

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393006 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.12

(51) Int. Cl. C07K 14/725 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.04.25

(54) ХИМЕРНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА ADGRE2 И/ИЛИ CLEC12A, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/179,799; 63/287,655

(32) 2021.04.26; 2021.12.09

(33) US

(86) PCT/US2022/026131

(87) WO 2022/232016 2022.11.03

(88) 2023.01.05

(71) Заявитель:

МЕМОРИАЛ СЛОАН-КЕТТЕРИНГ
КЭНСЕР СЕНТЕР; СЛОАН-
КЕТТЕРИНГ ИНСТИТУТ
ФОР КЭНСЕР РИСЕРЧ;
МЕМОРИАЛ ХОСПИТАЛ
ФОР КЭНСЕР ЭНД ЭЛЛАЙД
ДИЗИЗЕС; МИЛЛЕННИУМ
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

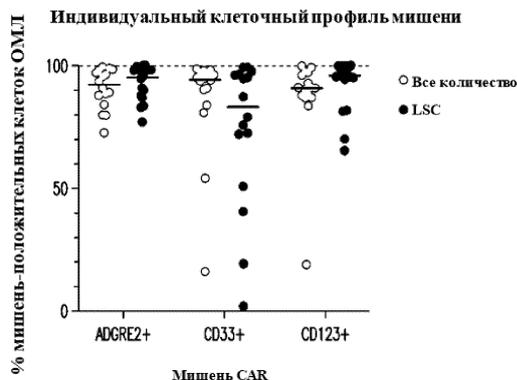
(72) Изобретатель:

Садлейн Мишель, Хаубнер Саша П.,
Мансилья-Сото Хорхе, Шапиро Гари,
Хэ Синюэ (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Раскрытый в изобретении объект изобретения относится к химерным рецепторам, которые нацелены на ADGRE2, и химерным рецепторам, которые нацелены на CLEC12A. Раскрытый в настоящем описании объект изобретения также относится к клеткам, содержащим ADGRE2-нацеленные химерные рецепторы, клеткам, содержащим CLEC12A-нацеленные химерные рецепторы, и клеткам, содержащим ADGRE2-нацеленные химерные рецепторы и CLEC12A-нацеленные химерные рецепторы. Раскрытый в изобретении объект изобретения дополнительно относится к применению таких клеток для лечения опухолей, например ОМЛ.



A1

202393006

202393006

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579157EA/085

ХИМЕРНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА ADGRE2 И/или CLEC12A, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент США № 63/179,799, поданной 26 апреля 2021 г., и временной заявки на патент США № 63/287,655, поданной 9 декабря 2021 г., содержание каждой из которых в полном объеме включено посредством ссылки и по каждой из которых заявлен приоритет.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 21 апреля 2022 г., имеет название 087108_0110_SL.txt и размер 150762 байта.

1. ВВЕДЕНИЕ

Раскрытый в настоящем описании объект изобретения относится к способам и композициям для иммунотерапии. Он относится к химерным рецепторам, которые нацелены на ADGRE2, и химерным рецепторам, которые нацелены на CLEC12A, клеткам, содержащим такие химерные рецепторы, и способам применения таких клеток для лечения, например для лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ).

2. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Клеточная иммунотерапия представляет собой терапию с лечебным потенциалом для лечения рака. Т-клетки и другие иммунные клетки можно модифицировать для нацеливания на опухолевые антигены посредством внесения генетического материала, кодирующего искусственные или синтетические рецепторы для антигена, называемые химерными антигенными рецепторами (CAR), специфические в отношении выбранных антигенов. Направленная Т-клеточная терапия с использованием CAR недавно продемонстрировала клинический успех при лечении гемобластозов.

Рецидивирующий и рефрактерный острый миелоидный лейкоз (Р/Р ОМЛ) характеризуется очень плохим прогнозом. Единственным вариантом лечения является трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, которая часто связана с неудачным лечением и значительной связанной с терапией токсичностью и летальностью. Следовательно, необходимы новые терапевтические подходы для Р/Р ОМЛ. За последние несколько лет аутологичные Т-клетки, генетически модифицированные так, чтобы экспрессировать химерный антигенный рецептор (CAR), нацеленный на CD19, произвели революцию в лечении и улучшили результаты пациентов с Р/Р В-клеточными гемобластозами, что привело к одобрению FDA трех CD19 CAR (тисагенлеклейсела, аксикабтаген цилолейсела и брексукабтаген аутолейсела) для Р/Р острого лимфобластного лейкоза и/или некоторых В-клеточных неходжкинских лимфом. В случае ОМЛ клиническое исследование CAR Т-клеточной терапии все еще находится на ранней фазе, а

клинические результаты, преимущественно с CD33 и CD123 CAR T-клетками, предполагают проблемы в контексте как безопасности, так и эффективности, которые связаны с повсеместной экспрессией CD33 и CD123 при нормальном гемопоэзе и фенотипической гетерогенностью опухолевых клеток ОМЛ. Соответственно, существует потребность в новом комбинаторном формате CAR для P/P ОМЛ, который обладает потенциалом обеспечивать улучшенную безопасность и эффективность по сравнению с альтернативными вариантами CAR-терапии, находящимися на данный момент на этапе клинических исследований.

3. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Раскрытый в настоящем описании объект изобретения относится к химерным рецепторам, которые нацелены на ADGRE2, и химерным рецепторам, которые нацелены на CLEC12A, клеткам, содержащим такие химерные рецепторы, и способам применения таких клеток для лечения, например для лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ).

В одном аспекте раскрытый в настоящем описании объект изобретения относится к химерным рецепторам, которые нацелены на ADGRE2. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный химерный рецептор содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с ADGRE2, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит: а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию; и/или б) вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), Fab или F(ab)₂. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv представляет собой гуманизированный scFv.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ

ID NO: 36, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35; а переменная область легкой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55 или SEQ ID NO: 146. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:46 или SEQ ID NO:49. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 147. В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на

приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 55; а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 53 или SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:46 или SEQ ID NO:49; а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 50.

В некоторых вариантах осуществления

- a) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39; а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40;
- b) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43; а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44;
- c) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46; а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 47;
- d) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 49; а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50;
- e) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52; а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53;
- f) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 55; а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56; или g)

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 146; а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 147.

В некоторых вариантах осуществления

а) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39; а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40;

б) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43; а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44;

с) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46; а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 47; или

д) вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 49; а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39; а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит линкер между вариабельной областью тяжелой цепи и вариабельной областью легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления линкер состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 149.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи расположены от N- до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит или представляет собой scFv, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 148. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит или представляет собой scFv, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит или представляет собой scFv, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен связывается с ADGRE2 с константой диссоциации (K_D) менее чем приблизительно 10^{-8} M, менее чем приблизительно 10^{-9} M, менее чем приблизительно 10^{-10} M, менее чем

приблизительно 10^{-11} М, менее чем приблизительно 10^{-12} М или менее чем приблизительно 10^{-13} М. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен связывается с ADGRE2 с EC50 от приблизительно 1 до приблизительно 100 нМ. В некоторых вариантах осуществления EC50 составляет от приблизительно 10 до приблизительно 95 нМ. В некоторых вариантах осуществления EC50 составляет от приблизительно 25 до приблизительно 75 нМ.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит полипептид CD8, полипептид CD28, полипептид CD3 ζ , полипептид CD4, полипептид 4-1BB, полипептид OX40, полипептид ICOS, полипептид CTLA-4, полипептид PD-1, полипептид LAG-3, полипептид 2B4 или полипептид BTLA. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит полипептид CD28.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит полипептид CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления полипептид CD3 ζ представляет собой модифицированный полипептид CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид CD3 ζ содержит нативный ITAM1, вариант ITAM2, состоящий из двух мутаций с потерей функции, и вариант ITAM3, состоящий из двух мутаций с потерей функции. В некоторых вариантах осуществления нативный ITAM1 состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления вариант ITAM2 состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления вариант ITAM3 состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид CD3 ζ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 27.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен дополнительно содержит по меньшей мере одну костимулирующую сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит полипептид CD28, полипептид 4-1BB, полипептид OX40, полипептид ICOS, полипептид DAP-10 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит полипептид CD28.

В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный химерный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), химерный костимулирующий рецептор (CCR) или TCR-подобную слитую молекулу. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный химерный рецептор представляет собой CAR.

В одном аспекте раскрытый в настоящем описании объект изобретения относится к химерным рецепторам, которые нацелены на CLEC12A. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный химерный рецептор содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CLEC12A, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

116, или ее консервативную модификацию;

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 123, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 124, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 125, или ее консервативную модификацию; или

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 132, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 133, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 134, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), Fab или F(ab)₂. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv представляет собой человеческий scFv.

В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит:

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71;

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 82, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83;

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 91;

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 98;

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 103, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83;

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 109, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 103, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ

содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 151.

В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71; и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 126 или SEQ ID NO: 135. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 126 или SEQ ID NO: 135. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 95 или SEQ ID NO: 100. В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75.

В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 127 или SEQ ID NO: 136. В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 127 или SEQ

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 95; а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 96; или

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 100; а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 101.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75; а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит линкер между вариабельной областью тяжелой цепи и вариабельной областью легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления линкер состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 149.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи расположены от N- до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит или представляет собой scFv, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 128 или SEQ ID NO: 137. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит или представляет собой scFv, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 97 или SEQ ID NO: 102. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит или представляет собой scFv, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 79.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен связывается с CLEC12A с константой диссоциации (K_D) менее чем приблизительно 10^{-8} М, менее чем приблизительно 10^{-9} М, менее чем приблизительно 10^{-10} М, менее чем приблизительно 10^{-11} М, менее чем приблизительно 10^{-12} М или менее чем приблизительно 10^{-13} М. В некоторых вариантах осуществления K_D составляет приблизительно 0,1 пМ или менее. В некоторых вариантах осуществления K_D составляет от приблизительно 0,05 пМ до приблизительно 0,5 пМ. В некоторых вариантах осуществления K_D составляет от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 5,0 нМ. В некоторых вариантах осуществления K_D составляет от приблизительно 0,3 нМ до приблизительно 3,5 нМ. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен связывается с CLEC12A с EC50 от приблизительно 1 нМ до приблизительно 100 нМ.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит полипептид CD8, полипептид CD28, полипептид CD3 ζ , полипептид CD4, полипептид 4-

1ВВ, полипептид ОХ40, полипептид ICOS, полипептид CTLA-4, полипептид PD-1, полипептид LAG-3, полипептид 2В4 или полипептид ВТLА. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит полипептид CD8.

В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный химерный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), химерный костимулирующий рецептор (CCR) или TCR-подобную слитую молекулу. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный химерный рецептор представляет собой химерный костимулирующий рецептор (CCR).

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен не содержит полипептид CD3ζ. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит по меньшей мере одну костимулирующую сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит полипептид CD28, полипептид 4-1ВВ, полипептид ОХ40, полипептид ICOS, полипептид DAP-10 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит полипептид 4-1ВВ.

В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор экспрессируется из вектора. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор.

Описанный в данном документе объект изобретения дополнительно относится к клеткам, содержащим описанный в настоящем описании химерный рецептор. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит описанный в настоящем описании ADGRE2-нацеленный химерный рецептор. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит описанный в настоящем описании CLEC12A-нацеленный химерный рецептор. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит а) описанный в настоящем описании ADGRE2-нацеленный химерный рецептор и б) описанный в настоящем описании CLEC12A-нацеленный химерный рецептор. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный химерный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), а CLEC12A-нацеленный химерный рецептор представляет собой химерный костимулирующий рецептор (CCR).

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с ADGRE2 и содержит:

а) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию; и/или

б) переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее

консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35; а переменная область легкой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления

а) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 39; и/или

б) переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39; а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления CCR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CLEC12A и содержит:

а) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71, или ее

консервативную модификацию; и/или

b) переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71; и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления

a) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 75; и/или

b) переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75; а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления клетка трансдуцирована ADGRE2-нацеленным химерным рецептором и/или CLEC12A-нацеленным химерным рецептором. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный химерный рецептор и/или CLEC12A-нацеленный химерный рецептор конститутивно экспрессируются на

поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой иммунореактивную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку лимфоидной линии дифференцировки или клетку миелоидной линии дифференцировки. В некоторых вариантах осуществления клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), стволовой клетки, из которой может дифференцироваться лимфоидная клетка, и стволовой клетки, из которой может дифференцироваться миелоидная клетка. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка выбрана из группы, состоящей из хелперных Т-клеток, цитотоксических Т-клеток, Т-клеток памяти, регуляторных Т-клеток, опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), естественных Т-клеток-киллеров, инвариантных Т-клеток слизистой оболочки и $\gamma\delta$ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой естественную клетку-киллера (NK). В некоторых вариантах осуществления NK-клетка получена из стволовой клетки. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка представляет собой эмбрионидную стволовую клетку или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку.

Кроме того, описанный в настоящем описании объект изобретения относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим описанные в настоящем описании химерные рецепторы. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует описанный в настоящем описании ADGRE2-нацеленный химерный рецептор. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует описанный в настоящем описании CLEC12A-нацеленный химерный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит промотор, который функционально связан с химерным рецептором. В некоторых вариантах осуществления промотор является эндогенным или экзогенным. В некоторых вариантах осуществления экзогенный промотор выбран из группы, состоящей из промотора фактора элонгации (EF)-1, немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV), раннего промотора вируса обезьян 40 (SV40), промотора фосфоглицераткиназы (PGK), промотора металлотионеина и промотора убиквитина С. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой индуцибельный промотор. В некоторых вариантах осуществления индуцибельный промотор выбран из группы, состоящей из промотора транскрипционного элемента NFAT (TRE), промотора CD69, промотора CD25, промотора IL-2, промотора 4-1BB, промотора PD1 и промотора LAG3. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой эндогенный промотор. В некоторых вариантах осуществления эндогенный промотор выбран из промотора TCR альфа, промотора TCR бета и промотора бета 2-микроглобулина.

Описанный в настоящем описании объект изобретения относится к композиции нуклеиновой кислоты, содержащей первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный в настоящем описании ADGRE2-нацеленный химерный рецептор, и вторую

молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный в настоящем описании CLEC12A-нацеленный химерный рецептор.

Описанный в настоящем описании объект изобретения также относится к векторам, содержащим описанную в настоящем описании молекулу нуклеиновой кислоты или описанную в настоящем описании композицию нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой ретровирусный вектор.

Описанный в настоящем описании объект изобретения дополнительно относится к клеткам, экспрессирующим описанную в настоящем описании молекулу нуклеиновой кислоты или описанную в настоящем описании композицию нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку.

Описанный в настоящем описании объект изобретения относится к композициям, содержащим описанную в настоящем описании клетку. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию, дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит от приблизительно 25×10^6 до приблизительно 150×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит от приблизительно 25×10^6 до приблизительно 50×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит приблизительно $2,5 \times 10^6$ клеток.

Описанный в настоящем описании объект изобретения дополнительно относится к различным способам применения описанных в настоящем описании клеток. Описанный в настоящем описании объект изобретения относится к способам уменьшения опухолевой нагрузки у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту клеток или композиции, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает уменьшение числа опухолевых клеток, уменьшение размера опухоли и/или устранение опухоли у субъекта.

Описанный в настоящем описании объект изобретения относится к способам повышения выживаемости субъекта, имеющего опухоль. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту клеток или композиции, описанных в настоящем описании.

Описанный в настоящем описании объект изобретения относится к способам лечения и/или предотвращения появления опухоли у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение субъекту клеток или композиции, описанных в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления опухоль экспрессирует ADGRE2 и/или CLEC12A. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой рак крови. В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из группы, состоящей из множественной миеломы, лейкоза, лимфом и миелоидных злокачественных образований. В некоторых вариантах осуществления лейкоз выбран из группы, состоящей из острого миелоидного

лейкоза (ОМЛ), хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ), острого лейкоза смешанного типа (ОЛСТ), волосатоклеточного лейкоза и В-клеточного промиелоцитарного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления лейкоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ). В некоторых вариантах осуществления ОМЛ представляет собой рецидивирующий/рефрактерный острый миелоидный лейкоз (Р/Р ОМЛ). В некоторых вариантах осуществления миелоидные злокачественные образования выбраны из группы, состоящей из миелодиспластических синдромов (МДС), миелопролиферативных новообразований (МПН), миелоидных/лимфоидных новообразований (например, миелоидных/лимфоидных новообразований с эозинофилией и перестройкой рецептора тромбоцитарного фактора роста альфа (PDGFRA), рецептора тромбоцитарного фактора роста альфа бета (PDGFRB) или рецептора фактора роста фибробластов 1 (FGFR1), или с PCM1-JAK2), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), бластного новообразования из плазмацитоидных дендритных клеток, В-лимфобластных лейкоза/лимфомы и Т-лимфобластных лейкоза/лимфомы. В некоторых вариантах осуществления миелоидные злокачественные образования включают миелодиспластические синдромы (МДС). В некоторых вариантах субъект представляет собой субъекта-человека.

