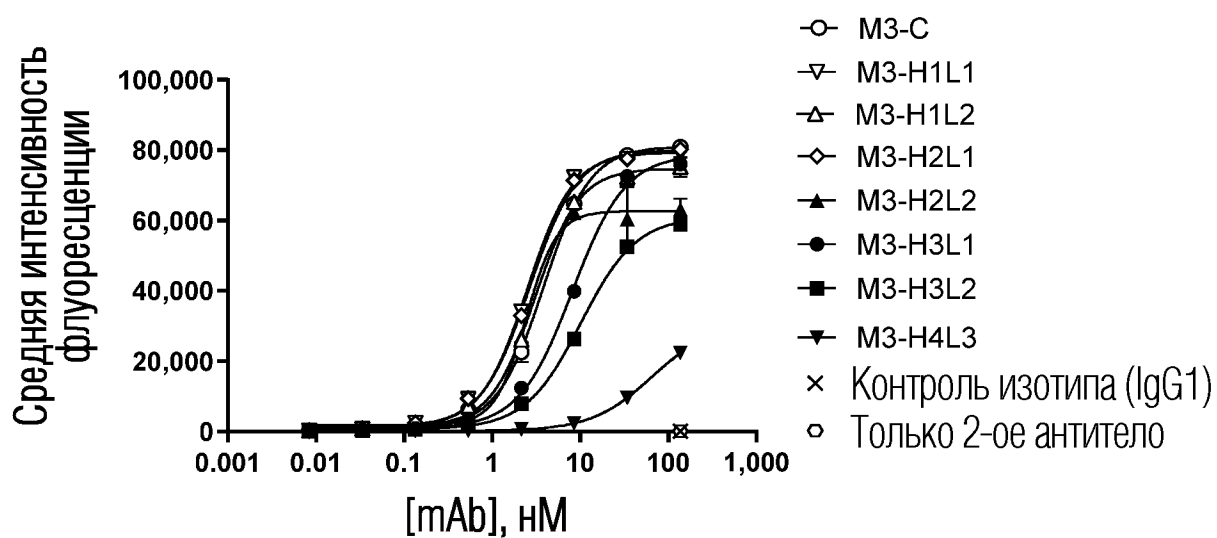
ФИГ. 2E



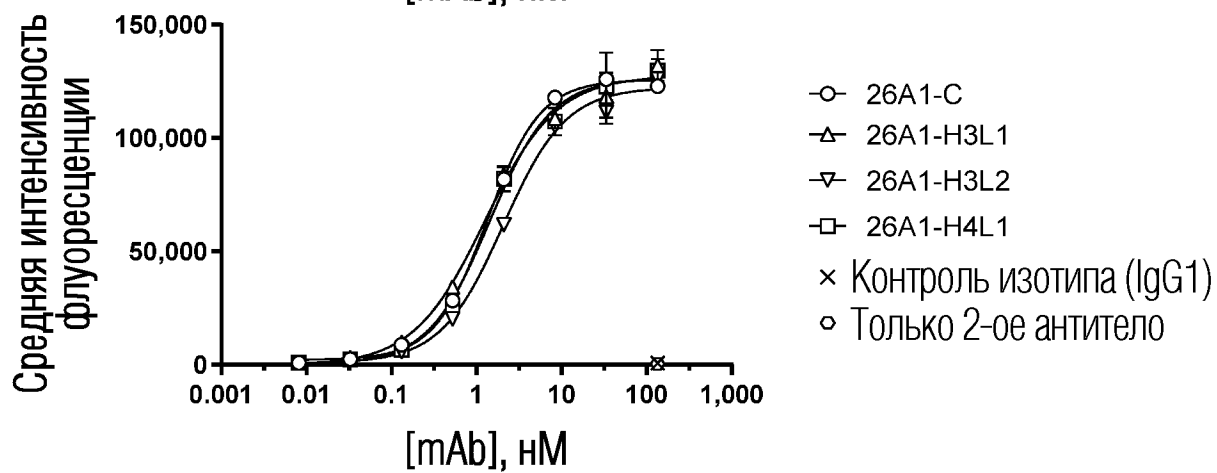
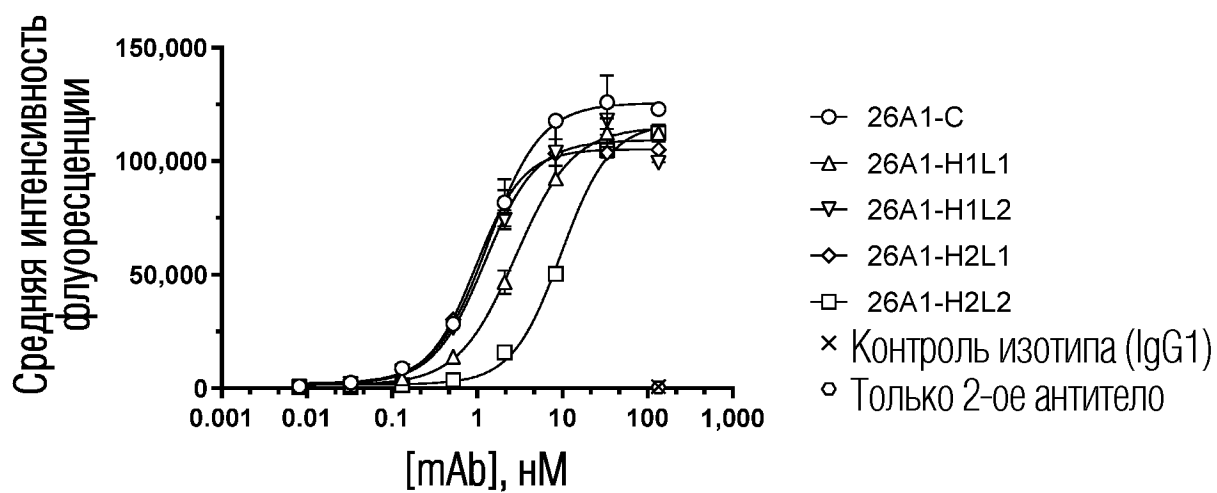
ФИГ. 2F