Кроме того, описанный в настоящем описании объект изобретения относится к способам получения клеток, содержащих описанные в настоящем описании химерные рецепторы. В некоторых вариантах осуществления способ включает внесение в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует описанный в настоящем описании химерный рецептор.

Кроме того, описанный в настоящем описании объект изобретения относится к способам получения клетки, содержащей описанный в настоящем описании ADGRE2-нацеленный химерный рецептор и описанный в настоящем описании CLEC12A-нацеленный химерный рецептор. В некоторых вариантах осуществления способ включает внесение в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует ADGRE2-нацеленный химерный рецептор, и молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует CLEC12A-нацеленный химерный рецептор, описанный в настоящем описании.

4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Следующее подробное описание, приведенное в качестве примера, но не подразумевающее ограничения изобретения конкретными описанными вариантами осуществления, можно понять в сочетании с прилагаемыми графическими материалами.

Фиг. 1А и 1В иллюстрируют профили экспрессии антигена-мишени ADGRE2, CD33, и CD123, оцениваемые методом проточной цитометрии свежих образцов от пациентов с ОМЛ (периферической крови или костного мозга); n=16 взрослых пациентов с р/р ОМЛ с морфологическим заболеванием. Экспрессию мишени сравнивали с общим количеством клеток ОМЛ (гейт CD45_{дим.}/SSC_{низк.}) и лейкозными стволовыми клетками [LSC; Lin-CD34+CD38-(CD45RA+) в пределах гейта общего количества клеток ОМЛ]. Гейты для

положительности в отношении мишени основаны на отрицательной контрольной популяции между образцами (Т- или В-клетки). На Фиг. 1А показан процент мишень-положительных клеток ОМЛ в пределах общего количества или популяции ЛСК образца индивидуального пациента, представленного каждой точкой. У большинства оцененных пациентов с ОМЛ > 90% клеток ОМЛ были положительными в отношении ADGRE2, как в случае общего количества, так и ЛСК. На Фиг. 1В показан процент оцененной популяции пациентов с ОМЛ с > 70% мишень-положительных клеток ОМЛ. Все оцененные пациенты с ОМЛ имели > 70% ADGRE2-положительных клеток ОМЛ, как в случае общего количества, так и ЛСК.

Фиг. 2 иллюстрирует схематическое представление CAR, CCR и CAR+CCR.

На Фиг. 3 приведено обоснование для подхода ADCLEC.syn1 для улучшения противолейкозной эффективности по сравнению с CD33 и CD123-CAR. Один ADGRE2-CAR обеспечивает некоторую противолейкозную активность, но может быть ограничен вследствие механизмов уклонения ADGRE2-низк. Один CLEC12A-CCR не опосредует какой-либо клеточный лизис. В ADCLEC.syn1 объединены низкоаффинный ADGRE2-CAR и высокоаффинный CLEC12A-CCR, тем самым повышая направленную на ОМЛ авидность и снижая риск уклонения ADGRE2-низк. ОМЛ. Кроме того, CLEC12A-CCR-зависимая транс-костимуляция посредством 4-1BB дополнительно повышает функциональность Т-клеток. По сравнению с этим, однонаправленные подходы CD33-CAR или CD123-CAR могут быть ограничены по эффективности вследствие уклонения антигена-low и фенотипической гетерогенности (смотрите профили мишеней на Фиг. 1).

Фиг. 4А_4С иллюстрируют профили экспрессии ADGRE2, CLEC12A (CD371), CD33 и CD123 при нормальном гематопозе и в негематопозических тканях, демонстрируя в большей степени не перекрывающийся профиль экспрессии ADGRE2 и CLEC12A. На Фиг. 4А и 4В показанные полученные методом проточной цитометрии профили коэкспрессии ADGRE2/CLEC12A в сравнении с CD33/CD123 на репрезентативных популяциях клеток костного мозга взрослых нормальных доноров (рейтинг: моноциты - CD45_{выс.}/SSC_{средн.}/CD14+, гранулоциты - CD45_{дим.}/SSC_{выс.}, HSC - CD45_{дим.}/SSC_{низк.}/CD34+/CD38-/CD45RA-/CD90+, Т-клетки - CD45_{выс.}/SSC_{низк.}/CD3+, В-клетки - CD45_{выс.}/SSC_{низк.}/CD19+). На Фиг. 4С показана тепловая карта, демонстрирующая сводные данные по иммуногистохимии совместного окрашивания в отношении ADGRE2 и CLEC12A в зафиксированных формалином и погруженных в парафин нормальных человеческих тканях. Интенсивность окрашивания указывает на клеточную положительность, за исключением жидкостей с высокой вероятностью неспецифического окрашивания. ADGRE2/CLEC12A имел ожидаемую коэкспрессию на миелоидных клетках в связанных с иммунностью тканях (в основном моноцитарной линии дифференцировки), но в других оцениваемых тканях была обнаружена отсутствующая или ограниченная перекрывающаяся экспрессия.

На Фиг. 5 приведено обоснование для подхода ADCLEC.syn1 для улучшения профиля безопасности по сравнению с CD33- и CD123-CAR. ADGRE2-CAR с

оптимизированной аффинностью и точно подобранной силой CD3 ζ -сигнализации сам по себе не влияет на клетки с низкими или очень низкими уровнями ADGRE2 (ГСК или гранулоциты, соответственно). Высокоаффинный CLEC12A-CCR сам по себе не опосредует какой-либо клеточный лизис. В ADCLEC.syn1 объединены низкоаффинный ADGRE2-CAR и высокоаффинный CLEC12A-CCR. Нормальные гемопоэтические клетки имеют в большей степени не перекрывающийся профиль экспрессии ADGRE2 и CLEC12A, при этом CLEC12A является негативным на ГСК. Следовательно, добавление CLEC12A-CCR не повышает риск ГСК-токсичности.

На Фиг. 6 проиллюстрирована схема выбора связывающего ADGRE2 scFv-фрагмента.

На Фиг. 7A-7C проиллюстрирована *in vitro* анализ цитотоксичности CAR через 18 ч в контексте разных уровней экспрессии мишени ADGRE2. Наблюдали благоприятный профиль для лучших гуманизированных scFv к ADGRE2, с максимальной цитотоксичностью при высоких уровнях ADGRE2 и минимальной цитотоксичностью при очень низких уровнях ADGRE2. Разные гуманизированные scFv-кандидаты к ADGRE2 и оригинальные scFv 2A1 исследовали в SFG-ретровирусном векторном остове 28z1XX CAR; для каждого scFv к ADGRE2 исследовали по 2 сигнальных пептида, один из которых включал наш установленный сигнальный пептид CD8 α , а другой включал альтернативный сигнальный пептид IgHV1-4. Цветными линиями проиллюстрированы 6 scFv с признаками цитотоксичности. Оставшиеся scFv-кандидаты (не включенные в подпись) проиллюстрированы серым цветом. CAR T-клетки культивировали совместно в течение 18 ч с линиями клеток ОМЛ MOLM13, экспрессирующими разные уровни ADGRE2: высокий (ДТ, Фиг. 7A), низкий (клон 1E8, Фиг. 7B) и очень низкий (клон 9D6, Фиг. 7C). Цитотоксичность измеряли на основании сигнала люциферазы от клеток MOLM13.

На Фиг. 8 проиллюстрирована *in vivo* противоопухолевая эффективность CAR шести (6) гуманизированных scFv к ADGRE2 в контексте разных уровней экспрессии мишени ADGRE2. *In vivo* модель противоопухолевой эффективности CAR, демонстрирующая благоприятный профиль для основных гуманизированных scFv к ADGRE2 с высокой эффективностью при высоких уровнях ADGRE2, сниженной цитотоксичностью при низких уровнях ADGRE2 и отсутствием цитотоксичности при очень низких уровнях ADGRE2. Шесть разных гуманизированных scFv-кандидатов к ADGRE2 и оригинальные 2A1 scFv исследовали в ретровирусном остове 28z1XX CAR на основе SFG. Эксперимент с *in vivo* ксенотрансплантатом линии клеток ОМЛ MOLM13 с 6-8-недельными мышами NSG. В день -5 мышам через хвостовую вену вводили указанный клон линии клеток MOLM13 (доза: 1E6 клеток на мышь). В день -1 приживление ОМЛ подтверждали посредством *in vivo* биолюминесцентной визуализации на основе ffLuc. В день 0 мышам через хвостовую вену вводили CAR T-клетки (доза: 3E5 CAR-положительных клеток на мышь). После этого количественно определяли нагрузку ОМЛ посредством биолюминесцентной визуализации и представляли через общий поток (ф/с).

На Фиг. 9 проиллюстрирована схема выбора связывающего CLEC12A scFv-

фрагмента.

На Фиг. 10А и 10В проиллюстрирована *in vitro* CAR-цитотоксичность scFv к CLEC12A в формате TRAC CAR-28z1XX в контексте линий клеток ОМЛ U937 и MOLM13. Анализ *In vitro* CAR-цитотоксичности через 18 ч, демонстрирующий благоприятный профиль для основных scFv к CLEC12A с высокой эффективностью при высоких и низких уровнях CLEC12A. Разные scFv-кандидаты к CLEC12A исследовали в остове TRAC-AAV 28z1XX CAR. Цветными линиями проиллюстрированы девять (9) scFv в наибольшей эффективности в контексте разных уровней CLEC12A. На Фиг. 10А проиллюстрирована цитотоксичность с линией клеток с высоким уровнем CLEC12A, U937. На Фиг. 10В проиллюстрирована цитотоксичность с линией клеток с низким уровнем CLEC12A, MOLM13. Оставшиеся scFv-кандидаты проиллюстрированы серым цветом. Т-клетки культивировали совместно в течение 18 ч с линиями клеток ОМЛ. Цитотоксичность измеряли на основании сигнала люциферазы от линий клеток ОМЛ.

На Фиг. 11 проиллюстрирована *in vivo* модель противоопухолевой эффективности CAR, демонстрирующая высокую эффективность в отношении основных scFv к CLEC12A. Девять (9) разных scFv-кандидатов к CLEC12A исследовали в остове TRAC-AAV 28z1XX CAR. Эксперимент с *in vivo* ксенотрансплантатом линии клеток ОМЛ U937 с 6-8-недельными мышами NSG. В день -4 мышам через хвостовую вену вводили указанный клон линии клеток U937 (доза: 1Е6 клеток на мышь). В день -1 приживление ОМЛ подтверждали посредством *in vivo* биолюминесцентной визуализации на основе ffLuc. В день 0 мышам через хвостовую вену вводили CAR Т-клетки (доза: 4Е5 CAR-положительных клеток на мышь). После этого количественно определяли нагрузку ОМЛ посредством биолюминесцентной визуализации и представляли через общий поток (ф/с).

На Фиг. 12А-12С проиллюстрированы анализы *in vitro* и *in vivo* эффективности CAR, свидетельствующие в пользу концепции ADCLEC.syn1 (схематически изображенную на Фиг. 3). На Фиг. 12А проиллюстрирован *in vitro* анализ цитотоксичности CAR через 18 ч. ADCLEC.syn1-трансдуцированные Т-клетки культивировали совместно с линией клеток мышинной лимфомы EL4, не экспрессирующих мишень (ADGRE2-/CLEC12A-) или сверхэкспрессирующих только мишень CAR (ADGRE2+/CLEC12A-), только мишень CCR (ADGRE2-/CLEC12A+) или как мишень CAR, так и CCR (ADGRE2+/CLEC12A+). CD19-нацеленную конструкцию 1928z1XX CAR использовали в качестве отрицательного контроля. % цитотоксичности указывает эффективность мишень-специфического уничтожения при заданном соотношении эффектор:мишень (Э:М). На Фиг. 12В и 12С проиллюстрирован *in vivo* эксперимент с ксенотрансплантатом линии клеток ОМЛ MOLM13 с 6-8-недельными мышами NSG. В день -5 мышам через хвостовую вену вводили указанный клон линии клеток MOLM13 (доза: 1×10^6 клеток на мышь). В день -1 приживление ОМЛ подтверждали посредством *in vivo* биолюминесцентной визуализации на основе ffLuc. В день 0 мышам через хвостовую вену вводили CAR Т-клетки (доза: 5×10^5 CAR-положительных клеток на мышь). После этого количественно определяли нагрузку ОМЛ посредством биолюминесцентной визуализации и представляли через

общий поток (ф/с).

На Фиг. 13 проиллюстрирована карта рестрикции pSFG-ADCLEC.syn1 (8940 п. о.).

На Фиг. 14 проиллюстрирован дизайн гамма-ретровирусного вектора для бицистронной конструкции ADCLEC.syn1, включающей ADGRE2ADGRE2-A-CAR и CLEC12ACLEC12A-A-CCR. Сокращения: ДКП=длинный концевой повтор, ДС=сайт донора сплайсинга, АС=сайт акцептора сплайсинга, СП=сигнальный пептид, scFv=одноцепочечный переменный фрагмент, Ш=шарнирный домен, ТМ=трансмембранный домен, С=костимулирующий домен, S=стимулирующий домен.

На Фиг. 15 проиллюстрирован репрезентативный план получения ADCLEC.syn1 CAR Т-клеток.

На Фиг. 16 проиллюстрирован алгоритм для проведения курса лечения после оценки заболевания D30.

На Фиг. 17А и 17В проиллюстрированы анализы солубилизованного мембранного белка (СМБ).

На Фиг. 18А и 18В проиллюстрированы стратегии комбинаторного гейтинга. На Фиг. 18А проиллюстрированы ранее описанные стратегии комбинаторного гейтинга CAR. На Фиг. 18В проиллюстрирована стратегия гейтинга «ЕСЛИ-ЛУЧШЕ».

На Фиг. 19А и 19В проиллюстрированы анализы *in vitro* эффективности CAR, свидетельствующие в пользу стратегии гейтинга «ЕСЛИ-ЛУЧШЕ» в контексте совместного нацеливания на ADGRE2/CLEC12A посредством ADCLEC.syn1. На Фиг. 19А проиллюстрирована цитотоксичность, индуцированная ADCLEC.syn1-трансдуцированными Т-клетками, культивируемыми вместе с линией клеток мышины лимфомы EL4, не экспрессирующей мишень (ADGRE2⁻/CLEC12A⁻) или сверх экспрессирующей только мишень CAR (ADGRE2⁺/CLEC12A⁻), только мишень CCR (ADGRE2⁻/CLEC12A⁺) или как мишень CAR, так и CCR (ADGRE2⁺/CLEC12A⁺). 1928z1XX CAR использовали в качестве отрицательного контроля. На Фиг. 19В проиллюстрирована цитотоксичность, индуцированная нетрансдуцированными, ADGRE2-CAR-, CLEC12A-CCR- или ADCLEC.syn1-трансдуцированными Т-клетками, совместно культивируемыми с клетками-мишенями MOLM13, которые были модифицированы для экспрессии разных уровней ADGRE2 (т. е. ADGRE2-выс. (ДТ), ADGRE2-низк. и ADGRE2-очень-низк.).

На Фиг. 20 проиллюстрирована *in vivo* валидация стратегии гейтинга «ЕСЛИ-ЛУЧШЕ» с использованием Т-клеток ADCLEC.syn1. Рост опухолей и выживаемость определяли в моделях с ксенотрансплантатом ОМЛ у мышей NSG, получавших инъекцию нетрансдуцированных, ADGRE2-CAR-, ADGRE2-CAR +CLEC12A-CAR-, CLEC12A-CCR- или ADCLEC.syn1-трансдуцированных Т-клеток.

На Фиг. 21 проиллюстрирован *in vivo* стресс-тест ADCLEC.syn1 посредством титрования дозы Т-клеток и повторной стимуляции ОМЛ. Рост опухолей и выживаемость определяли в моделях с ксенотрансплантатом ОМЛ у мышей NSG, получавших инъекцию ADCLEC.syn1-трансдуцированных Т-клеток в разных дозах.

5. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Раскрытый в настоящем описании объект изобретения относится к химерным рецепторам, которые нацелены на ADGRE2, и химерным рецепторам, которые нацелены на CLEC12A. Раскрытый в настоящем описании объект изобретения дополнительно относится к клеткам, содержащим описанный в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленный химерный рецептор, клеткам, содержащим описанный в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленный химерный рецептор, и клеткам, содержащим описанный в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленный химерный рецептор и описанный в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленный химерный рецептор. Клетки могут представлять собой иммунореактивные клетки, например, генетически модифицированные иммунореактивные клетки (например, Т-клетки или NK-клетки). Раскрытый в настоящем описании объект изобретения также относится к способам применения таких клеток для лечения, например, для лечения и/или предотвращения опухоли, связанной с ADGRE2 и/или CLEC12A (например, ОМЛ).

Неограничивающие варианты осуществления описанного в настоящем изобретении предмета изобретения описанные в представленном описании и примерах.

В целях ясности изложения, но не как ограничение, подробное описание разделено на следующие подразделы:

- 5.1. Определения;
- 5.2. Химерные рецепторы;
- 5.3. Внеклеточные антигенсвязывающие домены ADGRE2-нацеленных химерных рецепторов;
- 5.4. Типовые ADGRE2-нацеленные химерные рецепторы;
- 5.5. Внеклеточные антигенсвязывающие CLEC12A-нацеленных химерных рецепторов;
- 5.6. Типовые CLEC12A-нацеленные химерные рецепторы;
- 5.7. Клетки;
- 5.8. Молекулы нуклеиновых кислот, векторы и генетические модификации;
- 5.9. Составы и введение; и
- 5.10. Способы лечения.

5.1. Определения

Если не указано иное, все употребляемые в настоящем изобретении технические и научные термины имеют общепринятое значение, понятное специалисту в области техники, к которой относится раскрытый в настоящем описании объект изобретения. Следующие ссылки обеспечивают специалиста общим определением многих терминов, используемых в описанном в настоящем изобретении предмете изобретения: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); и Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). В контексте данного документа следующие термины имеют значения, приписанные им ниже, если не указано иное.

В контексте настоящего изобретения термин «около» или «приблизительно» означает в пределах допустимого интервала погрешности для конкретного значения, определенного специалистом в данной области техники, который будет частично зависеть от того, каким образом измерено или определено это значение, т. е. от ограничений системы измерения. Например, «приблизительно» может означать в пределах 3 или более 3 стандартных отклонений в соответствии с практикой в данной области техники. В альтернативном варианте «приблизительно» может означать диапазон до 20%, предпочтительно до 10%, более предпочтительно до 5% и более предпочтительно до 1% от заданного значения. В альтернативном варианте, в частности в отношении биологических систем или процессов, этот термин может означать в пределах порядка величины, предпочтительно в пределах 5-кратного и более предпочтительно в пределах 2-кратного превышения значения.

Под «иммунореактивной клеткой» подразумевается клетка, чья функция связана с иммунным ответом, или ее предшественник или потомство. В некоторых вариантах осуществления иммунореактивная клетка представляет клетку лимфоидной линии дифференцировки. Неограничивающие примеры клеток лимфоидной линии дифференцировки включают Т-клетки, естественные клетки-киллеры (НК), В-клетки и стволовые клетки, из которых могут дифференцироваться лимфоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунореактивная клетка представляет клетку миелоидной линии дифференцировки.

Под «активацией иммунореактивной клетки» подразумевается индукция передачи сигнала или изменения белковой экспрессии в клетке, приводящие к инициации иммунного ответа. Например, когда цепи CD3 кластеризуются в ответ на связывание лиганда и иммунорецепторных тирозиновых ингибирующих мотивов (ITAM), инициируется каскад передачи сигнала. В некоторых вариантах осуществления, когда эндогенный TCR или экзогенный CAR связывается с антигеном, происходит образование иммунологического синапса, что включает кластеризацию многих молекул вблизи связанного рецептора (например, CD4 или CD8, CD3 $\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$ и т. д.). Эта кластеризация мембраносвязанных сигнальных молекул обеспечивает возможность фосфорилирования мотивов ITAM, содержащихся в цепях CD3. Это фосфорилирование, в свою очередь, инициирует путь активации Т-клеток, в конечном итоге активируя факторы, такие как NF- κ B и AP-1. Эти транскрипционные факторы индуцируют глобальную генную экспрессию Т-клеток с повышением выработки IL-2 для пролиферации и экспрессии основных регуляторных Т-клеточных белков с целью инициации опосредованного Т-клетками иммунного ответа.

Под «стимуляцией иммунореактивной клетки» подразумевается сигнал, который приводит к мощному и стойкому иммунному ответу. В различных вариантах осуществления это происходит после активации иммунной клетки (например, Т-клетки) или одновременно опосредуется рецепторами, включая, но не ограничиваясь этим, CD28, CD137 (4-1BB), OX40, CD40 и ICOS. Получение множества стимулирующих сигналов может быть важным для создания мощного и длительного опосредованного Т-клетками

иммунного ответа. Т-клетки могут быстро ингибироваться и становиться невосприимчивыми к антигену. Хотя эффекты этих ко стимулирующих сигналов могут варьироваться, они в общем случае приводят к повышению генной экспрессии с целью создания долгоживущих, пролиферативных и антиапоптотических Т-клеток, которые мощно реагируют на антиген для его полного и постоянного устранения.

В контексте настоящего изобретения термин «антитело» означает не только молекулы интактных антител, но также фрагменты молекул антител, которые сохраняют способность связывать антиген. Такие фрагменты также хорошо известны в данной области техники и регулярно используются как *in vitro*, так и *in vivo*. Соответственно, в контексте настоящего изобретения термин «антитело» означает не только интактные молекулы иммуноглобулина, но также хорошо известные активные фрагменты F(ab')₂ и Fab. В F(ab')₂ и Fab-фрагментах отсутствует Fc-фрагмент интактного антитела, они быстрее выводятся из циркуляции и могут характеризоваться меньшим неспецифическим тканевым связыванием, чем интактное антитело (Wahl et al., *Nucl Med* (1983);24:316-325). В контексте настоящего изобретения они включают цельные нативные антитела, биспецифические антитела; химерные антитела; Fab, Fab', одноцепочечные фрагменты V-области (scFv), слитые полипептиды и нетрадиционные антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (в настоящем описании сокращенно называемой V_H) и константной области тяжелой цепи (C_H) region. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (в настоящем описании сокращенно называемой V_L) и константной области легкой цепи C_L. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, C_L. Области V_H и V_L можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами организма-хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

В контексте настоящего изобретения «CDR» определяют как аминокислотные последовательности определяющей комплементарности области антитела, которые представляют собой гипервариабельные области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. Смотрите, например, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4th U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987) или систему нумерации IMGT (Lefranc, *The Immunologist* (1999);7:132-136; Lefranc et al.,

Dev. Comp. Immunol. (2003);27:55-77). В общем случае антитела содержат три CDR или три области CDR тяжелой цепи и легкой цепи в вариабельной области. CDR обеспечивают большинство контактных остатков для связывания антитела с антигеном или эпитопом. В некоторых вариантах осуществления области CDR определены с использованием системы нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления области CDR определены с использованием системы нумерации IMGT, доступной на http://www.imgt.org/IMGT_vquest/input.

В контексте настоящего изобретения термин «одноцепочечный вариабельный фрагмент» или «scFv» представляет собой слитый белок из вариабельных областей тяжелой (V_H) и легкой цепей (V_L) иммуноглобулина (например, мышиного или человеческого), ковалентно связанных с образованием гетеродимера $V_H::V_L$. Тяжелая (V_H) и легкая цепи (V_L) соединены напрямую или с помощью кодирующего пептид линкера (например, 10, 15, 20, 25 аминокислот), который соединяет N-конец V_H с C-концом V_L или C-конец V_H с N-концом V_L . Линкер обычно обогащен глицином для гибкости, а также серином или треонином для стабильности. Линкер может связывать вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи внеклеточного антигенсвязывающего домена. Неограничивающие примеры линкеров описаны в Shen et al., *Anal. Chem.* 80(6):1910-1917 (2008) и WO 2014/087010, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой линкер G4S.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, которая приведена ниже:

GGGSGGGSGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 1]

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2, которая приведена ниже:

GGGSGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 2]

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3, которая приведена ниже:

GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 3]

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 4, которая приведена ниже:

GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 4]

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 5, которая приведена ниже:

GGGGS [SEQ ID NO: 5]

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 6, которая приведена ниже:

GGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 6]

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит первые три аминокислоты константной области тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 149, которая приведена ниже:

ASTGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 149]

Несмотря на удаление константных областей и внесение линкера белка scFv сохраняют специфичность оригинального иммуноглобулина. Антитела на основе одноцепочечного полипептида Fv можно экспрессировать из нуклеиновой кислоты, содержащей V_H- и V_L-кодирующие последовательности, как описано в Huston, et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, (1988);85:5879-5883; патентах США №№ 5091513, 5132405 и 4956778; и патентных публикация США №№ 20050196754 и 20050196754. Были описаны антагонистические scFv, обладающие ингибирующей активностью (смотрите, например, Zhao et al., *Hybridoma (Larchmt)* (2008);27(6):445-51; Peter et al., *J Cachexia Sarcopenia Muscle* (2012);August 12; Shieh et al., *J Immunol* (2009);183(4):2277-85; Giomarelli et al., *Thromb Haemost* (2007);97(6):955-63; Fife et al., *J Clin Invest* (2006);116(8):2252-61; Brocks et al., *Immunotechnology* 1997 3(3):173-84; Moosmayer et al., *Ther Immunol* 1995 2(10):31-40). Были описаны агонистические scFv, обладающие стимулирующей активностью (Peter et al., *J Biol Chem* (2003);25278(38):36740-7; Xie et al., *Nat Biotech* 1997 15(8):768-71; Ledbetter et al., *Crit Rev Immunol* (1997);17(5-6):427-55; Ho et al., *Biochim Biophys Acta* (2003);1638(3):257-66).

В контексте настоящего изобретения термин «химерный антигенный рецептор» или «CAR» относится к молекуле, содержащей внеклеточный антигенсвязывающий домен, слитый с внутриклеточным сигнальным доменом, которые способен активировать или стимулировать иммунореактивную клетку. В некоторых вариантах осуществления CAR также содержит трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR содержит scFv. scFv может быть получен путем слияния переменных областей тяжелой и легкой цепей антитела. В альтернативном или дополнительном варианте scFv может быть получен из Fab (а не из антитела, например, получен из библиотек Fab). В некоторых вариантах осуществления scFv слит с трансмембранным доменом, а затем с внутриклеточным сигнальным доменом.

Термин «химерный костимулирующий рецептор» или «CCR» относится к химерному рецептору, который связывается с антигеном и обеспечивает костимулирующие сигналы, но сам по себе не обеспечивает сигнал активации. CCR описан в Krause, et al., *J. Exp. Med.* (1998);188(4):619-626 и US20020018783, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки. CCR имитируют костимулирующие сигналы, но в отличие от CAR сами по себе не обеспечивают сигнал активации, например, в CCR отсутствует полипептид CD3ζ.

Под «практически идентичным» или «практически гомологичным» подразумевается, что полипептид или молекула нуклеиновой кислоты демонстрирует по меньшей мере приблизительно 50% гомологии или идентичности с эталонной аминокислотной последовательностью (например, любой из аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем описании) или эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты (например, любой из последовательностей нуклеиновых кислот, описанных в настоящем описании). В некоторых вариантах осуществления такая последовательность является по меньшей мере на приблизительно 60%, по меньшей мере на приблизительно 65%, по меньшей мере на приблизительно 70%, по меньшей мере на приблизительно 75%, по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 99% или по меньшей мере на приблизительно 100% гомологичной или идентичной последовательности аминокислот или нуклеиновых кислот, используемой для сравнения.

Идентичность последовательностей можно определять, используя программное обеспечение для анализа последовательностей (например, пакет программного обеспечения для анализа последовательностей от Genetics Computer Group, Центр биотехнологий Университета Висконсина, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, программы BLAST, BESTFIT, GAP или PILEUP/PRETTYBOX). Такое программное обеспечение позволяет сопоставлять идентичные или сходные последовательности, приписывая степень гомологии различным заменам, делециям и/или другим модификациям. Консервативные замены, как правило, включают замены в следующих группах: глицин, аланин; валин, изолейцин, лейцин; аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аспарагин, глутамин; серин, треонин; лизин, аргинин; и фенилаланин, тирозин. В типовом подходе для определения степени идентичности можно использовать программу BLAST с оценкой вероятности от e^{-3} до e^{-100} , которая указывает на близкородственную последовательность.

В контексте настоящего изобретения процент гомологии между двумя аминокислотными последовательностями является эквивалентным проценту идентичности между двумя последовательностями. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией от числа совпадающих позиций в последовательностях (т. е. $\% \text{ гомологии} = \text{число идентичных позиций} / \text{общее число позиций} \times 100$) с учетом числа гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо вносить для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществлять с помощью математического алгоритма.

Процент гомологии между двумя аминокислотными последовательностями можно определить, используя алгоритм E. Meyers и W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицу весов замен остатков PAM120, штраф за длину гэпа 12 и штраф за внесение гэпа 4. Кроме того, процент

гомологии между двумя аминокислотными последовательностями можно определить, используя алгоритм Needleman и Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступном на www.gcg.com), используя матрицу Blossum 62 или матрицу PAM250, вес гэта 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и вес длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В дополнительном или альтернативном варианте аминокислотные последовательности описанного в настоящем изобретении предмета изобретения дополнительно можно использовать в качестве «запрашиваемой последовательности» для проведения поиска по общедоступным базам данных, например, для определения родственных последовательностей. Такой поиск можно проводить, используя программу XBLAST (версия 2.0) по Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Белковый поиск BLAST можно проводить с помощью программы XBLAST, оценка=50, длина слова=3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных указанным последовательностям (например, последовательностям переменных областей тяжелой и легкой цепи scFv m903, m904, m905, m906 и m900), описанным в настоящем описании. Для получения выравнивания с внесенными в целях сравнения гэпами можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). «Эффективное количество» представляет собой количество, достаточное для достижения благоприятного или необходимого клинического результата после лечения. Эффективное количество можно вводить субъекту в одной или нескольких дозах. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество может представлять собой количество, достаточное для облегчения, смягчения, стабилизации, обращения или замедления прогрессирования заболевания или, в ином случае, уменьшения патологических последствий заболевания. Эффективное количество может быть определено врачом или в зависимости от случая и относится к компетенции в данной области техники. Как правило, при определении соответствующей дозировки для обеспечения эффективного количества учитывают несколько факторов. Эти факторы включают возраст, пол и массу субъекта, подлежащее лечению патологическое состояние, тяжесть патологического состояния и форму и эффективную концентрацию вводимых клеток.

В контексте настоящего изобретения термин «эндогенный» относится к молекуле нуклеиновой кислоты или полипептиду, которые обычно экспрессируются в клетке или ткани.

В контексте настоящего изобретения термин «экзогенный» относится к молекуле нуклеиновой кислоты или полипептиду, которые эндогенно не присутствуют в клетке. Следовательно, термин «экзогенный» включает любые рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты или полипептид, экспрессируемые в клетке, такие как чужеродные, гетерологичные и сверхэкспрессируемые молекулы нуклеиновых кислот и полипептиды. Под «экзогенной» нуклеиновой кислотой подразумевается нуклеиновая кислота, не

присутствующая в нативной клетке дикого типа; например, экзогенная нуклеиновая кислота может отличаться от эндогенного аналога по последовательности, по позиции/локации или и тому, и другому. В целях ясности, экзогенная нуклеиновая кислота может иметь такую же или отличную последовательность по сравнению с ее нативным эндогенным аналогом; она может быть внесена посредством генетической инженерии в саму клетку или ее предшественника и может быть необязательно связана с альтернативными контрольными последовательностями, такими как ненативная промоторная или секреторная последовательность.

Под «гетерологичными молекулой нуклеиновой кислоты или полипептидом» подразумеваются молекула нуклеиновой кислоты (например, молекула кДНК, ДНК или РНК) или полипептид, которые обычно не присутствуют в клетке или образце, полученном из клетки. Эта нуклеиновая кислота может быть получена из другого организма или она может, например, представлять собой молекулу мРНК, которая обычно не экспрессируется в клетке или образце.

Под «модуляцией» подразумевается положительное или отрицательное изменение. Типовые модуляции включают изменение на приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 25%, приблизительно 50%, приблизительно 75% или приблизительно 100%.

Под «повышением» подразумевается положительное изменение на по меньшей мере приблизительно 5%. Изменение может составлять приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 50%, приблизительно 75%, приблизительно 100% или более.

Под «снижением» подразумевается отрицательное изменение на по меньшей мере приблизительно 5%. Изменение может составлять приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 50%, приблизительно 75% или даже приблизительно 100%.