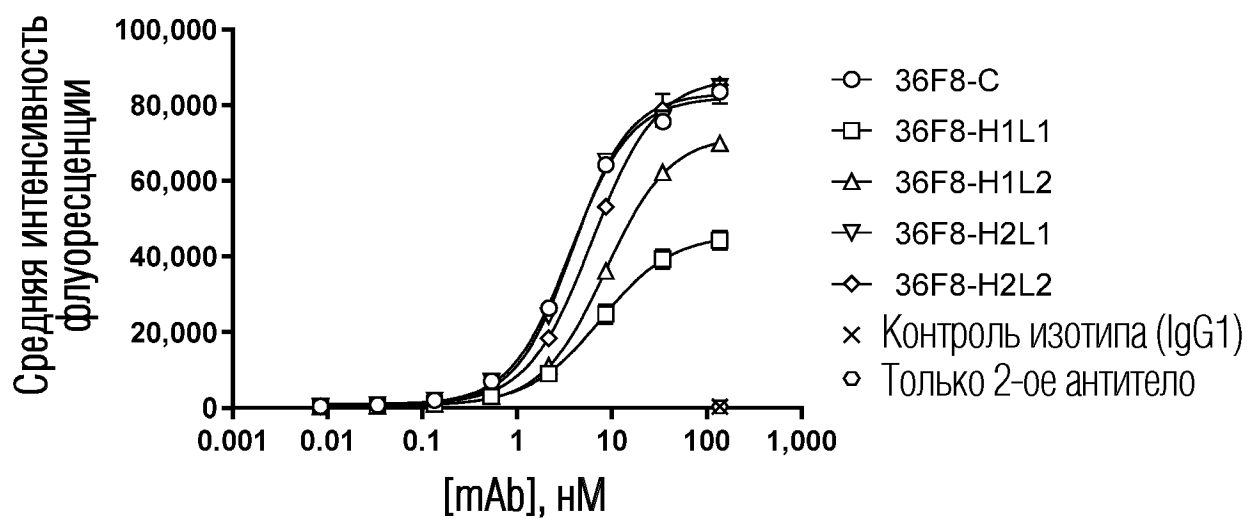
ФИГ. 2G



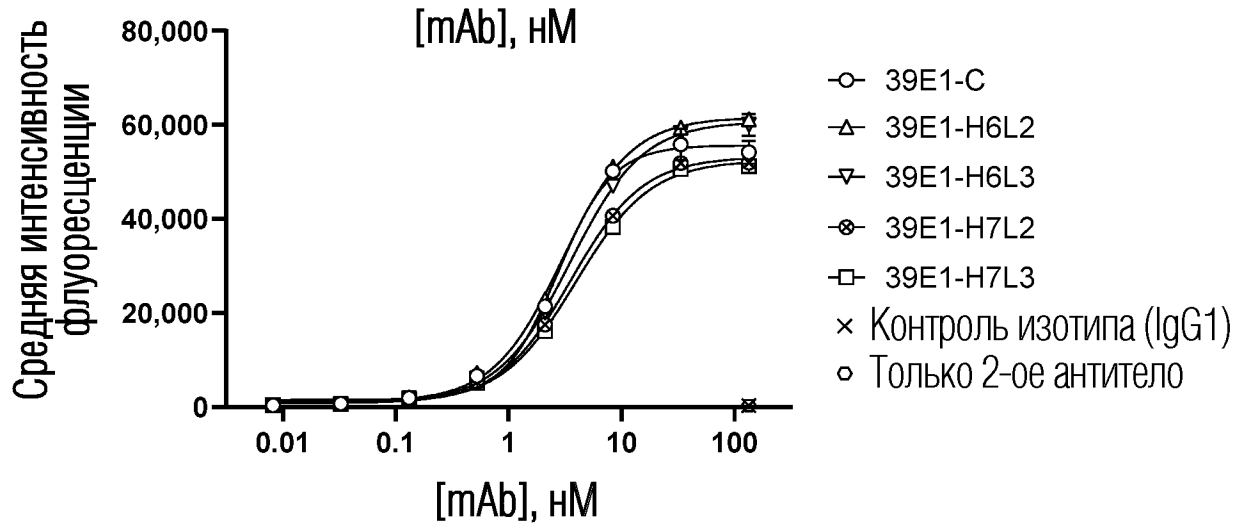
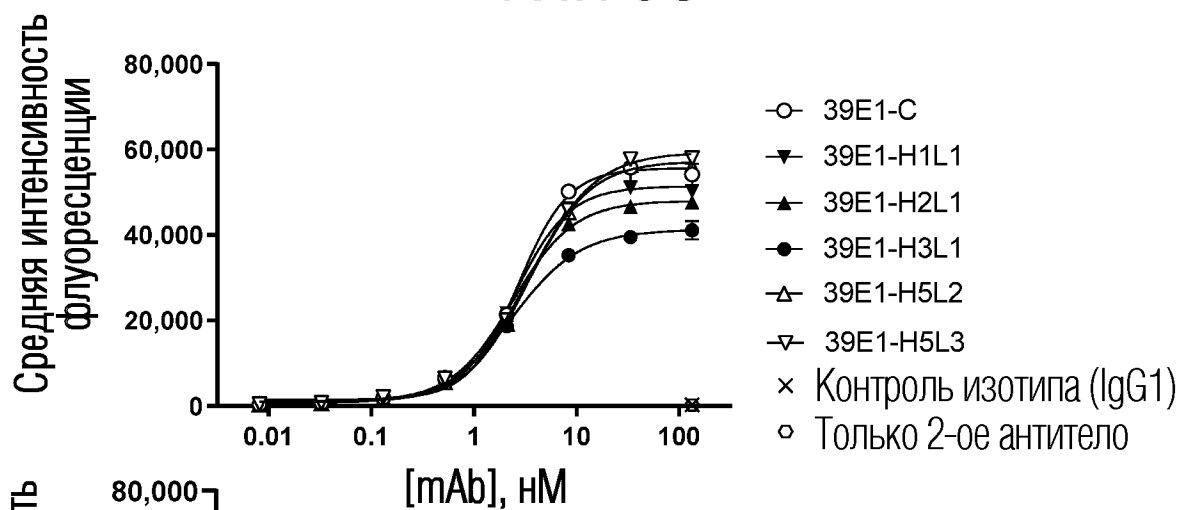
ФИГ. 3А