Термины «выделенный», «очищенный» или «биологически чистый» относятся к материалу, который не содержит в разной степени компонентов, которые обычно присутствуют вместе с ним в его нативном состоянии. Термин «выделять» обозначает степень отделения от исходного источника или окружения. «Очищать» обозначает степень отделения, большую чем при выделении. «Очищенный» или «биологически чистый» белок практически не содержит других материалов так, что любые примеси не оказывают материального влияния на биологические свойства белка или не вызывают другие нежелательных последствия. то есть, нуклеиновая кислота или пептид очищены, если они практически не содержат клеточный материал, вирусный материал или культуральную среду при получении с помощью технологий рекомбинантных ДНК, или химические предшественники или другие химические вещества при химическом синтезе. Чистоту и гомогенность обычно определяют, используя технологии аналитической химии, например, электрофорез в полиакриламидном геле или высокоэффективную жидкостную хроматографию. Термин «очищенный» может обозначать, что нуклеиновая кислота или

белок дают по существу одну полосу в электрофоретическом геле. В случае белка, который можно подвергать модификациям, например, фосфорилирования или гликозилирования, разные модификации могут приводить к получению разных выделенных белков, которые можно очищать по отдельности.

Под «выделенной клеткой» подразумевается клетка, которая отделена от молекулярных и/или клеточных компонентов, которые естественным образом присутствуют вместе с клеткой.

В контексте настоящего изобретения термин «антигенсвязывающий домен» относится к домену, способному специфически связывать конкретную антигенную детерминанту или группу антигенных детерминант, присутствующих в клетке.

Под «рецептором» подразумевается полипептид или его часть, присутствующие на клеточной мембране, которые селективно связывают один или более лигандов.

Под «сигнальной последовательностью» или «лидерной последовательностью» подразумевается пептидная последовательность (например, 5, 10, 15, 20, 25 или 30 аминокислот), присутствующая на N-конце синтезируемых белков, которая регулирует их попадание в секреторный путь.

Подразумевается, что термины «содержит», «содержащий» имеют широкое значение, приписываемое им патентным законодательством США, и могут означать «включает», «включающий» и т. п.

В контексте настоящего изобретения термин «лечение» относится к клиническому вмешательству в попытке изменить течение заболевания у индивида или в клетке, которые подвергают лечению, и может проводиться для профилактики или в процессе течения клинической патологии. Терапевтические эффекты лечения включают, без ограничения, предотвращение возникновения или рецидива заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или смягчение болезненного состояния, а также ремиссию или улучшение прогноза. За счет предотвращения прогрессирования заболевания или расстройства лечение может позволить предотвратить истощение вследствие расстройства у пораженного или диагностированного субъекта или субъекта, предположительно имеющего расстройство, но также лечение может предотвращать появление расстройства или симптома расстройства у субъекта, подверженного риску расстройства или предположительно имеющего расстройство.

В настоящем описании «индивид» или «субъект» представляет собой позвоночное, такое как человек или отличное от человека животное, например, млекопитающее. Млекопитающие включают, но не ограничиваются этим, людей, приматов, сельскохозяйственных животных, спортивных животных, грызунов и домашних животных. Неограничивающие примеры отличных от человека животных-субъектов включают грызунов, таких как мыши, крысы, хомяки и морские свинки; кроликов; собак; кошек; овец; свиней; коз; крупный рогатый скот; лошадей и отличных от человека приматов, таких как

обезьяны и макаки.

В контексте настоящего изобретения термин «консервативная модификация последовательности» относится к аминокислотной модификации, которая в значительной степени не влияет на характеристики описанных в настоящем изобретении химерных рецепторов, содержащих аминокислотную последовательность, или не меняет их. Консервативные модификации могут включать аминокислотные замены, добавления и делеции. Модификации можно вносить во внеклеточный антигенсвязывающий домен описанных в настоящем изобретении химерных рецепторов с помощью стандартных технологий, известных в данной области техники, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Аминокислоты можно классифицировать на группы в соответствии с их физико-химическими свойствами, такими как заряд и полярность. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, в которых аминокислотный остаток замещают аминокислотой в пределах одной группы. Например, аминокислоты можно классифицировать по заряду: положительно заряженные аминокислоты включают лизин, аргинин, гистидин, отрицательно заряженные аминокислоты включают аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, нейтрально заряженные аминокислоты включают аланин, аспарагин, цистеин, глутамин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин. Кроме того, аминокислоты можно классифицировать по полярности: полярные аминокислоты включают аргинин (основная полярная), аспарагин, аспарагиновую кислоту (кислая полярная), глутаминовую кислоту (кислая полярная), глутамин, гистидин (основная полярная), лизин (основная полярная), серин, треонин и тирозин; неполярные аминокислоты включают аланин, цистеин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан и валин. Таким образом, один или более аминокислотных остатков в области CDR можно заменять другими аминокислотными остатками из той же группы и исследовать измененное антитело в отношении сохранения функции (т. е. функций, приведенных в (с)-(l) выше), используя функциональные анализы описанные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изменяют не более одного, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти остатков в указанной последовательности или области CDR.

Другие аспекты описанного в настоящем изобретении предмета изобретения описаны далее и находятся в рамках описанного в настоящем изобретении предмета изобретения.

5.2. Химерные рецепторы

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении химерный рецептор содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с ADGRE2 или CLEC12A. Внеклеточный антигенсвязывающий домен может представлять собой антигенсвязывающий фрагмент антитела, антигенсвязывающий фрагмент вариабельной области тяжелой цепи (V_H) антитела, антигенсвязывающий фрагмент вариабельной области легкой цепи (V_L) антитела, одноцепочечный вариабельный

фрагмент (scFv), Fab или F(ab)₂. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления scFv представляет собой человеческий scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv представляет собой гуманизированный scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv представляет собой мышинный scFv. В некоторых вариантах осуществления Fab является перекрестно связанным.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении химерный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении химерный рецептор представляет собой химерный костимулирующий рецептор (CCR). В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор представляет собой TCR-подобную слитую молекулу.

5.2.1. Химерный антигенный рецептор (CAR)

В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор представляет собой CAR. CAR представляют собой сконструированные рецепторы, которые прививают или придают представляющую интерес специфичность иммунной эффекторной клетке. CAR можно использовать для прививания специфичности моноклонального антитела Т-клетке с облегчением переноса их кодирующей последовательности ретровирусными векторами.

Существует три поколения CAR. CAR «первого поколения», как правило, состоят из внеклеточного антигенсвязывающего домена (например, scFv), который слит с трансмембранным доменом, который слит с цитоплазматическим/внутриклеточным сигнальным доменом. CAR «первого поколения» могут обеспечивать *de novo* распознавание антигена и приводить к активации как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клеток посредством своего сигнального домена цепи CD3ζ в одной слитой молекуле, независимо от HLA-опосредованной презентации антигена. В CAR «второго поколения» добавлены внутриклеточные сигнальные домены из различных костимулирующих молекул (например, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40) к цитоплазматическому концу CAR для обеспечения дополнительных сигналов Т-клетке. CAR «второго поколения» включают те, которые обеспечивают как костимуляцию (например, CD28 или 4-1BB), так и активацию (CD3ζ). CAR «третьего поколения» включают те, которые обеспечивают множественную костимуляцию (например, CD28 и 4-1BB) и активацию (CD3ζ). В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор представляет собой CAR второго поколения. В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор представляет собой CAR, который содержит внутриклеточный домен костимулирующей молекулы или его фрагмент.

5.2.1.1. Внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления scFv представляет собой человеческий scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv представляет собой гуманизированный scFv. В некоторых

вариантах осуществления scFv представляет собой мышинный scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv идентифицируют путем скрининга фаговой библиотеки scFv со слитым белком антиген-Fc.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления Fab является перекрестно связанным. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой F(ab)₂. Любая из вышеприведенных молекул может находиться в слитом белке с гетерологичной последовательностью с образованием внеклеточного антигенсвязывающего домена.

Связывание внеклеточного антигенсвязывающего домена химерного рецептора, например CAR, можно подтвердить, например, с помощью ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), радиоиммуноанализа (РИА), анализа FACS, биоанализа (например, ингибирования роста) или вестерн-блоттинга. Каждый из этих анализов в общем случае позволяет выявлять наличие представляющих особый интерес комплексов «белок-антитело» путем использования меченого реагента (например, антитела или scFv), специфического в отношении представляющего интерес комплекса. Например, scFv можно радиоактивно метить и использовать в радиоиммуноанализе (РИА) (смотрите, например, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassay, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, которая включена в данный документ посредством ссылки). Радиоактивный изотоп можно выявлять с помощью таких средств, как применение γ -счетчика или сцинтилляционного счетчика или автордиографии. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CAR метят флуоресцентным маркером. Неограничивающие примеры флуоресцентных маркеров включают зеленый флуоресцентный белок (ЗФБ), синий флуоресцентный белок (например, EBFP, EBFP2, Azurite и mKalamal), голубой флуоресцентный белок (например, ECFP, Cerulean и CyPet) и желтый флуоресцентный белок (например, YFP, Citrine, Venus и YPet).

5.2.1.2. Трансмембранный домен CAR

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит гидрофобную альфа-спираль, которая проходит по меньшей мере через часть мембраны. Разные трансмембранные домены приводят к разной стабильности рецептора. После распознавания антигена рецепторы кластеризуются и происходит передача сигнала в клетку. В соответствии с описанным в настоящем описании предметом изобретения трансмембранный домен CAR может содержать нативный или модифицированный трансмембранный домен CD8 или его фрагмент, нативный или модифицированный трансмембранный домен CD28 или его фрагмент, нативный или модифицированный трансмембранный домен CD3 ζ или его фрагмент, нативный или модифицированный трансмембранный домен CD4 или его фрагмент, нативный или модифицированный трансмембранный домен 4-1BB или его фрагмент, нативный или модифицированный трансмембранный домен OX40 или его фрагмент, нативный или модифицированный

трансmemбранный домен ICOS или его фрагмент, нативный или модифицированный трансmemбранный домен CD84 или его фрагмент, нативный или модифицированный трансmemбранный домен CD166 или его фрагмент, нативный или модифицированный трансmemбранный домен CD8a или его фрагмент, нативный или модифицированный трансmemбранный домен CD8b или его фрагмент, нативный или модифицированный трансmemбранный домен ICAM-1 или его фрагмент, нативный или модифицированный трансmemбранный домен CTLA-4 или его фрагмент, нативный или модифицированный трансmemбранный домен CD27 или его фрагмент, нативный или модифицированный трансmemбранный домен CD40 или его фрагмент, NKGD2 или его фрагмент или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления трансmemбранный домен CAR содержит полипептид CD8 (например, трансmemбранный домен CD8 или его фрагмент).

В некоторых вариантах осуществления трансmemбранный домен CAR содержит полипептид CD8 (например, трансmemбранный домен CD8 или его фрагмент). В некоторых вариантах осуществления трансmemбранный домен CAR содержит полипептид CD8 (например, трансmemбранный домен CD8 человека или его фрагмент). В некоторых вариантах осуществления полипептид CD8 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является по меньшей мере на приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, имеющей референтный номер NCBI №: NP_001139345.1 (SEQ ID NO: 7), или ее фрагмента, и/или может необязательно содержать до одной, или до двух, или до трех консервативных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления полипептид CD8 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая представляет собой консервативную часть SEQ ID NO: 7, которая имеет длину по меньшей мере приблизительно 20, или по меньшей мере приблизительно 30, или по меньшей мере приблизительно 40, или по меньшей мере приблизительно 50, по меньшей мере приблизительно 60, по меньшей мере приблизительно 70 и до приблизительно 235 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептид CD8 содержит или состоит из аминокислот от 1 до 235, от 1 до 50, от 50 до 100, от 100 до 150, от 150 до 200, от 137 до 207 или от 200 до 235 из SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления трансmemбранный домен CAR содержит полипептид CD8, содержащий или состоящий из аминокислот от 137 до 207 из SEQ ID NO: 7. SEQ ID NO: 7 приведена ниже.

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKQCQVLLSNPTSGCS
WLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYF
CSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR
GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSLSARY
V [SEQ ID NO: 7]

Типовая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислоты от 137 до

207 из SEQ ID NO: 7, приведена в SEQ ID NO: 8, которая приведена ниже.

Сссaccacgacgccagcgcgccgaccaccaaccccgccgcccacgatcgcgctgcagcccctgtccctgcgcccagagg
cgtgccggccagcggcgggggcgagtgacacagaggggctggacttcgcctgtgatctacatctggcgcccctggccgggac
ttgtggggctcttctcctgtcactgggtatcaccccttactgcaac [SEQ ID NO: 8]

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит полипептид CD8 (например, трансмембранный домен CD8 мышцы или его фрагмент). В некоторых вариантах осуществления полипептид CD8 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является по меньшей мере на приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, имеющей референтный номер NCBI №: AAA92533.1 (SEQ ID NO: 9), или ее фрагмента, и/или может необязательно содержать до одной, или до двух, или до трех консервативных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления полипептид CD8 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая представляет собой непрерывную часть SEQ ID NO: 9, которая имеет длину по меньшей мере приблизительно 20, или по меньшей мере приблизительно 30, или по меньшей мере приблизительно 40, или по меньшей мере приблизительно 50, или по меньшей мере приблизительно 60, или по меньшей мере приблизительно 70, или по меньшей мере приблизительно 100, или по меньшей мере приблизительно 200 и до приблизительно 247 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептид CD8 содержит или состоит из аминокислот от 1 до 247, от 1 до 50, от 50 до 100, от 100 до 150, от 150 до 200, от 151 до 219 или от 200 до 247 из SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит полипептид CD8, содержащий или состоящий из аминокислот от 151 до 219 из SEQ ID NO: 9. SEQ ID NO: 9 приведена ниже.

1 MASPLTRFLS LNLLMGESI ILGSGEAKPQ APELRIFPKK MDAELGQKVD
LVCEVLGVS

61 QGCSWLFQNS SSKLPQPTFV VYMASSHNI TWDEKLNSSK LFAVRDTNN
KYVLTNLKFS

121 KENEGYYFCS VISNSVMYFS SVVPVLQKVN STTKPVLRT PSPVHPTGTS
QPQRPEDCRP

181 RGSVKGTGLD FACDIYIWAQ LAGICVAPLL SLITLICYN RSRKRVCKCP
RPLVRQEGKP

241 RPSEKIV [SEQ ID NO: 9]

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен описанного в настоящем описании CAR содержит полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 или его фрагмент).

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 человека или его фрагмент). В некоторых вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из

аминокислотной последовательности, которая является по меньшей мере на приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, имеющей референтный номер NCBI №: NP_006130 (SEQ ID NO: 10), или ее фрагмента, и/или может необязательно содержать до одной, или до двух, или до трех консервативных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая представляет собой непрерывную часть SEQ ID NO: 10, которая имеет длину по меньшей мере приблизительно 20, или по меньшей мере приблизительно 30, или по меньшей мере приблизительно 40, или по меньшей мере приблизительно 50 и до приблизительно 220 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из аминокислот от 1 до 220, от 1 до 50, от 50 до 100, от 100 до 150, от 150 до 200, от 153 до 179 или от 200 до 220 из SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит полипептид CD28, содержащий или состоящий из аминокислот от 153 до 179 из SEQ ID NO: 10. SEQ ID NO: 10 приведена ниже:

1 MLRLLLALNL FPSIQVTG NK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE
FRASLHKGLD

61 SAVEVCVVY G NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY
FCKIEVMYPP

121 PYLDNEKSNG TTHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLV
TVAFPIFWVR

181 SKRSRLHSD YMNMTPRRPG PTRKHYPYA PPRDFAAYRS [SEQ ID NO: 10]

Типовая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислоты от 153 до 179 из SEQ ID NO: 10, приведена в SEQ ID NO: 11, которая приведена ниже.

ttttgggtgctgggtggtggtggtgagtcctggctgctatagctgctagtaacagtgcccttatttttctgggtg [SEQ ID
NO: 11]

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 мыши или его фрагмент). В некоторых вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является по меньшей мере на приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, имеющей референтный номер NCBI №: NP_031668.3 (SEQ ID NO: 12), или ее фрагмента, и/или может необязательно содержать до одной, или до двух, или до трех консервативных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая представляет собой непрерывную часть SEQ ID NO: 12, которая имеет длину по меньшей мере приблизительно 20, или по меньшей мере приблизительно 30, или по меньшей мере приблизительно 40, или

по меньшей мере приблизительно 50 и до приблизительно 218 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из аминокислот от 1 до 220, от 1 до 50, от 50 до 100, от 100 до 150, от 150 до 200, от 151 до 177 или от 200 до 218 из SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен CAR содержит полипептид CD28, содержащий или состоящий из аминокислот от 151 до 177 из SEQ ID NO: 12. SEQ ID NO: 12 приведена ниже:

1 MTLRLLFLAL NFFSVQVTEN KILVKQSPLL VVDSNEVSLS CRYSYNLLAK
EFRASLYKGV

61 NSDVEVCVGN GNFTYQPQFR SNAEFNCDGD FNETVTFRL WNLHVNHTDI
YFCKIEFMYP

121 PPYLDNERSN GTPIIKEKH LCHTQSSPKL FWALVVVAGV LFCYGLLVTV
ALCVIWTNSR

181 RNRLQLSDYM NMTPRRPGLT RKPYPYAPA RDFAAAYRP [SEQ ID NO: 12]

В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит спейсерную область, которая связывает внеклеточный антигенсвязывающий домен с трансмембранным доменом. Спейсерная область должна быть достаточно гибкой, чтобы антигенсвязывающий домен мог ориентироваться в разных направлениях для облегчения распознавания антигена, сохраняя при этом активирующую активность CAR.