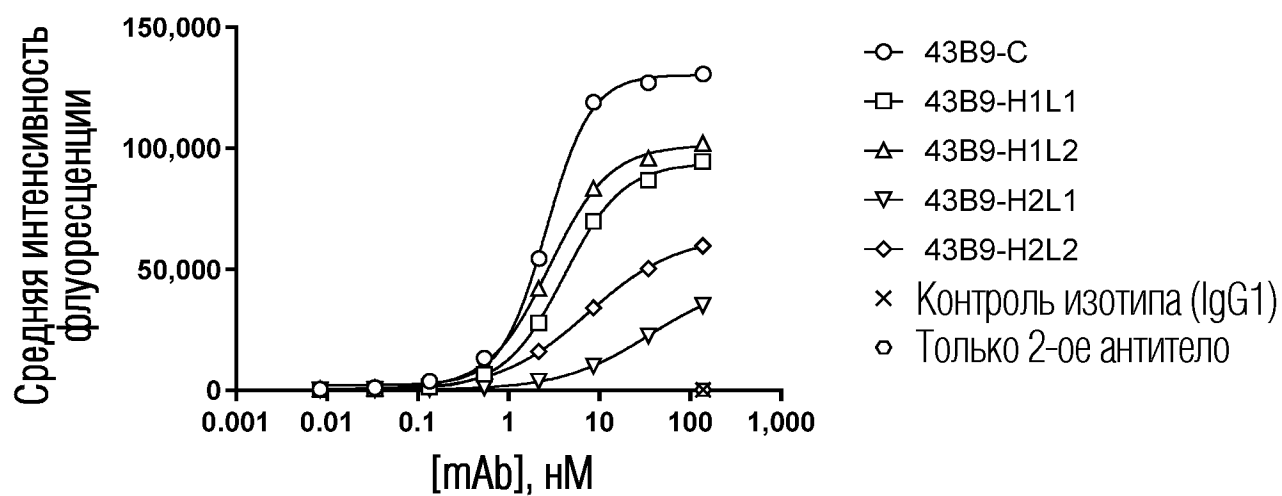
ФИГ. 3В



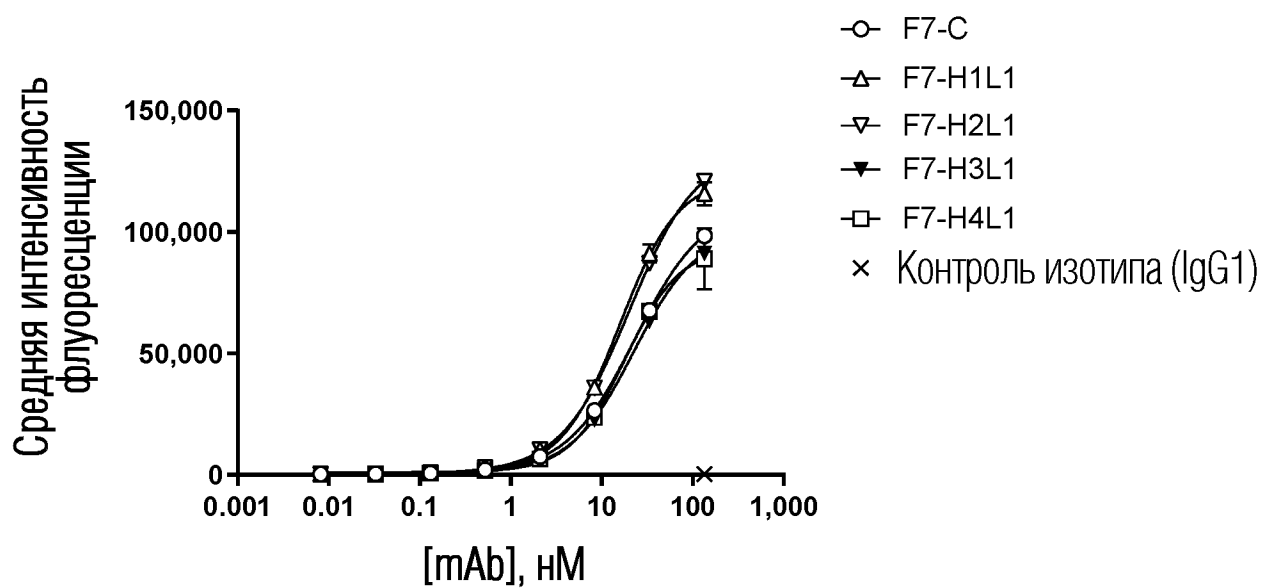
ФИГ. 3С



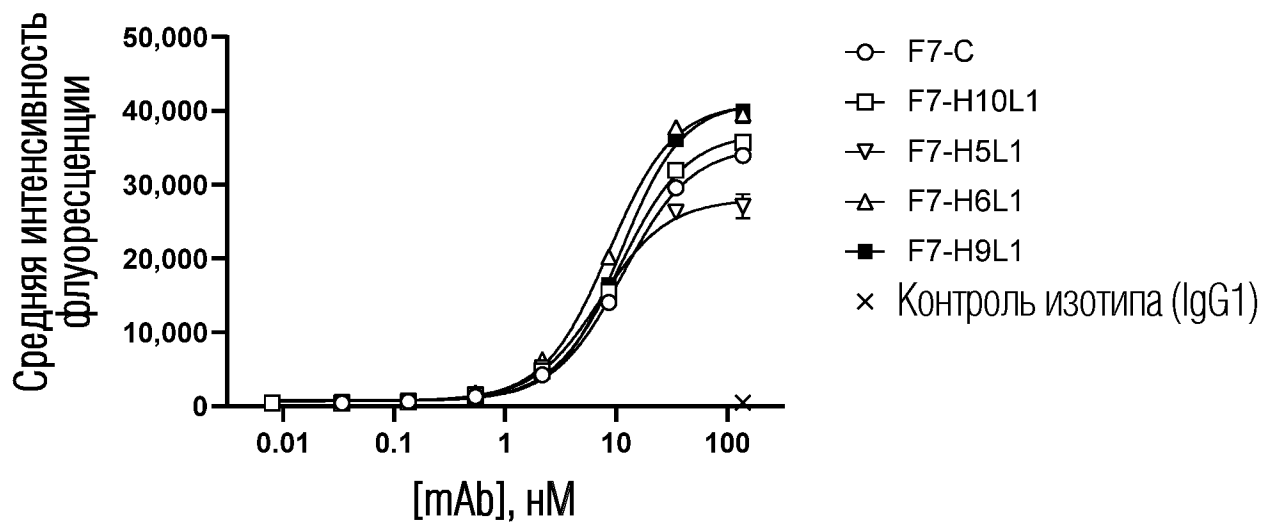
ФИГ. 3D



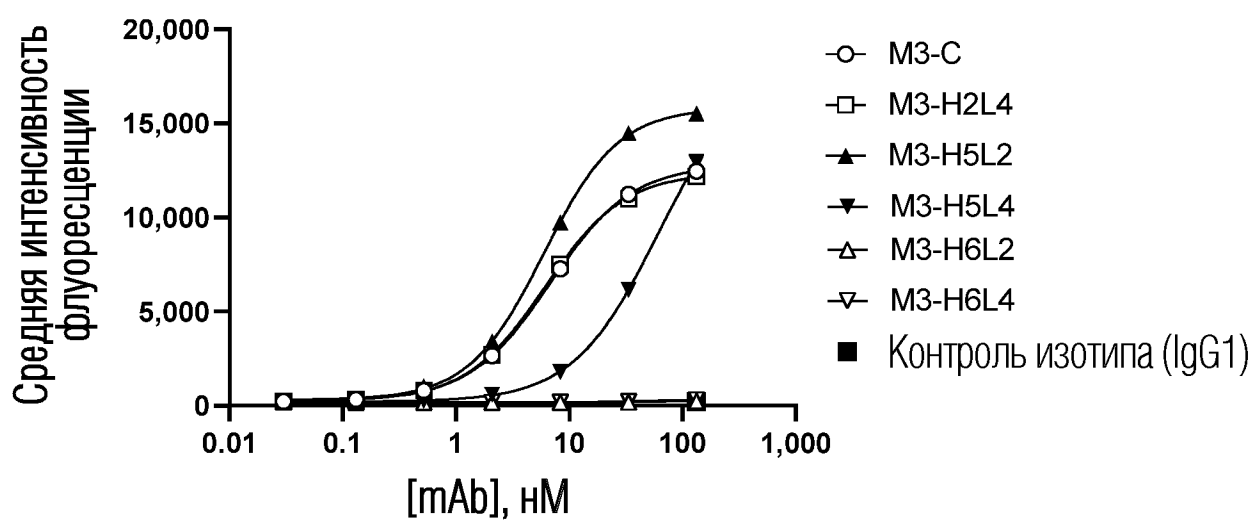
ФИГ. 3Е



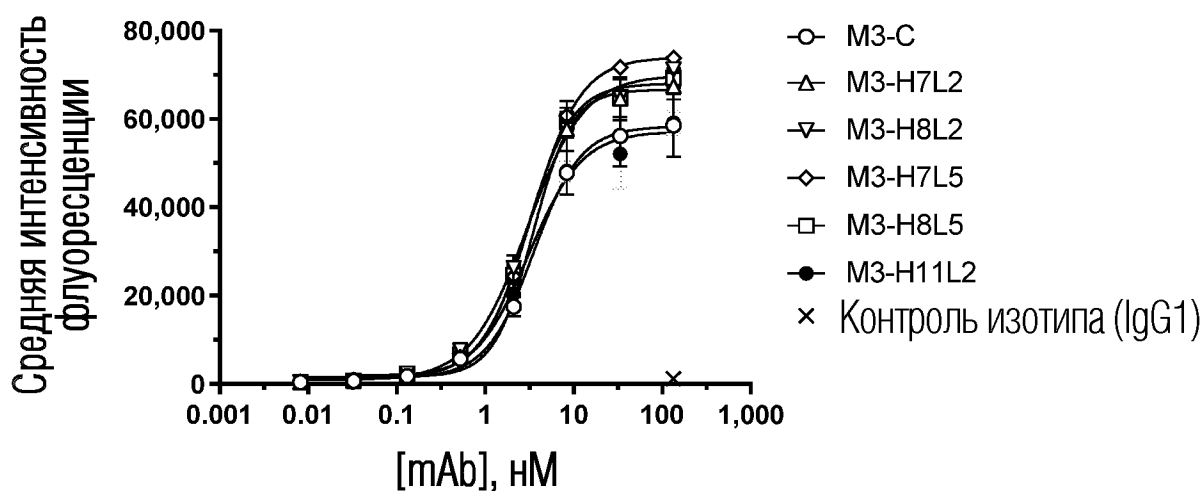
ФИГ. 3F



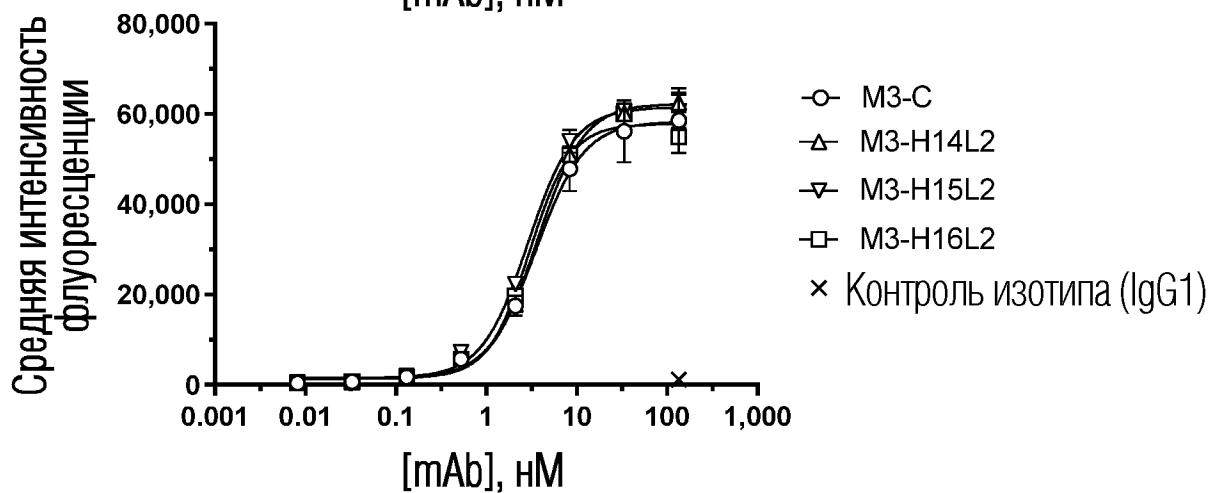
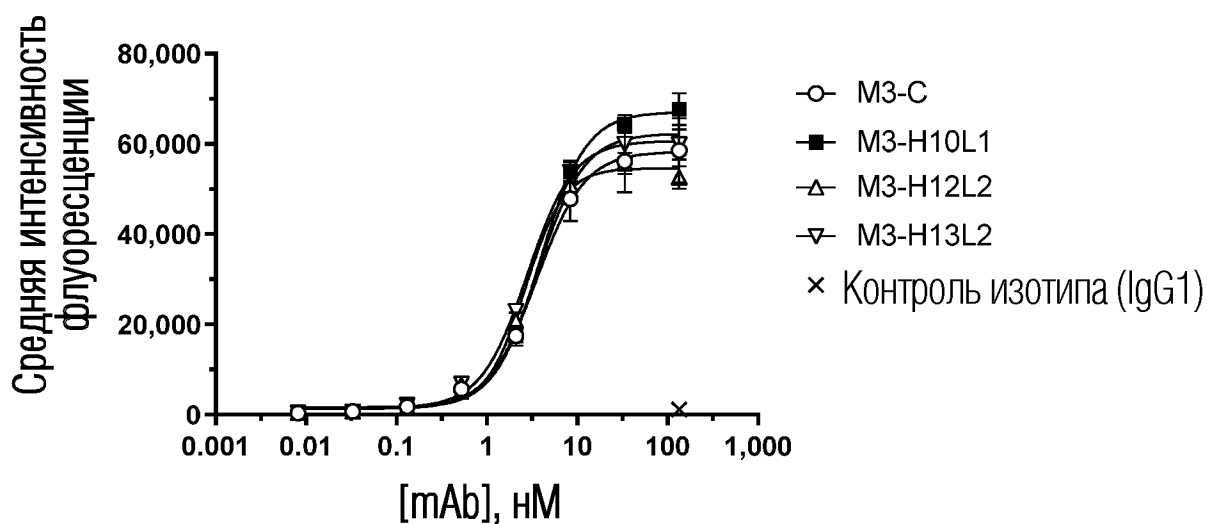
ФИГ. 3G