В некоторых вариантах осуществления шарнирная/спейсерная область CAR содержит нативную или модифицированную шарнирную область CD8 или ее фрагмент, нативную или модифицированную шарнирную область CD28 или ее фрагмент, нативную или модифицированную шарнирную область CD3 ζ или ее фрагмент, нативную или модифицированную шарнирную область CD40 или ее фрагмент, нативную или модифицированную шарнирную область 4-1BB или ее фрагмент, нативную или модифицированную шарнирную область OX40 или ее фрагмент, нативную или модифицированную шарнирную область CD84 или ее фрагмент, нативную или модифицированную шарнирную область CD166 или ее фрагмент, нативную или модифицированную шарнирную область CD8a или ее фрагмент, нативную или модифицированную шарнирную область CD8b или ее фрагмент, нативную или модифицированную шарнирную область ICOS или ее фрагмент, нативную или модифицированную шарнирную область ICAM-1 или ее фрагмент, нативную или модифицированную шарнирную область CTLA-4 или ее фрагмент, нативную или модифицированную шарнирную область CD27 или ее фрагмент, нативную или модифицированную шарнирную область CD40 или ее фрагмент, нативную или модифицированную шарнирную область NKG2D или ее фрагмент, синтетический полипептид (не на основе белка, связанного с иммунным ответом) или их комбинацию. Шарнирная/спейсерная область может представлять собой шарнирную область из IgG1, или область CH₂CH₃ иммуноглобулина и части CD3, часть полипептида CD28 (например, часть SEQ ID NO: 10 или 12), часть полипептида CD8 (например, часть SEQ ID NO: 7 или 9), вариацию любого из вышеперечисленного, которая является по меньшей мере на

приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95% или по меньшей мере на приблизительно 100% гомологичной или идентичной им, или синтетическую спейсерную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления шарнирная/спейсерная область CAR содержит полипептид CD28. В некоторых вариантах осуществления шарнирная/спейсерная область CAR содержит полипептид CD28, содержащий или состоящий из аминокислот от 114 до 152 из SEQ ID NO: 10.

Типовая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислоты от 114 до 152 из SEQ ID NO: 10, приведена в SEQ ID NO: 13, которая приведена ниже.

attgaagtatgtatcctcctctacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaaacaccttgtcca agtcccctatttcccggaccttctaagccc [SEQ ID NO: 13]

5.2.1.3. Внутриклеточный сигнальный домен CAR

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит полипептид CD3 ζ . CD3 ζ может активировать или стимулировать клетку (например, клетку лимфоидной линии дифференцировки, например, Т-клетку). CD3 ζ дикого типа («нативный») содержит три функциональных иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов (ITAM), три функциональных богатых основаниями (BRS) области (BRS1, BRS2 и BRS3). CD3 ζ передает сигнал активации в клетку (например, клетку лимфоидной линии дифференцировки, например, Т-клетку) после связывания антигена. Внутриклеточный сигнальный домен CD3 ζ -цепи является первичным переносчиком сигналов от эндогенных TCR.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит нативный CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления нативный полипептид CD3 ζ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является по меньшей мере на приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, имеющей референтный номер NCBI №: NP_932170 (SEQ ID NO: 14), или ее фрагмента, и/или может необязательно содержать до одной, или до двух, или до трех консервативных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления нативный полипептид CD3 ζ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая представляет собой непрерывную часть SEQ ID NO: 14, которая имеет длину по меньшей мере приблизительно 20, или по меньшей мере приблизительно 30, или по меньшей мере приблизительно 40, или по меньшей мере приблизительно 50, или по меньшей мере приблизительно 100, или по меньшей мере приблизительно 110 и до приблизительно 164 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления нативный полипептид CD3 ζ содержит или состоит из аминокислот от 1 до 164, от 1 до 50, от 50 до 100, от 52 до 164, от 100 до 150 или от 150 до 164 из SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления

внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит полипептид CD3 ζ , содержащий или состоящий из аминокислот от 52 до 164 из SEQ ID NO: 14. SEQ ID NO: 14 приведена ниже:

1 MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF
LRVKFSRSAD

61 APAYQQGQNNQ LYNELNLGRR EEYDVLDKRR GRDPEMGGKP
QRRKNPQEGL YNELQKDKMA

121 EAYSEIGMKG ERRRGKGHGDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR [SEQ ID
NO: 14]

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит модифицированный полипептид CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид CD3 ζ содержит один, два или три ITAM. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид CD3 ζ содержит нативный ITAM1. В некоторых вариантах осуществления нативный ITAM1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 15.

QNQLYNELNLGRREEYDVLDKR [SEQ ID NO: 15]

Типовая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, приведена в SEQ ID NO: 16, которая приведена ниже.

Caгаaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtagcatgttttgacaagaga [SEQ ID NO: 16]

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид CD3 ζ содержит вариант ITAM1, содержащий одну или более мутаций с потерей функции. В некоторых вариантах осуществления вариант ITAM1 содержит или состоит из двух мутаций с потерей функции. В некоторых вариантах осуществления каждая из одной или более (например, двух) мутаций с потерей функции содержит мутацию остатка тирозина в ITAM1. В некоторых вариантах осуществления вариант ITAM1 состоит из двух мутаций с потерей функции. В некоторых вариантах осуществления вариант ITAM1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 17, которая приведена ниже.

QNQLFNELNLGRREEFDVLDKR [SEQ ID NO: 17]

Типовая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, приведена в SEQ ID NO: 18, которая приведена ниже.

CAGAACCAGCTCTTTAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTTCGATG
TTTTGGACAAGAGA [SEQ ID NO: 18]

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид CD3 ζ содержит нативный ITAM2. В некоторых вариантах осуществления нативный ITAM2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 19, которая приведена ниже.

QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK [SEQ ID NO: 19]

Типовая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, приведена в SEQ ID NO: 20, которая приведена ниже.

CAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC

AGTGAGATTGGGATGAAA [SEQ ID NO: 20]

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид CD3 ζ содержит вариант ITAM2. В некоторых вариантах осуществления вариант ITAM2 содержит или состоит из одной или более мутаций с потерей функции. В некоторых вариантах осуществления вариант ITAM2 содержит или состоит из двух мутаций с потерей функции. В некоторых вариантах осуществления каждая из одной или более (например, двух) мутаций с потерей функции содержит мутацию остатка тирозина в ITAM2. В некоторых вариантах осуществления вариант ITAM2 состоит из двух мутаций с потерей функции. В некоторых вариантах осуществления вариант ITAM2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 21, которая приведена ниже.

QEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMK [SEQ ID NO: 21]

Типовая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, приведена в SEQ ID NO: 22, которая приведена ниже.

Caggaaggcctgttcaatgaactgcagaaagataagatggcggaggccttcagtgagattgggatgaaa [SEQ ID NO: 22]

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид CD3 ζ содержит нативный ITAM3. В некоторых вариантах осуществления нативный ITAM3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 23, которая приведена ниже.

HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ [SEQ ID NO: 23]

Типовая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, приведена в SEQ ID NO: 24, которая приведена ниже.

CACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAG [SEQ ID NO: 24]

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид CD3 ζ содержит вариант ITAM3. В некоторых вариантах осуществления вариант ITAM3 содержит или состоит из двух мутаций с потерей функции. В некоторых вариантах осуществления каждая из одной или более (например, двух) мутаций с потерей функции содержит мутацию остатка тирозина в ITAM3. В некоторых вариантах осуществления вариант ITAM3 содержит или состоит из двух мутаций с потерей функции. В некоторых вариантах осуществления вариант ITAM3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 25, которая приведена ниже.

HDGLFQGLSTATKDTFDALHMQ [SEQ ID NO: 25]

Типовая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, приведена в SEQ ID NO: 26, которая приведена ниже.

Cacgatggcctttccagggtctcagtacagccaccaaggacaccttcgacgcccttcacatgcag [SEQ ID NO: 26]

Различные модифицированные полипептиды CD3 ζ и CAR, содержащие модифицированные полипептиды CD3 ζ , описаны в публикации международной патентной заявки № WO2019/133969, которая в полном объеме включена в данный документ

посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит модифицированный полипептид CD3 ζ , содержащий нативный ITAM1, вариант ITAM2, содержащий или состоящий из одной или более (например, двух) мутаций с потерей функции, и вариант ITAM3, содержащий или состоящий из одной или более (например, двух) мутаций с потерей функции. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит модифицированный полипептид CD3 ζ , содержащий нативный ITAM1, вариант ITAM2, состоящий из двух мутаций с потерей функции, и вариант ITAM3, состоящий из двух мутаций с потерей функции. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит модифицированный полипептид CD3 ζ , содержащий нативный ITAM1, состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 15, вариант ITAM2, состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 21, и вариант ITAM3, состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид CD3 ζ обозначен «1XX». В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид CD3 ζ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 27. SEQ ID NO: 27 приведена ниже.

RVKFSRSADA PAYQQGQNQL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPEMGGKPR
RKNPQEGLFN ELQKDKMAEA FSEIGMKGER RRGKGHDGLF QGLSTATKDT
FDALHMQALP PR [SEQ ID NO: 27]

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит модифицированный полипептид CD3 ζ , содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98% или по меньшей мере на приблизительно 99%, по меньшей мере на приблизительно 100% идентичной SEQ ID NO: 27, или ее фрагмента, и/или может необязательно содержать до одной, или до двух, или до трех консервативных аминокислотных замен.

Типовая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, приведена в SEQ ID NO: 28, которая приведена ниже.

agagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctagga
cgaagagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaacctcaggaa
ggcctgttcaatgaactgcagaaaataagatggcggaggccttcagtgcagattgggatgaaaggcagcgcggaggggcaaggggc
acgatggcctttccagggtctcagtagcagccaccaaggacaccttcagcgccttcacatgcagggcctgccccctcgc [SEQ ID
NO: 28]

В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CAR второго поколения. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен

CAR дополнительно содержит по меньшей мере одну костимулирующую сигнальную область. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область содержит внутриклеточный домен по меньшей мере одной костимулирующей молекулы или его фрагмент.

В контексте настоящего изобретения «костимулирующая молекула» относится к молекуле клеточной поверхности, отличной от антигенного рецептора или его лиганда, которая может обеспечивать эффективный ответ лимфоцитов на антиген. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая молекула может обеспечивать оптимальную активацию лимфоцитов. Неограничивающие примеры костимулирующих молекул включают CD28, 4-1BB, OX40, ICOS, DAP-10, CD27, CD40 и NKGD2. Костимулирующая молекула может связываться с костимулирующим лигандом, который представляет собой белок, экспрессируемый на поверхности клетки, который после связывания со своим рецептором обеспечивает костимулирующий ответ, т. е. внутриклеточный ответ, который воздействует на стимуляцию, когда химерный рецептор (например, химерный антигенный рецептор (CAR)) связывается со своим антигеном-мишенью. Как пример, лиганд 4-1BB (т. е. 4-1BBL) может связываться с 4-1BB для обеспечения внутриклеточного сигнала, который в комбинации с сигналом CAR индуцирует эффекторную клеточную функцию CAR⁺ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит костимулирующую сигнальную область, которая содержит полипептид CD28, например, внутриклеточный домен CD28 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98% или по меньшей мере на приблизительно 99%, по меньшей мере на приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 10, или ее фрагмента, и/или может необязательно содержать до одной, или до двух, или до трех консервативных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая представляет собой непрерывную часть SEQ ID NO: 10, которая имеет длину по меньшей мере приблизительно 20, или по меньшей мере приблизительно 30, или по меньшей мере приблизительно 40, или по меньшей мере приблизительно 50 и до приблизительно 220 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из аминокислот от 1 до 220, от 1 до 50, от 50 до 100, от 100 до 150, от 114 до 220, от 150 до 200, от 180 до 220 или от 200 до 220 из SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит костимулирующую сигнальную область, которая содержит полипептид CD28, содержащий или состоящий из аминокислот от 180 до 220 из

SEQ ID NO: 10.

Типовая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислоты от 180 до 220 из SEQ ID NO: 10, приведена в SEQ ID NO: 29, которая приведена ниже. Aggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggccccaccgcaagcattaccagccct atgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctcc [SEQ ID NO: 29]

В некоторых вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98% или по меньшей мере на приблизительно 99%, по меньшей мере на приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12, или ее фрагмента, и/или может необязательно содержать до одной, или до двух, или до трех консервативных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая представляет собой непрерывную часть SEQ ID NO: 12, которая имеет длину по меньшей мере приблизительно 20, или по меньшей мере приблизительно 30, или по меньшей мере приблизительно 40, или по меньшей мере приблизительно 50 и до 218 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептид CD28 содержит или состоит из аминокислот от 1 до 218, от 1 до 50, от 50 до 100, от 100 до 150, от 150 до 218, от 178 до 218 или от 200 до 218 из SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область описанного в настоящем изобретении CAR содержит полипептид CD28, который содержит или состоит из аминокислот от 178 до 218 из SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит ко-стимулирующую сигнальную область, которая содержит полипептид 4-1BB, например, внутриклеточный домен 4-1BB или его фрагмент (например, внутриклеточный домен 4-1BB человека или его фрагмент). Полипептид 4-1BB может содержать или состоять из аминокислотной последовательности, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98% или по меньшей мере на приблизительно 99%, по меньшей мере на приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, имеющей NCBI Ref. №: NP_001552 (SEQ ID NO: 30), или ее фрагмента, и/или может необязательно содержать до одной, или до двух, или до трех консервативных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления полипептид 4-1BB содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая представляет собой непрерывную часть SEQ ID NO: 30, которая имеет длину по меньшей мере приблизительно 20, или по меньшей мере приблизительно 30, или по меньшей мере

приблизительно 40, или по меньшей мере приблизительно 50, или по меньшей мере приблизительно 100, или по меньшей мере приблизительно 150, или по меньшей мере приблизительно 150 и до приблизительно 255 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептид 4-1BB содержит или состоит из аминокислот от 1 до 255, от 1 до 50, от 50 до 100, от 100 до 150, от 150 до 200, от 200 до 255 или от 214 до 255 из SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит костимулирующую сигнальную область, которая содержит полипептид 4-1BB, содержащий или состоящий из аминокислот от 214 до 255 из SEQ ID NO: 30. SEQ ID NO: 30 приведена ниже.

1 MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP
NSFSSAGGQR

61 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ
ELTKKGCKDC

121 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS
SVTPPAPARE

181 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR
PVQTTQEEDG

241 CSCRFPEEEE GGCEL [SEQ ID NO: 30]

Типовая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислоты от 214 до 255 из SEQ ID NO: 30, приведена в SEQ ID NO: 31, которая приведена ниже.

aaacggggcagaagaagctcctgtatatattcaaacaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgta
gctgccgattccagaagaagaaggaggatgtgaactg [SEQ ID NO: 31]

В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR содержит костимулирующую сигнальную область, которая содержит внутриклеточные домены двух или более костимулирующих молекул или их части, например, внутриклеточный домен CD28 или его фрагмент и внутриклеточный домен 4-1BB или его фрагмент, или внутриклеточный домен CD28 или его фрагмент и внутриклеточный домен OX40 или его фрагмент.