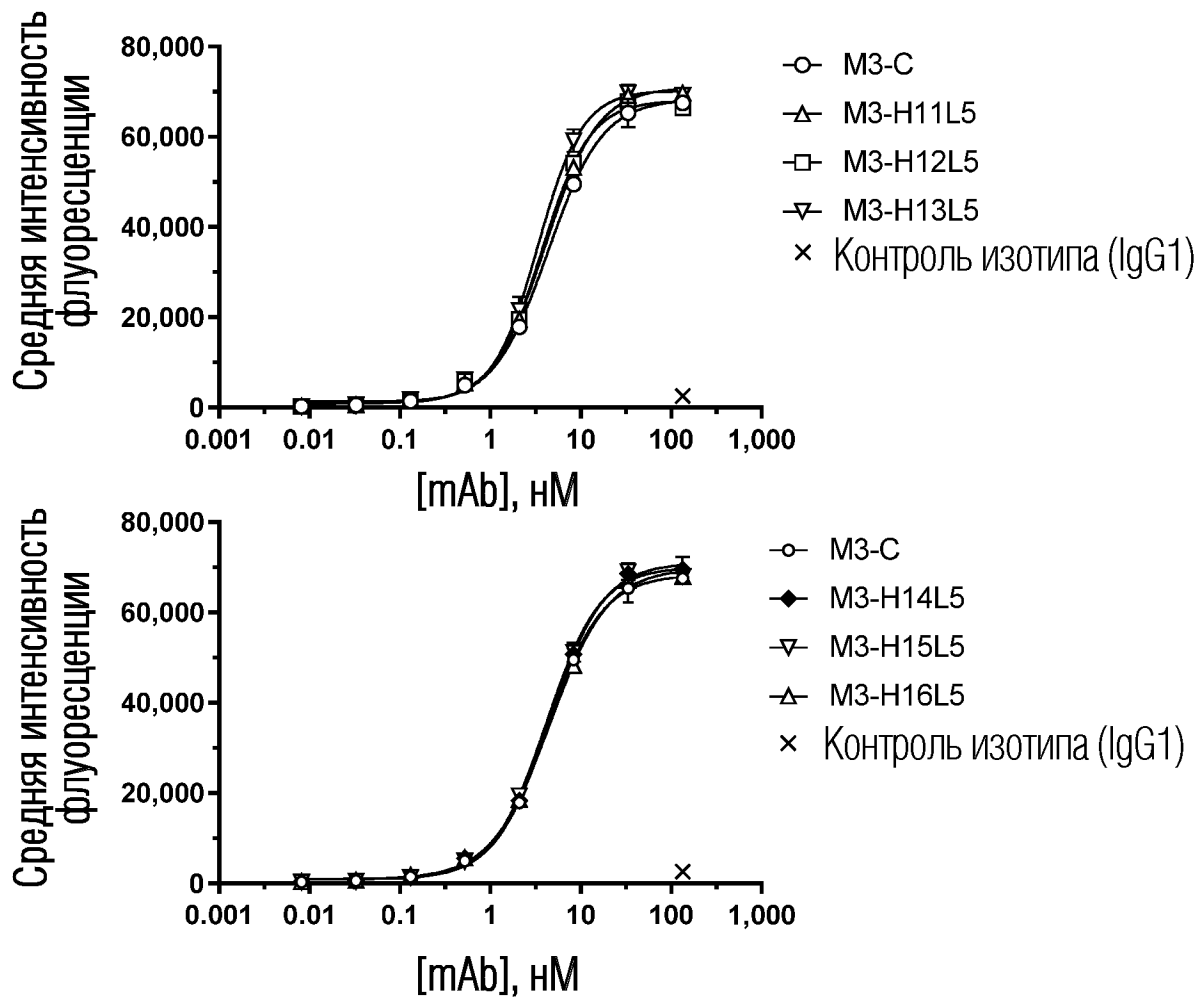
ФИГ. 3H



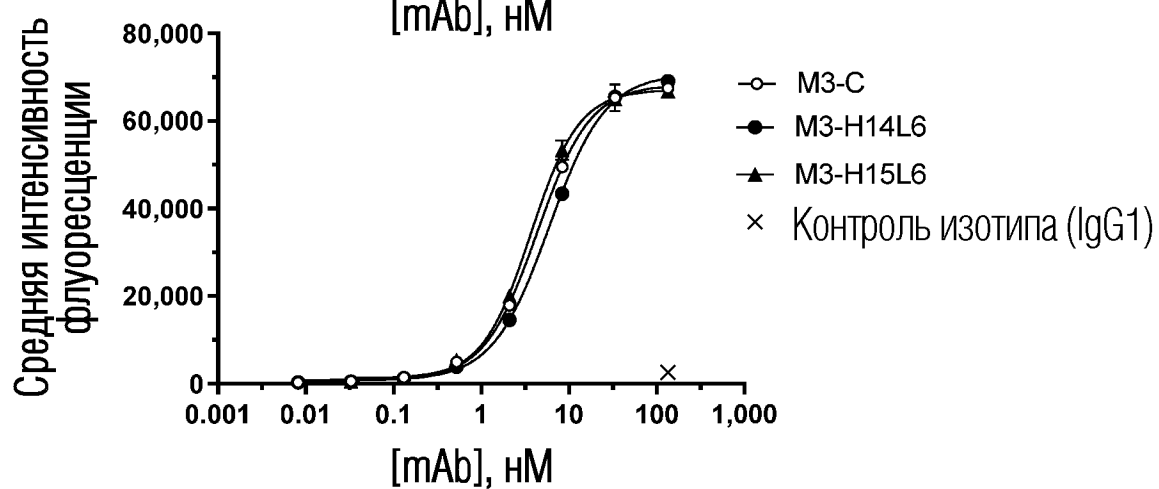
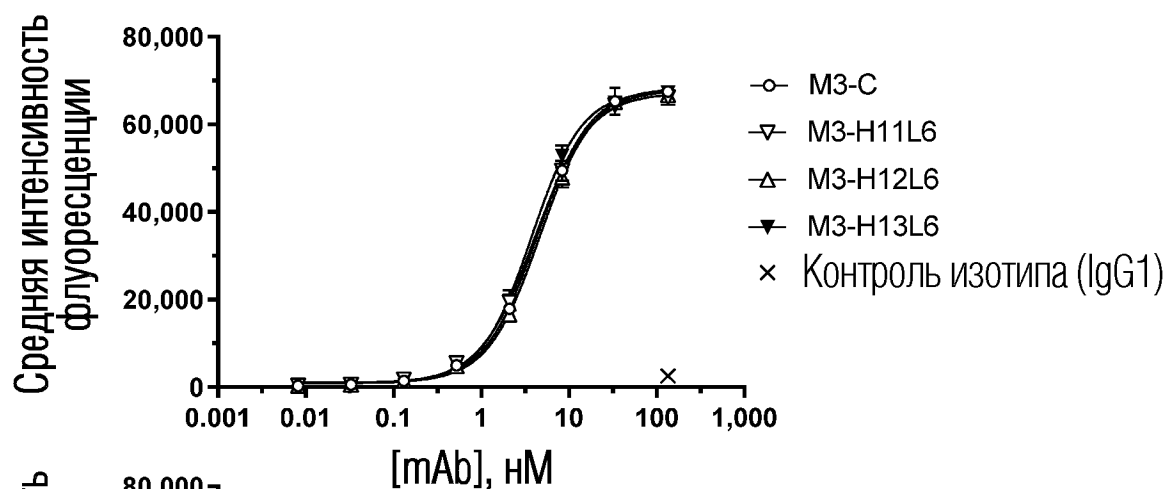
ФИГ. 3I