5.2.2. Химерный костимулирующий рецептор (CCR)

В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор представляет собой CCR. Описанный в настоящем изобретении CCR связывается с антигеном (например, ADGRE2 или CLEC12A) и обеспечивает костимулирующие сигналы, но сам по себе не обеспечивает сигнал активации. В некоторых вариантах осуществления CCR не содержит полипептид CD3 ζ . CCR обеспечивают костимуляцию, например CD28-подобный сигнал, в отсутствие естественного костимулирующего лиганда на антигенпрезентирующей клетке. Комбинированное распознавание антигена, т. е. использование CCR в комбинации с CAR, может повысить реактивность Т-клеток против экспрессирующих двойной антиген Т-клеток, тем самым улучшая селективное нацеливание на опухоль. Kloss et al. описывают стратегию, в которой объединены комбинированное распознавание антигена, расщепление сигнализации и, что важно, сбалансированная сила активации и костимуляции Т-клеток,

для создания Т-клеток, которые устраняют клетки-мишени, которые экспрессируют комбинацию антигенов, и при этом не затрагивают клетки, которые экспрессируют каждый антиген отдельно (Kloss et al., *Nature Biotechnology* (2013);31(1):71-75, содержание которой в полном объеме включено посредством ссылки). При таком подходе для активации Т-клеток необходимо CAR-опосредованное распознавание одного антигена, тогда как костимуляция независимо опосредована CCR, специфическим в отношении второго антигена. Для достижения опухолевой селективности в подходе комбинированного распознавания антигена уменьшена эффективность активации Т-клеток до уровня, когда она является неэффективной без поддержки, обеспечиваемой одновременным распознаванием CCR второго антигена.

В некоторых вариантах осуществления CCR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном (например, ADGRE2 или CLEC12A), трансмембранный домен и костимулирующую сигнальную область, которая содержит внутриклеточный домен по меньшей мере одной костимулирующей молекулы или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления CCR сам по себе не доставляет сигнал активации в иммунореактивную клетку. Неограничивающие примеры костимулирующих молекул включают CD28, 4-1BB, OX40, ICOS, DAP-10, CD27, CD40 и NKGD2. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область CCR содержит внутриклеточный домен костимулирующей сигнальной молекулы или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления одна костимулирующая сигнальная молекула представляет собой CD28. В некоторых вариантах осуществления одна костимулирующая сигнальная молекула представляет собой 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область CCR содержит внутриклеточный домен первой костимулирующей сигнальной молекулы или его фрагмент и внутриклеточный домен второй костимулирующей сигнальной молекулы или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая костимулирующие сигнальные молекулы представляют собой CD28 и 4-1BB.

Аналогично CAR, внеклеточный антигенсвязывающий домен CCR может представлять собой scFv, Fab, F(ab)₂ или слитый белок с гетерологичной последовательностью для образования внеклеточного антигенсвязывающего домена CCR.

5.2.3. TCR-подобные слитые молекулы

В некоторых вариантах осуществления химерный рецептор представляет собой TCR-подобную слитую молекулу. Неограничивающие примеры слитых молекул TCR включают HLA-независимый химерный антигенный рецептор на основе TCR (также известный как «HIT-CAR», например, описанные в международной патентной заявке № PCT/US19/017525, которая в полном объеме включена посредством ссылки), слитые конструкции Т-клеточного рецептора (TRuC) (например, описанные в Baeuerle et al., “Synthetic TRuC receptors engaging the complete T cell receptor for potent anti-tumor response,” *Nature Communications* volume 10, Article number: 2087 (2019), которая в полном объеме включена посредством ссылки), синтетический Т-клеточный рецептор и антигенный

рецептор (STAR) (например, описанные в Liu et al. *Science Translational Medicine* (2021);13(586):eabb5191, которая в полном объеме включена посредством ссылки), антитело-Т-клеточный рецептор (AbTCR) (например, описанные в Xu et al. *Cell Discovery* (2018) 4:62, которая в полном объеме включена посредством ссылки) и средство сопряжения Т-клеточного антигена (ТАС) (например, описанные в Helsen et al. *Nature Communications* (2018);9:3049, которая в полном объеме включена посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления TCR-подобная слитая молекула содержит антигенсвязывающую цепь, которая содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен и константный домен, при этом TCR-подобная слитая молекула связывается с антигеном HLA-независимым образом. В некоторых вариантах осуществления константный домен содержит константную область Т-клеточного рецептора, выбранную из группы, состоящей из нативного или модифицированного полипептида TRAC, нативного или модифицированного полипептида TRBC, нативного или модифицированного полипептида TRDC, нативного или модифицированного полипептида TRGC и любых их вариантов или функциональных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления константный домен содержит нативный или модифицированный полипептид TRAC. В некоторых вариантах осуществления константный домен содержит нативный или модифицированный полипептид TRBC. В некоторых вариантах осуществления константный домен способен образовывать гомодимер или гетеродимер с другим константным доменом. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая цепь способна к ассоциации с полипептидом CD3 ζ . В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающая цепь после связывания с антигеном (например, ADGRE2 или CLEC12A) способна активировать полипептид CD3 ζ , ассоциированный с антигенсвязывающей цепью. В некоторых вариантах осуществления активация полипептида CD3 ζ может активировать иммунореактивную клетку. В некоторых вариантах осуществления TCR-подобная слитая молекула способна к объединению с комплексом CD3 и обеспечению HLA-независимого распознавания антигена. В некоторых вариантах осуществления TCR-подобная слитая молекула замещает эндогенный TCR в комплексе CD3/TCR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен TCR-подобной слитой молекулы способен к димеризации с другим внеклеточным антигенсвязывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен TCR-подобной слитой молекулы содержит лиганд для рецептора клеточной поверхности, рецептор для лиганда клеточной поверхности, антигенсвязывающую часть антитела или его фрагмента или антигенсвязывающую часть TCR. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен TCR-подобной слитой молекулы содержит одну или две переменные области иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен TCR-подобной слитой молекулы содержит переменную область тяжелой цепи (V_H) антитела. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен TCR-подобной слитой молекулы содержит переменную область легкой цепи (V_L) антитела. В некоторых вариантах осуществления

внеклеточный антигенсвязывающий домен TCR-подобной слитой молекулы способен к димеризации с другим внеклеточным антигенсвязывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен TCR-подобной слитой молекулы содержит V_H антитела, при этом V_H способен к димеризации с другим внеклеточным антигенсвязывающим доменом, содержащим V_L антитела, и образованию переменного фрагмента (Fv). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен TCR-подобной слитой молекулы содержит V_L антитела, при этом V_L способен к димеризации с другим внеклеточным антигенсвязывающим доменом, содержащим V_H антитела, и образованию переменного фрагмента (Fv).

5.3. Внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленных химерных рецепторов

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении химерный рецептор нацелен на ADGRE2. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении химерный рецептор содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с ADGRE2.

Сопряженный с протеином G рецептор адгезии E2 (ADGRE2), также известный как EMR2, CD312, VBU или CD97, является членом семейства адгезии GPCR. Он экспрессируется моноцитами/макрофагами, дендритными клетками и всеми типами гранулоцитов. ADGRE2 представляет собой рецептор клеточной поверхности, который связывается с фрагментом хондроитинсульфата цепей гликозаминогликанов и стимулирует прикрепление клеток. Он стимулирует хемотаксис, дегрануляцию и адгезию гранулоцитов. В макрофагах ADGRE2 стимулирует высвобождение воспалительных цитокинов, включая IL8 и TNF. Сигнализация осуществляется, вероятно, через G-протеины.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении химерный рецептор нацелен на ADGRE2 человека. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении химерный рецептор содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с ADGRE2 человека. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2 человека содержит или состоит из аминокислотной последовательности с референтным номером Uniprot №: Q9UHX3-1 (SEQ ID NO: 32) или ее фрагмента. SEQ ID NO: 32 приведена ниже:

```

MGGRVFLVFL AFCVWLTLPG AETQDSRGCA RWCPQDSSCV NATAACRCNPG
FSSFSEIIT PMETCDDINE CATLSKVSCG KFSDCWNTEG SYDCVCSPGY
EPVSGAKTFK NESENTCQDV DECQQNPRLC KSYGTCVNTL GSYTCQCLPG
FKLKPEDPKL CTDVNECTSG QNPCHSSTHC LNNVGSYQCR CRPGWQPIPG
SPNGPNNTVC EDVDECSSGQ HQCDSSSTVCF NTVGSYSCRC RPGWKPRHGI
PNNQKDTVCE DMTFSTWTPP PGVHSQTLR FFDKVQDLGR DYKPGLANNT
IQSILQALDE LLEAPGDLET LPRLQQHCVA SHLLDGLQDV LRGLSKNLSN
GLLNFSYPAG TELSLEVQKQ VDRSVTLRQN QAVMQLDWNQ AQKSGDPGPS
VVGLVSIPGM GKLLAEAPLV LEPEKQMLLH ETHQGLLQDG SPILLSAVIS
AFLSNNDTQN LSSPVTFTFS HRSVIPRQKV LCVFWEHGQN GCGHWATTGC

```

STIGTRDTST ICRCTHLSSF AVLMAHYDVQ EEDPVLTVIT YMGLSVSLLC
 LLLAALTFLC CKAIQNTSTS LHLQLSLCLF LAHLLFLVAI DQTGHKVLCS
 IIAGTLHYLY LATLTWMLLE ALYLFLTARN LTVVNYSSIN RFMKKLMFPV
 GYGVPAVTVA ISAASRPHLY GTPSRCWLQP EKGFIWGFLG PVCAIFSVNL
 VLFLVTLWIL KNRLSSLNSE VSTLRNTRML AFKATAQLFI LGCTWCLGIL
 QVGPAARVMA YLFTIINSLQ GVFIPLVYCL LSQQVREQYG KWSKGIRKLLK
 TESEMHTLSS SAKADTSKPS TVN [SEQ ID NO: 32]

ADGRE2 содержит EGF-подобный домен 1, EGF-подобный домен 2, EGF-подобный домен 3, EGF-подобный домен 4, EGF-подобный домен 5 и домен GPS. В некоторых вариантах осуществления EGF-подобный домен 1 содержит или состоит из аминокислот от 25 до 66 из SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления EGF-подобный домен 2 содержит или состоит из аминокислот от 67 до 118 из SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления EGF-подобный домен 3 содержит или состоит из аминокислот от 119 до 162 из SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления EGF-подобный домен 4 содержит или состоит из аминокислот от 163 до 211 из SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления EGF-подобный домен 5 содержит или состоит из аминокислот от 212 до 260 из SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления домен GPS содержит или состоит из аминокислот от 479 до 529 из SEQ ID NO: 32.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении химерный рецептор нацелен на полипептид ADGRE2, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98% или по меньшей мере на приблизительно 99%, по меньшей мере на приблизительно 100% идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 32, или ее фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленного химерного рецептора связывается со стеблевой областью ADGRE2. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленного химерного рецептора связывается с доменом GPS ADGRE2. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленного химерного рецептора связывается с EGF-подобным доменом 5 ADGRE2.

В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный химерный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный CAR имеет структуру, описанную в разделе 5.2.1. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с ADGRE2, трансмембранный домен и

внутриклеточный сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный химерный рецептор представляет собой химерный костимулирующий рецептор (CCR). В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный CCR имеет структуру, описанную в разделе 5.2.2. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный CCR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с ADGRE2, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, который не обеспечивает сигнал активации иммунореактивной клетке, например, внутриклеточный сигнальный домен не содержит полипептид CD3ζ.

В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный химерный рецептор представляет собой TCR-подобную слитую молекулу. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленные TCR-подобные слитые молекулы имеют структуру, описанную в разделе 5.2.3.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) связывается с ADGRE2 (например, ADGRE2 человека) с константой диссоциации (K_D) по меньшей мере приблизительно 1×10^{-6} М, по меньшей мере приблизительно 1×10^{-7} М, по меньшей мере приблизительно 1×10^{-8} М, по меньшей мере приблизительно 1×10^{-9} М или по меньшей мере приблизительно 1×10^{-10} М. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) связывается с ADGRE2 (например, ADGRE2 человека) с константой диссоциации (K_D) по меньшей мере приблизительно 2×10^{-8} М. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) связывается с ADGRE2 (например, ADGRE2 человека) с константой диссоциации (K_D) от приблизительно 2×10^{-8} М до приблизительно 8×10^{-9} М.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) связывается с ADGRE2 (например, ADGRE2 человека) с константой диссоциации (K_D) от приблизительно 1 нМ до приблизительно 50 нМ, от приблизительно 5 нМ до приблизительно 30 нМ, от приблизительно 5 нМ до приблизительно 25 нМ или от приблизительно 8 нМ до приблизительно 20 нМ. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) связывается с ADGRE2 (например, ADGRE2 человека) с константой диссоциации (K_D) по меньшей мере приблизительно 50 нМ, по меньшей мере приблизительно 40 нМ, по меньшей мере приблизительно 35 нМ, по меньшей мере приблизительно 30 нМ, по меньшей мере приблизительно 25 нМ, по меньшей мере приблизительно 20 нМ, по меньшей мере приблизительно 19 нМ, по меньшей мере приблизительно 18 нМ, по меньшей мере приблизительно 17 нМ, по меньшей мере приблизительно 16 нМ, по меньшей мере приблизительно 15 нМ, по

меньшей мере приблизительно 14 нМ, по меньшей мере приблизительно 13 нМ, по меньшей мере приблизительно 12 нМ, по меньшей мере приблизительно 11 нМ, по меньшей мере приблизительно 10 нМ, по меньшей мере приблизительно 9 нМ, по меньшей мере приблизительно 8 нМ, по меньшей мере приблизительно 7 нМ, по меньшей мере приблизительно 6 нМ или по меньшей мере приблизительно 5 нМ.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 33-35 приведены в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 36-38 приведены в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, V_L CDR2,

содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 39. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39. SEQ ID NO: 39 приведена в таблице 1 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 40. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40. SEQ ID NO: 40 приведена в таблице 1 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 149.

В некоторых вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене ADGRE2-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась переменная область тяжелой цепи (V_H). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, переменные области расположены от N-до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный scFv содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный scFv обозначен «ADGRE2-A». Типовая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, приведена в SEQ ID NO: 42. SEQ ID NO: 41 и 42 приведены в таблице 1. CDR, приведенные в таблице 1, идентифицированы в соответствии с системой нумерации IMGT.

Таблица 1 (ADGRE2-A)

CDR	1	2	3
V_H	GYTFTNYW [SEQ ID NO: 33]	VYPGDGDT [SEQ ID NO: 34]	ARGFTAYGMDY [SEQ ID NO: 35]
V_L	SSVSY [SEQ ID NO: 36]	DTS [SEQ ID NO: 37]	QQWSSNPLT [SEQ ID NO: 38]
Полная V_H	QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIG AVYPGDGDT RHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDY WGQGTTVTVSS [SEQ ID NO: 39]		
Полная V_L	EIVLTQSPATMSASPGERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTS KLAGVPARFSGSGSDYFTFTISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKL EIK [SEQ ID NO: 40]		
ДНК полной V_H	caagttcagctccagcagagcggcggcgaagtggcaaacctggagcgtcagcaagctgtcctgcaaacgagtggtctatcagttcacgaactactggatgcagtgataaacgaggctcccgggcagggtctggagtgattggagccgtctaccaggggacggcgacacccggcacactcaaaagtcaagggaaggccaccctgaccgctgacaagagcacaagc		

	acagcgtacatggaggtgtcctctttgagatccgaagataccgctgtgtattattgtgccggggcttactgcatacggg atggattactggggacaaggcactaccgtgactgtcagctcc [SEQ ID NO: 144]
ДНК полной V _L	gaaattgtgctgacacagagccctgccacaatgtctgtagccctggcgagcgcgtgaccatgtctttagcggcagca gcagcgtgtcctacatgcattggtatcaacagaagtccggccagctctccaagcgggtgatctacgatacaagcaagct ggcctccggcgtgccccagatfttctggcagcggctctggaacagattacaccttcaccatctctagatggaacctg aggattttgccactactattgccagcagtggtccagcaatcccctgacattggaggaggaccaagctggaaattaag [SEQ ID NO: 145]
V _H -V _L scFv	QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIG AVYPGDGDY RHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDYAVYYCARGFTAYGMDY WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSA SSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSKSLASGVPARFSGSGSGTDYFTISS MEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 41]
ДНК для V _H -V _L scFv	caagttcagctccagcagagcggcggcgaagtggcaaagcctggagcgtcagcaagctgtcctgcaaagcagtggtg ctatacgttcacgaactactggatgtagtggataaagcaggctcccgggcagggtctggagtggattggagccgtctac ccaggggacggcgacaccggcacactcaaaagttcaagggcaaggccaccctgaccgtgacaagagcacaagc acagcgtacatggaggtgtcctctttgagatccgaagataccgctgtgtattattgtgccggggcttactgcatacggg atggattactggggacaaggcactaccgtgactgtcagctccgggggtggaggctcaggcgggggggttcaggag gggggggatctgaaattgtgctgacacagagccctgccacaatgtctgtagccctggcgagcgcgtgaccatgtcttg tagcggcagcagcagcgtgtcctacatgcattggtatcaacagaagtccggccagctctccaagcgggtgatctacgat acaagcaagctggcctccggcgtgcccgccagatfttctggcagcggctctggaacagattacaccttcaccatcttag catggaacctgaggattttgccactactattgccagcagtggtccagcaatcccctgacattggaggaggaccaagc tggaaattaag [SEQ ID NO: 42]

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 33-35 приведены в таблицах 1 и 2.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее

консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 36-38 приведены в таблицах 1 и 2.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 43. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный

антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43. SEQ ID NO: 43 приведена в таблице 2 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 44. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен химерного рецептора (например, scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44. SEQ ID NO: 44 приведена в таблице 2 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 149.