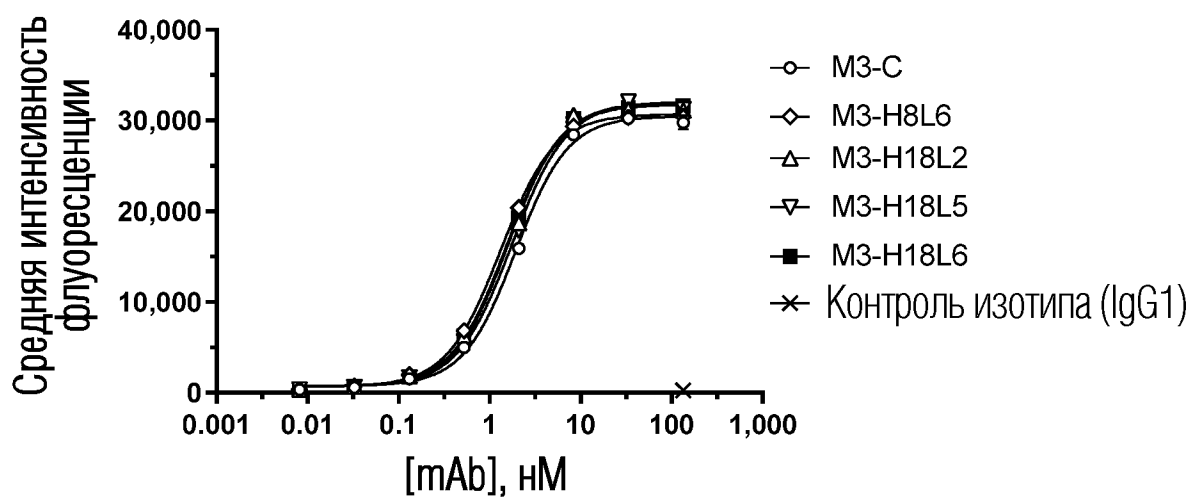
ФИГ. 3J



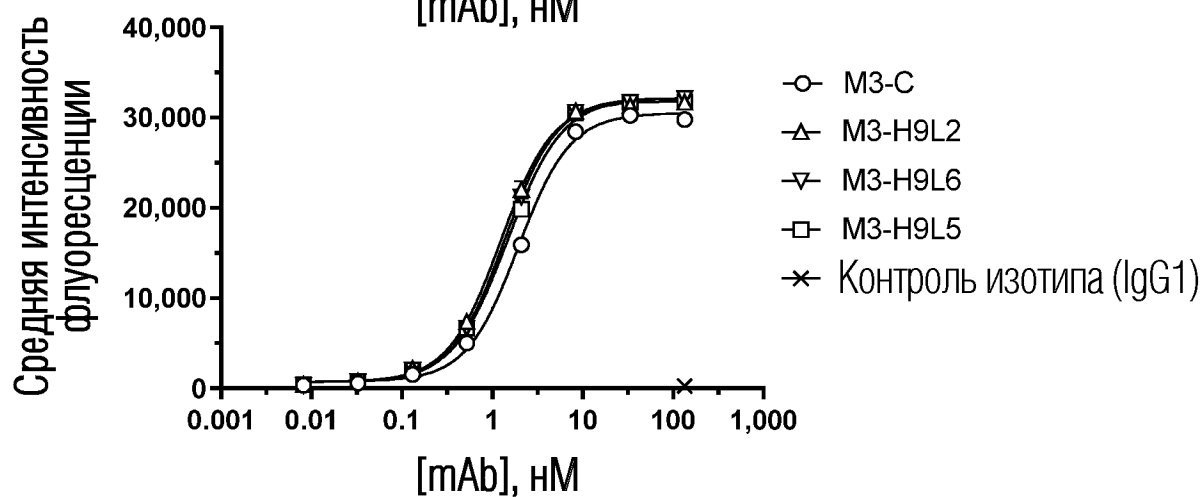
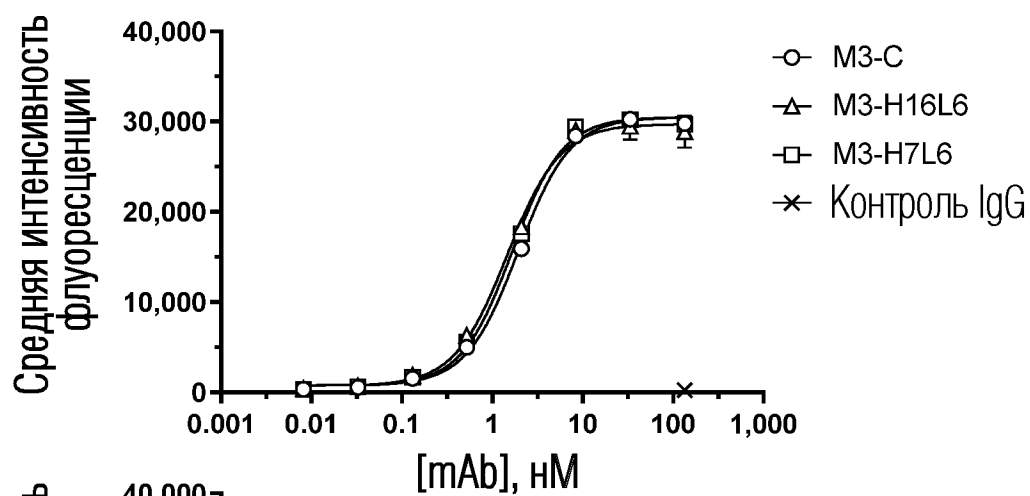
ФИГ. 3К



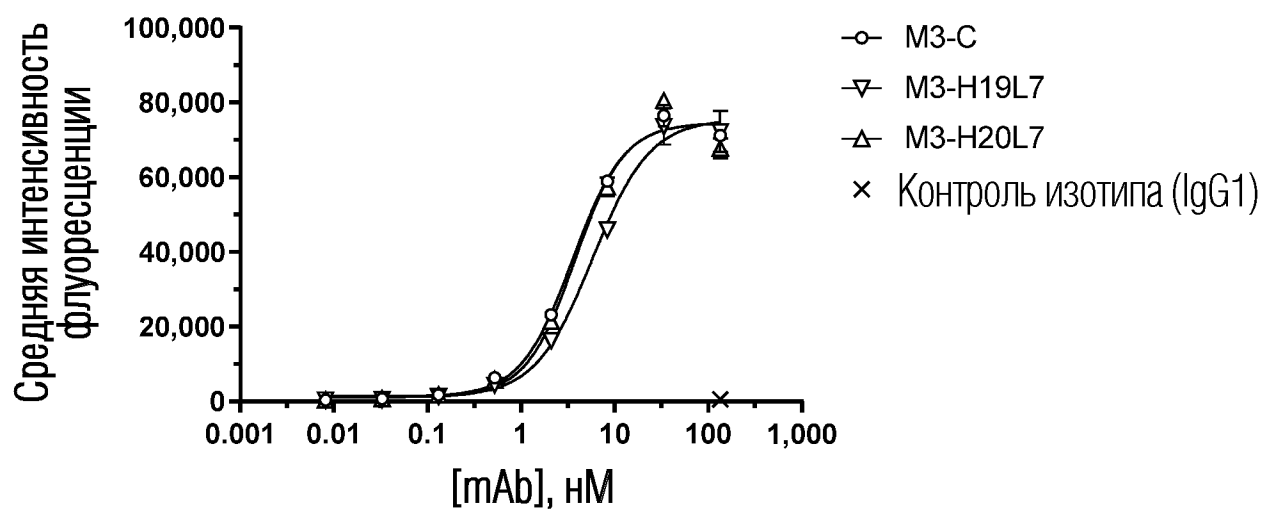
ФИГ. 3L



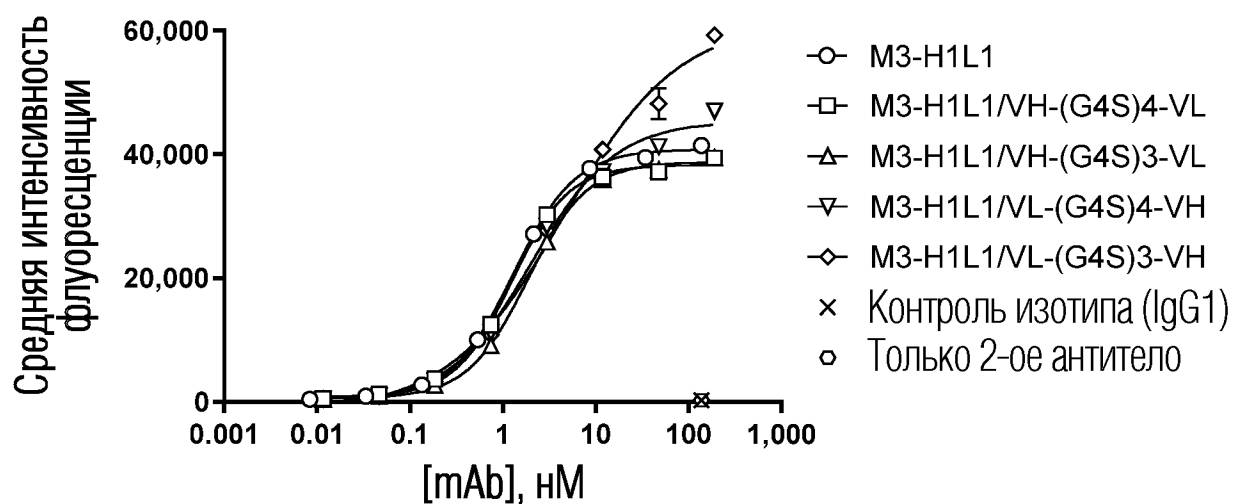
ФИГ. 3M



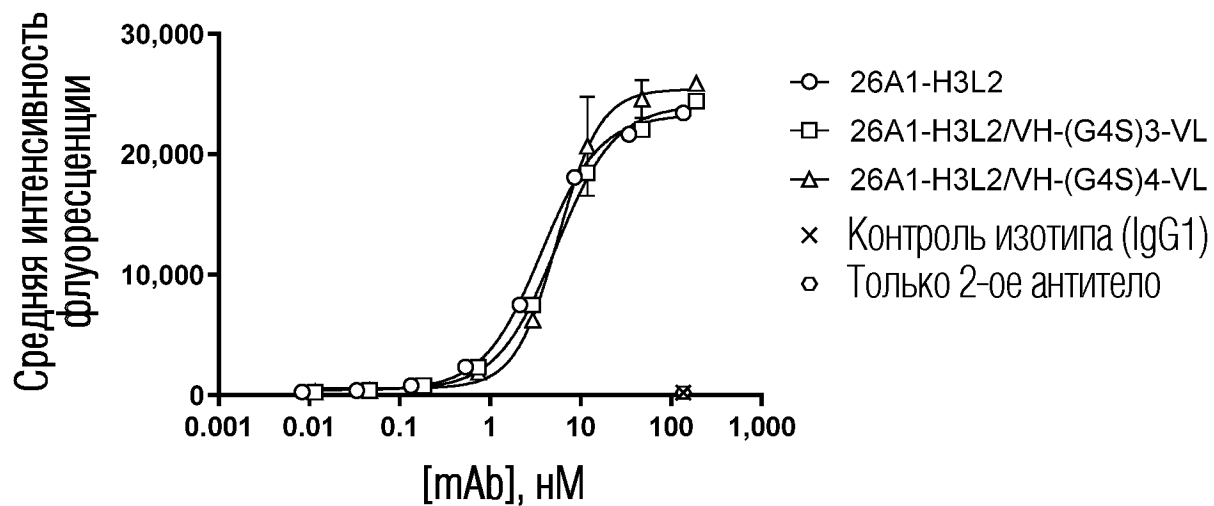
ФИГ. 3N