В некоторых вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене ADGRE2-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась переменная область тяжелой цепи (V_H). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, переменные области расположены от N-до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный scFv содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 45, которая приведена в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный scFv обозначен «ADGRE2-B». CDR, приведенные в таблице 2,

идентифицированы в соответствии с системой нумерации IMGT.

Таблица 2 (ADGRE2-B)

CDR	1	2	3
V _H	GYTFTNYW [SEQ ID NO: 33]	VYPGDGDT [SEQ ID NO: 34]	ARGFTAYGMDY [SEQ ID NO: 35]
V _L	SSVSY [SEQ ID NO: 36]	DTS [SEQ ID NO: 37]	QQWSSNPLT [SEQ ID NO: 38]
Полная V _H	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIG AVYYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDTAVYYCARG FTAYGMDYWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO: 43]		
Полная V _L	EIVLTQSPATMSASPGERV TMSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTS KLASGVPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 44]		
V _H -V _L scFv	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIG AVYYPGDG DTRYTQKFQGRATLTADTSISTAYMEVSRLRSDDTAVYYCARG FTAYGMDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPG ERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTSK LASGVPDRFSGSGSG TDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 45]		

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 33-35 приведены в таблицах 1-3.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 36-38 приведены в таблицах 1-3.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в

SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 46. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен химерного рецептора (например, scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 46. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46. SEQ ID NO: 46 приведена в таблице 3 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по

меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 47. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 47. SEQ ID NO: 47 приведена в таблице 3 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 149.

В некоторых вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене ADGRE2-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась переменная область тяжелой цепи (V_H). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, переменные области расположены от N-до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный scFv содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 48, которая приведена в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный scFv обозначен «ADGRE2-C». CDR, приведенные в таблице 3, идентифицированы в соответствии с системой нумерации IMGT.

Таблица 3 (ADGRE2-C)

CDR	1	2	3
V_H	GYTFTNYW [SEQ ID NO: 33]	VYPGDGDT [SEQ ID NO: 34]	ARGFTAYGMDY [SEQ ID NO: 35]

V _L	SSVSY [SEQ ID NO: 36]	DTS [SEQ ID NO: 37]	QQWSSNPLT [SEQ ID NO: 38]
Полная V _H	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIG AVYPGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDTAVYYCARG FTAYGMDYWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO: 46]		
Полная V _L	EIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGLSPKRWIYDTS KLAGVDPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKL EIK [SEQ ID NO: 47]		
V _H -V _L scFv	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIG AVYPGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSTSTVYMEVSSLRSEDTAVYYCARG FTAYGMDYWGQGTTVTVSS GGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERVMTMSCSASSSVSYMHWY QQKSGLSPKRWIYDTSKLAGVDPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYC QQWSSNPLTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 48]		

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 33-35 приведены в таблицах 1-4.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 36-38 приведены в таблицах 1-4.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию,

V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 49. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 49. SEQ ID NO: 49 приведена в таблице 4 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 50. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-

нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50. SEQ ID NO: 50 приведена в таблице 4 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 49, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене ADGRE2-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась переменная область тяжелой цепи (V_H). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, переменные области расположены от N-до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный scFv содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 51, которая приведена в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный scFv обозначен «ADGRE2-D». CDR, приведенные в таблице 4, идентифицированы в соответствии с системой нумерации IMGT.

Таблица 4 (ADGRE2-D)

CDR	1	2	3
V_H	GYTFTNYW [SEQ ID NO: 33]	VYPGDGDT [SEQ ID NO: 34]	ARGFTAYGMDY [SEQ ID NO: 35]
V_L	SSVSY [SEQ ID NO: 36]	DTS [SEQ ID NO: 37]	QQWSSNPLT [SEQ ID NO: 38]
Полная	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVVRQAPGQGLEWM		

V _H	GAVYPGDGDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR GFTAYGMDYWGQGLVTVSS [SEQ ID NO: 49]
Полная V _L	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPG LAPRL LIYDTSKL ASGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 50]
V _H -V _L scFv	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWM GAVYPGDGDTRHTQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR GFTAYGMDYWGQGLVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLS LSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPG LAPRL LIYDTSKLASGIPDRFSGS GSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 51]

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 34-36 приведены в таблицах 1-5.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 36-38 приведены в таблицах 1-5.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO:

38, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 52. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52. SEQ ID NO: 52 приведена в таблице 5 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 53. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно

88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53. SEQ ID NO: 53 приведена в таблице 5 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене ADGRE2-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась переменная область тяжелой цепи (V_H). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, переменные области расположены от N- до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный scFv содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 54, которая приведена в таблице 5. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный scFv обозначен «ADGRE2-E». CDR, приведенные в таблице 5, идентифицированы в соответствии с системой нумерации IMGT.

Таблица 5 (ADGRE2-E)

CDR	1	2	3
V_H	GYTFTNYW [SEQ ID NO: 33]	VYPGDGDT [SEQ ID NO: 34]	ARGFTAYGMDY [SEQ ID NO: 35]
V_L	SSVSY [SEQ ID NO: 36]	DTS [SEQ ID NO: 37]	QQWSSNPLT [SEQ ID NO: 38]
Полная V_H	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVCSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIGAVYPGDGDTDRHTQKFKGRVTMTADKSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGFTAYGMDYWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO: 52]		
Полная	QIVLTQSPATLSLSPGERATLTCASASSVSVMHWYQQKPKGLSPKRWIYDTSK		

V _L	LASGVPDRFSGSGSGTDYFTTIRLRLEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGGTKVE IK [SEQ ID NO: 53]
V _H -V _L scFv	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMQWVRQAPGQGLEWIG AVYPGDGDTRHTQKFKGRVTMTADKSTSTVYMEISSLRSEDVAVYYCARG FTAYGMDYWGQGLTVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQSPATLSLS PGERATLTCSASSSVSYMHWYQQKPKGLSPKRWIYDTSKSLASGVPDRFSGSG SGTDYFTTIRLRLEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGQGGTKVEIK [SEQ ID NO: 54]

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 33-35 приведены в таблицах 1-6.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 36-38 приведены в таблицах 1-6.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность,

приведенную в SEQ ID NO: 34, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 55. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 55. SEQ ID NO: 55 приведена в таблице 6 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 56. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный

антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56. SEQ ID NO: 56 приведена в таблице 6 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 55, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 149.

В некоторых вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене ADGRE2-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась переменная область тяжелой цепи (V_H). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, переменные области расположены от N- до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный scFv содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 57, которая приведена в таблице 6. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный scFv обозначен «ADGRE2-F». CDR, приведенные в таблице 6, идентифицированы в соответствии с системой нумерации IMGT.

Таблица 6 (ADGRE2-F)

CDR	1	2	3
V_H	GYTFTNYW [SEQ ID NO: 33]	VYPGDGDT [SEQ ID NO: 34]	ARGFTAYGMDY [SEQ ID NO: 35]
V_L	SSVSY [SEQ ID NO: 36]	DTS [SEQ ID NO: 37]	QQWSSNPLT [SEQ ID NO: 38]
Полная V_H	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIG AVYPGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARG FTAYGMDYWGQGTTTVTVSS [SEQ ID NO: 55]		
Полная V_L	EIVLTQSPATLSASPGERVMTSCSASSSVSYMHWYQQKPLAPRRWIYDTS KLASGVDPDRFSGSGSGTDYFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKL EIK [SEQ ID NO: 56]		

V_H - V_L	QVQLQQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIRQAPGQGLEWIG
scFv	AVYPGDGDTRYTQKFQGRATLTADTSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARG FTAYGMDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSASPGE RVTMSCSASSSVSYMHWYQKPLAPRRWIYDTSKLASGVPDRFSGSGSGT DYTFTISRMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 57]

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 33-35 приведены в таблицах 1-7.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 36-38 приведены в таблицах 1-7.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, V_L CDR1, содержащую

аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 146. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 146. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 146. SEQ ID NO: 146 приведена в таблице 7 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 147. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 147. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 147. SEQ

ID NO: 147 приведена в таблице 7 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора (например, ADGRE2-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 146, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 147. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 149.

В некоторых вариантах осуществления вариабельные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене ADGRE2-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась вариабельная область тяжелой цепи (V_H). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, вариабельные области расположены от N- до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный scFv содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 148, которая приведена в таблице 7. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный scFv обозначен «ADGRE2-G». CDR, приведенные в таблице 7, идентифицированы в соответствии с системой нумерации IMGT.

Таблица 7 (ADGRE2-G)

CDR	1	2	3
V_H	GYTFTNYW [SEQ ID NO: 33]	VYPGDGDT [SEQ ID NO: 34]	ARGFTAYGMDY [SEQ ID NO: 35]
V_L	SSVSY [SEQ ID NO: 36]	DTS [SEQ ID NO: 37]	QQWSSNPLT [SEQ ID NO: 38]
Полная V_H	QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIG AVYPGDGDTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDTA VYYCARG FTAYGMDYWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO: 146]		
Полная V_L	EIVLTQSPATMSASPGERV TMSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTS KLASGVPARFSGSGSGTDYTF TISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 147]		
V_H - V_L scFv	QVQLVQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIG AVYPGDGDTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDTA VYYCARG FTAYGMDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPG ERVTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSK LASGVPARFSGSGSGTDYTF TISSMEPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 148]		

Аминокислотные последовательности V_H и/или V_L , содержащие или состоящие из по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95% (например, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) гомологии или идентичности с конкретной последовательностью (например, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 146 или SEQ ID NO: 147), могут содержать замены (например, консервативные замены), вставки или делеции по сравнению с конкретной(ыми) последовательность(ями), но сохраняют способность связываться с антигеном-мишенью (например, ADGRE2). В некоторых вариантах осуществления замещено, вставлено и/или удалено в целом от 1 до 10 аминокислот в конкретной последовательности (например, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 146 или SEQ ID NO: 147). В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции находятся в областях за пределами CDR (например, в FR) внеклеточного антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит последовательность V_H и/или V_L , выбранную из SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 146 или SEQ ID NO: 147, включая посттрансляционные модификации этой последовательности (SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 146 или SEQ ID NO: 147).

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленного химерного рецептора перекрестно конкурирует за связывание с ADGRE2 с эталонным антителом или его антигенсвязывающей частью, содержащими V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34; V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35; V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36; V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37; и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен

описанного в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленного химерного рецептора перекрестно конкурирует за связывание с ADGRE2 с эталонным антителом или его антигенсвязывающей частью, содержащими последовательности V_H и V_L , например, любого из описанных в настоящем изобретении scFv (например, ADGRE2-A, ADGRE2-B, ADGRE2-C, ADGRE2-D, ADGRE2-E, ADGRE2-F и ADGRE2-G).

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленного химерного рецептора связывается с той же или практически той же эпитопной областью на ADGRE2, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащие V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34; V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35; V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36; V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37; и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленного химерного рецептора связывается с той же или практически той же эпитопной областью на ADGRE2, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащие последовательности V_H и V_L , например, любого из описанных в настоящем изобретении scFv (например, ADGRE2-A, ADGRE2-B, ADGRE2-C, ADGRE2-D, ADGRE2-E, ADGRE2-F и ADGRE2-G).

Внеклеточные антигенсвязывающие домены описанных в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленных химерных рецепторов, которые перекрестно конкурируют или конкурируют с эталонным антителом или его антигенсвязывающими частями за связывание с ADGRE2, можно идентифицировать, используя рутинные способы, известные в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, ELISA, радиоиммуноанализ (РИА), Biacore, проточную цитометрию, вестерн-блоттинг и любые другие количественные или качественные анализы связывания антитела. Конкурентный анализ ELISA описан в Morris, "Epitope Mapping of Protein Antigens by Competition ELISA", *The Protein Protocols Handbook* (1996), pp 595-600, под редакцией J. Walker, которая в полном объеме включена посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления анализ связывания антитела включает измерение исходного связывания эталонного антитела с ADGRE2, смешивание эталонного антитела с исследуемым внеклеточным антигенсвязывающим доменом, измерение второго связывания эталонного антитела с ADGRE2 в присутствии исследуемого внеклеточного антигенсвязывающего домена и сравнение исходного связывания со вторым связыванием эталонного антитела, при этом уменьшенное второе связывание эталонного антитела с ADGRE2 по сравнению с исходным связыванием указывает на то, что исследуемый внеклеточный антигенсвязывающий домен перекрестно конкурирует с эталонным антителом за связывание с ADGRE2, например, антителом,

которое распознает такой же или практически такой же эпитоп, перекрывающийся эпитоп или смежный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления эталонное антитело метят, например, флуорохромом, биотином или пероксидазой. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2 экспрессируется в клетках, например, по результатам исследования методом проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2 иммобилизуют на поверхности, включая чип *Biacore* (например, в исследовании *Biacore*), или другой среде, подходящей для анализа методом поверхностного плазмонного резонанса. Связывание эталонного антитела в присутствии полностью нерелевантного антитела (которое не связывается с ADGRE2) может служить контрольным высоким значением. Контрольное низкое значение можно получить путем инкубации меченого эталонного антитела с немеченым эталонным антителом, когда будет происходить конкуренция и снижением связывания меченого эталонного антитела. В некоторых вариантах осуществления исследуемый внеклеточный антигенсвязывающий домен, который снижает связывание эталонного антитела с ADGRE2 по меньшей мере на приблизительно 20%, по меньшей мере на приблизительно 30%, по меньшей мере на приблизительно 40%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 60%, по меньшей мере на приблизительно 70%, по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%, считается внеклеточным антигенсвязывающим доменом, который перекрестно конкурирует с эталонным антителом за связывание с ADGRE2. В некоторых вариантах осуществления анализы проводят при комнатной температуре.

В некоторых вариантах осуществления анализ связывания антитела включает измерение исходного связывания исследуемого внеклеточного антигенсвязывающего домена с ADGRE2, смешивание исследуемого внеклеточного антигенсвязывающего домена с эталонным антителом, измерение второго связывания исследуемого внеклеточного антигенсвязывающего домена с ADGRE2 в присутствии эталонного антитела и сравнение исходного связывания со вторым связыванием исследуемого внеклеточного антигенсвязывающего домена, при этом уменьшенное второе связывание исследуемого внеклеточного антигенсвязывающего домена с ADGRE2 по сравнению с исходным связыванием указывает на то, что исследуемый внеклеточный антигенсвязывающий домен перекрестно конкурирует с эталонным антителом за связывание с ADGRE2, например, антителом, которое распознает такой же или практически такой же эпитоп, перекрывающийся эпитоп или смежный эпитоп. В некоторых вариантах осуществления исследуемый внеклеточный антигенсвязывающий домен метят, например, флуорохромом, биотином или пероксидазой. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2 экспрессируется в клетках, например, по результатам исследования методом проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2 иммобилизуют на поверхности, включая чип *Biacore* (например, в исследовании *Biacore*), или другой среде, подходящей для анализа методом поверхностного плазмонного резонанса. Связывание исследуемого внеклеточного антигенсвязывающего домена в присутствии полностью

нерелевантного антитела (которое не связывается с ADGRE2) может служить контрольным высоким значением. Контрольное низкое значение можно получить путем инкубации меченого исследуемого внеклеточного антигенсвязывающего домена с немеченым исследуемым внеклеточным антигенсвязывающим доменом, когда будет происходить конкуренция и снижением связывания меченого исследуемого внеклеточного антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления исследуемый внеклеточный антигенсвязывающий домен, чье связывание с ADGRE2 снижается по меньшей мере на приблизительно 20%, по меньшей мере на приблизительно 30%, по меньшей мере на приблизительно 40%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 60%, по меньшей мере на приблизительно 70%, по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95% в присутствии эталонного антитела, считается внеклеточным антигенсвязывающим доменом, который перекрестно конкурирует с эталонным антителом за связывание с ADGRE2. В некоторых вариантах осуществления анализы проводят при комнатной температуре.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленного химерного рецептора содержит линкер, соединяющий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи внеклеточного антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 149.