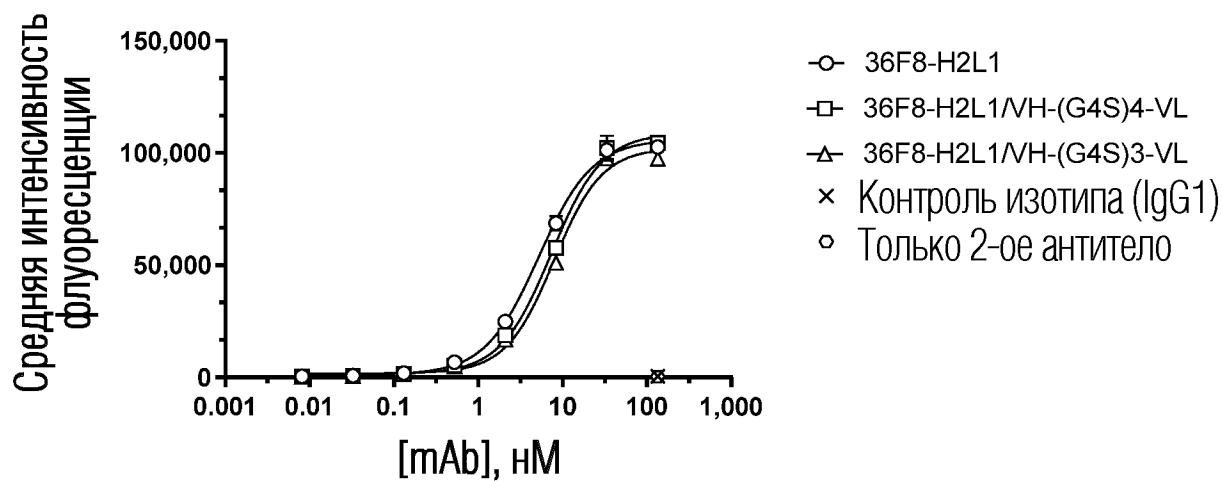
ФИГ. 3O



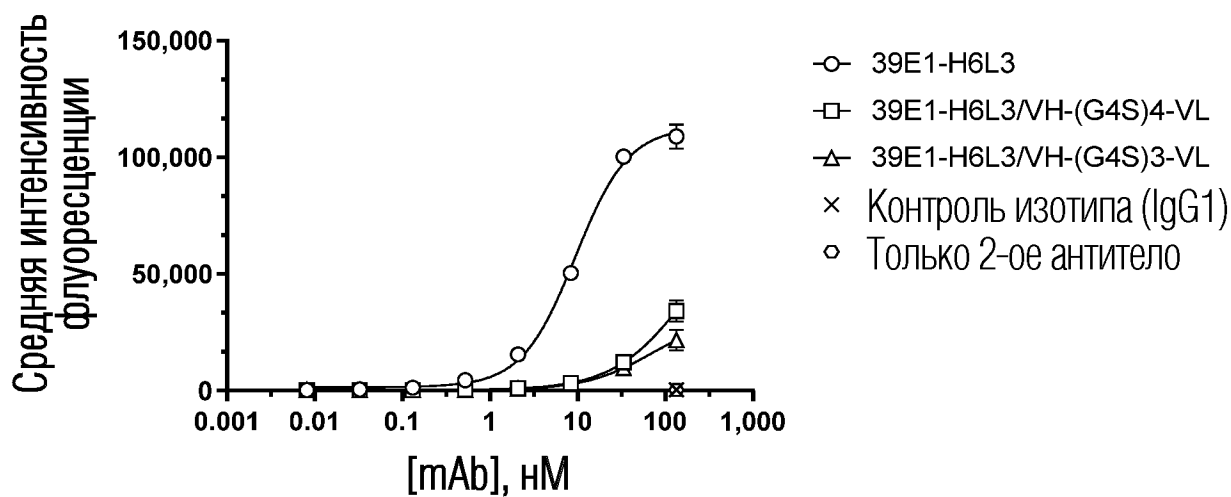
ФИГ. 4А



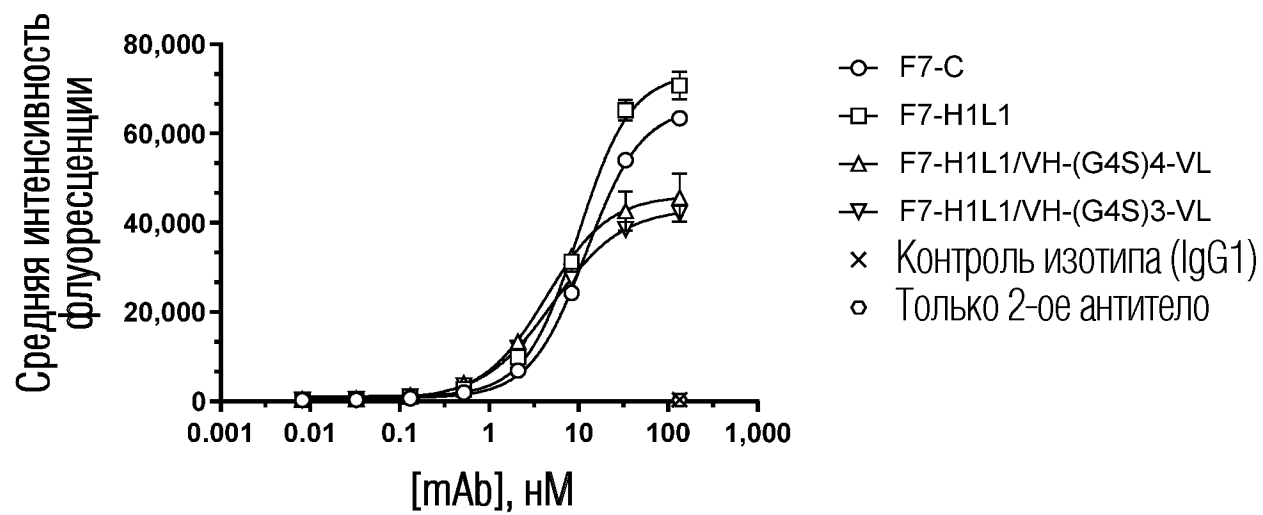
ФИГ. 4В



ФИГ. 4С



ФИГ. 4D



ФИГ. 4Е