В некоторых вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене ADGRE2-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась переменная область тяжелой цепи (V_H). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, переменные области расположены от N-до C-конца: V_H - V_L .

В некоторых вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене ADGRE2-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась переменная область легкой цепи (V_L). В некоторых вариантах

осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен ADGRE2-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, переменные области расположены от N-до С-конца: V_L-V_H.

Кроме того, ADGRE2-нацеленный химерный рецептор может содержать лидерный или сигнальный пептид, который направляет растущий белок в эндоплазматический ретикулум. В некоторых вариантах осуществления лидерный или сигнальный пептид расположен на N-конце (например, ковалентно присоединен к нему) внеклеточного антигенсвязывающего домена ADGRE2-нацеленного химерного рецептора. Сигнальный или лидерный пептид может быть важен, если химерный рецептор должен быть гликозилирован и закреплен в клеточной мембране. Сигнальная или лидерная последовательность может представлять собой последовательность (длиной приблизительно 5, приблизительно 10, приблизительно 15, приблизительно 20, приблизительно 25 или приблизительно 30 аминокислот), присутствующую на N-конце синтезируемых белков, которая регулирует их попадание в секреторный путь. Неограничивающие примеры сигнальных пептидов или лидерных последовательностей включают сигнальную последовательность IL-2, лидерную последовательность CD8, лидерную последовательность каппа, лидерную последовательность альбумина и лидерную последовательность пролактина. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность IL-2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 58 или SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность каппа содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 60 или SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность CD8 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 62 или SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность альбумина содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность пролактина содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный химерный рецептор содержит сигнальный пептид, который содержит полипептид CD8. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный химерный рецептор содержит сигнальный пептид, который содержит полипептид CD8, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 63.

MYRMQLLSICIALSLALVTNS [SEQ ID NO: 58]

MYSMQLASCVTTLVLLVNS [SEQ ID NO: 59]

METPAQLLFLLLLWLPDTTG [SEQ ID NO: 60]

METDTLLLWVLLLWVPGSTG [SEQ ID NO: 61]

MALPVTALLLPLALLLHAARP [SEQ ID NO: 62]

MALPVTALLLPLALLLHA [SEQ ID NO: 63]

MKWVTFISLLFSSAYS [SEQ ID NO: 64]

MDSKGSSQKGSRLLLLLVVSNNLLLCQGVVS [SEQ ID NO: 65]

5.4. Типовые ADGRE2-нацеленные химерные рецепторы

В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный химерный рецептор представляет собой ADGRE2-нацеленный CAR. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный CAR содержит (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i) а V_H , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, и (ii) V_L , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38; (b) шарнирную/спейсерную область, содержащую полипептид CD28, (c) трансмембранный домен, содержащий полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 человека или его фрагмент), и (d) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий (i) полипептид CD3 ζ и (ii) а костимулирующую сигнальную область, содержащую полипептид CD28 (например, внутриклеточный домен CD28 человека или его фрагмент). В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L расположены от N- до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит полипептид CD28, содержащий или состоящий из аминокислот от 153 до 179 из SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область содержит полипептид CD28, содержащий или состоящий из аминокислот от 180 до 220 из SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления шарнирная/спейсерная область содержит полипептид CD28, содержащий или состоящий из аминокислот от 114 до 152 из SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 150. SEQ ID NO: 150 приведена ниже. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный CAR содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 66, которая приведена ниже.

QVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQAPGQGLEWIGAVY
 PGDGDTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGFTAYGMDYWG
 QGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGERV TMSCSASSSVSYMHW
 YQQKSGQSPKRWIYDTSKSLASGVPARFSGSGSGTDYFTFTISSMEPEDFATYYCQQWSSN
 PLTFGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTPIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLV
 VVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFA
 AYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKN

обнаружен как отрицательный регуляторный рецептор кристаллов мочевой кислоты (моноурат натрия, MSU), который контролирует аутоиммунность и воспалительные заболевания (Neumann et al., *Immunity* (2014);40:389-99). CLEC12A является отрицательным регулятором функции гранулоцитов и моноцитов (Marshall et al., *J Biol Chem* (2004);279(15):14792-802; Pyz et al., *Eur J Immunol* (2008);38(4):1157-63).

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении химерный рецептор нацелен на CLEC12A человека. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении химерный рецептор содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CLEC12A человека. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A человека содержит или состоит из аминокислотной последовательности с референтным номером UniProt №: Q5QGZ9-2 (SEQ ID NO: 68) или ее фрагмента. SEQ ID NO: 68 приведена ниже:

MSEEVTYADLQFQNSSEMEKIPEIGKFGKAPPAPSHVWRPAALFLTLLCLLLIG
 LGVLASMFHVTLKI
 EMKKMNKLQNISEELQRNISLQLMSNMNISKIRNLSTTLQTIATKLCRELYSKEQENKC
 KPCPRRWIWH
 KDSCYFLSDDVQTWQESKMACAAQNASLLKINNKNALEFIKSQSRSDYWLGLSPEED
 STRGMRVDNIIN
 SSAWVIRNAPDLNMYCGYINRLYVQYYHCTYKKRMICEKMANPVQLGSTYFREA
 [SEQ ID NO: 68]

CLEC12A человека содержит цитоплазматический домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен. В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит или состоит из аминокислот от 1 до 43 из SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит или состоит из аминокислот от 44 до 64 из SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен содержит или состоит из аминокислот от 65 до 265 из SEQ ID NO: 68.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении химерный рецептор нацелен на полипептид CLECL12A, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98% или по меньшей мере на приблизительно 99%, по меньшей мере на приблизительно 100% идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 68, или ее фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного химерного рецептора связывается с внеклеточным доменом CLEC12A.

В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный химерный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах

осуществления CLEC12A-нацеленный CAR имеет структуру, описанную в разделе 5.2.1. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CLEC12A, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен.

В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный химерный рецептор представляет собой химерный костимулирующий рецептор (CCR). В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный CCR имеет структуру, описанную в разделе 5.2.2. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный CCR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CLEC12A, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, который не обеспечивает сигнал активации иммунореактивной клетке, например, внутриклеточный сигнальный домен не содержит полипептид CD3 ζ .

В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный химерный рецептор представляет собой TCR-подобную слитую молекулу. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленные TCR-подобные слитые молекулы имеют структуру, описанную в разделе 5.2.3.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) связывается с CLEC12A (например, CLEC12A человека) с константой диссоциации (K_D) по меньшей мере приблизительно 1×10^{-6} М, по меньшей мере приблизительно 1×10^{-7} М, по меньшей мере приблизительно 1×10^{-8} М, по меньшей мере приблизительно 1×10^{-9} М или по меньшей мере приблизительно 1×10^{-10} М. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) связывается с CLEC12A (например, CLEC12A человека) с константой диссоциации (K_D) по меньшей мере приблизительно 2×10^{-8} М. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) связывается с CLEC12A (например, CLEC12A человека) с константой диссоциации (K_D) от приблизительно 2×10^{-8} М до приблизительно 8×10^{-9} М.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) связывается с CLEC12A (например, CLEC12A человека) с константой диссоциации (K_D) от приблизительно 1 нМ до приблизительно 50 нМ, от приблизительно 5 нМ до 30 нМ, от приблизительно 5 нМ до приблизительно 25 нМ или от приблизительно 8 нМ до приблизительно 20 нМ. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) связывается с CLEC12A (например, CLEC12A человека) с константой диссоциации (K_D) по меньшей мере приблизительно 50 нМ, по меньшей мере приблизительно 40 нМ, по меньшей мере приблизительно 35 нМ, по меньшей мере приблизительно 30 нМ, по меньшей мере приблизительно 25 нМ, по меньшей мере

приблизительно 20 нМ, по меньшей мере приблизительно 19 нМ, по меньшей мере приблизительно 18 нМ, по меньшей мере приблизительно 17 нМ, по меньшей мере приблизительно 16 нМ, по меньшей мере приблизительно 15 нМ, по меньшей мере приблизительно 14 нМ, по меньшей мере приблизительно 13 нМ, по меньшей мере приблизительно 12 нМ, по меньшей мере приблизительно 11 нМ, по меньшей мере приблизительно 10 нМ, по меньшей мере приблизительно 9 нМ, по меньшей мере приблизительно 8 нМ, по меньшей мере приблизительно 7 нМ, по меньшей мере приблизительно 6 нМ, по меньшей мере приблизительно 5 нМ.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 69-71 приведены в таблице 8.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 72-74 приведены в таблице 8.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность,

приведенную в SEQ ID NO: 70, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 75. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 108. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75. SEQ ID NO: 75 приведена в таблице 8 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 76. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 109. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность,

приведенную в SEQ ID NO: 76. SEQ ID NO: 76 приведена в таблице 8 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CLEC12A-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась переменная область тяжелой цепи (V_H). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, переменные области расположены от N-до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный scFv содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный scFv обозначен «CLEC12A-A». Типовая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, приведена в SEQ ID NO: 80. SEQ ID NO: 79 и 80 приведены в таблице 8. CDR, приведенные в таблице 8, идентифицированы в соответствии с системой нумерации IMGT.

Таблица 8 (CLEC12A-A)

CDR	1	2	3
V_H	GGSSISSTYY [SEQ ID NO: 69]	THYRGST [SEQ ID NO: 70]	ARELTGEVFDY [SEQ ID NO: 71]
V_L	QSISSY [SEQ ID NO: 72]	AAS [SEQ ID NO: 73]	QQSYSTPFT [SEQ ID NO: 74]
Полная V_H	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGSSISSTYYWGWIRQPPRKGLEWIGSTHYRGSTYYNPSLKS RVTVISVDTSKNQFSLKVSSVTAADTAVYYCARELTGEVFDYWGGQGLVTVSS [SEQ ID NO: 75]		
Полная V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIK [SEQ ID NO: 76]		

ДНК для полной V_H	Cagctccagctccaagagtcagggccaggtctcgtgaaaccgagtgagaccctgtccctgacctgcacagtgagtg gtggatcaatctcaagctctacctactattgggggtggattcggcagccccctagaaaggggcttgagtgattggca gcaactcattatcgaggatctacctattataatccttctctgaaaagcagagttaccatctctgtggatactgcaaaaatca gttcagtctgaaggatcatccgtgactgctgccgacacggccgtgtactattgcgcgagggagctgacaggtgaggt ctttgactactggggccagggcacactcgtgaccgtgtcttct [SEQ ID NO: 77]
ДНК для полной V_L	Gacatccagatgacgcagtcacctccagctgtccgcatctgtgggtgatagggtcacgattacatgtagggctagtc agagtatttctagttacctgaattgggtaccagcagaaaccaggcaaggcaccaaagttgctcatctatgcggcctcctc ctgcaatctggcgtgccgtccagatttagggatcaggctccggaaccgattcaccttacgatctcctcacttcaacc cgaggattcgccacatattactgtcaacaagctattctacaccgttcaccttcggaccggggacaaaagtgatatta aa [SEQ ID NO: 78]
V_H - V_L scFv	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSTYYWGWIRQPPRKGLEWIG STHYRGSTYYNPSLKS RVTVISVDTSKNQFSLKVSSVTAADTAVYYCARELT GEVFDYWGGTLVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIK [SEQ ID NO: 79]
ДНК для V_H - V_L scFv	Cagctccagctccaagagtcagggccaggtctcgtgaaaccgagtgagaccctgtccctgacctgcacagtgagtg gtggatcaatctcaagctctacctactattgggggtggattcggcagccccctagaaaggggcttgagtgattggca gcaactcattatcgaggatctacctattataatccttctctgaaaagcagagttaccatctctgtggatactgcaaaaatca gttcagtctgaaggatcatccgtgactgctgccgacacggccgtgtactattgcgcgagggagctgacaggtgaggt ctttgactactggggccagggcacactcgtgaccgtgtcttctgcctcaacaggagggggtgggagtgaggcggt ggatcagggggaggaggagtgacatccagatgacgcagtcacctccagctgtccgcatctgtgggtgatagggt cacgattacatgtagggctagtcagagtatttctagttacctgaattgggtaccagcagaaaccaggcaaggcaccaaa gttgctcatctatgcggcctcctctgcaatctggcgtgccgtccagatttagggatcaggctccggaaccgatttca cccttacgatctcctcacttcaaccgaggattcgccacatattactgtcaacaagctattctacaccgttcaccttcgg accggggacaaaagtgatattaaa [SEQ ID NO: 80]

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 82, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 81-83 приведены в таблице 9.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в

SEQ ID NO: 84, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 73, 84 и 85 приведены в таблице 9.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 82, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 82, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 86. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно

100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86. SEQ ID NO: 86 приведена в таблице 9 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 87. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87. SEQ ID NO: 87 приведена в таблице 9 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления вариabельные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CLEC12A-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась вариabельная область тяжелой цепи (V_H). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, вариabельные области расположены от N-до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный scFv содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 88, которая приведена в таблице 9. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-

нацеленный scFv обозначен «CLEC12A-B». CDR, приведенные в таблице 9, идентифицированы в соответствии с системой нумерации IMGT.

Таблица 9 (CLEC12A-B)

CDR	1	2	3
V _H	GG SISTYY [SEQ ID NO: 81]	IYYSGST [SEQ ID NO: 82]	ARE DYYGSGSPFDY [SEQ ID NO: 83]
V _L	QGIRYD [SEQ ID NO: 84]	AAS [SEQ ID NO: 73]	LQDYNFPRT [SEQ ID NO: 85]
Полная V _H	QVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGGSISTYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIY YSGSTKYNPSLKS RVTISVDTSKNLFS LKLS SVTAADTAVYYCARE DYYGSG SPFDYWGQGLVTVSS [SEQ ID NO: 86]		
Полная V _L	AIQMTQSPSSL SASVGD RVTITCRASQGIRYDLGWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNFPRTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 87]		
V _H -V _L scFv	QVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGGSISTYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIY YSGSTKYNPSLKS RVTISVDTSKNLFS LKLS SVTAADTAVYYCARE DYYGSG SPFDYWGQGLVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSAIQMTQSPSSL SASVGD RVTITCRASQGIRYDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNFPRTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 88]		

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 91, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 89-91 приведены в таблице 10.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 92, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 92-94 приведены в таблице 10.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, scFv) содержит V_H CDR1,

содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 91, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 92, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 91, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 92, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 95. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 95. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 95. SEQ ID NO: 95 приведена в таблице 10 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно

85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 96. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 96. SEQ ID NO: 96 приведена в таблице 10 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 96, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CLEC12A-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась переменная область тяжелой цепи (V_H). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, переменные области расположены от N- до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 97, которая приведена в таблице 10. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный scFv обозначен «CLEC12A-C». CDR, приведенные в таблице 10, идентифицированы в соответствии с системой нумерации IMGT.

Таблица 10 (CLEC12A-C)

CDR	1	2	3
V_H	GFTFSSYG [SEQ ID NO: 89]	ISYDGSDK [SEQ ID NO: 90]	ARDKGYFDY [SEQ ID NO: 91]

V _L	QSVGNRY [SEQ ID NO: 92]	GAS [SEQ ID NO: 93]	QQDYNLPLT [SEQ ID NO: 94]
Полная V _H	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGS DKYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTAVYYCARD KGY YFDYWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO: 95]		
Полная V _L	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGNRYLSWYQQKPGQAPRLLIYGA STRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNLPLTFGGGTKV EIK [SEQ ID NO: 96]		
V _H -V _L scFv	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGS DKYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTAVYYCARD KGY YFDYWGQGTLVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSP GERATLSCRASQSVGNRYLSWYQQKPGQAPRLLIYGA STRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNLPLTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO: 97]		

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 98, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 89, 90 и 98 приведены в таблице 11.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 99, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 151, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 93, 99 и 151 приведены в таблице 11.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 98, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 99, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 151, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 98, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 99, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 151.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 100. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 100. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 100. SEQ ID NO: 100 приведена в таблице 11 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 101. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно

84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 101. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 101. SEQ ID NO: 101 приведена в таблице 11 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 100, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 101. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CLEC12A-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась переменная область тяжелой цепи (V_H). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, переменные области расположены от N-до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 102, которая приведена в таблице 11. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный scFv обозначен «CLEC12A-D». CDR, приведенные в таблице 11, идентифицированы в соответствии с системой нумерации IMGT.

Таблица 11 (CLEC12A-D)

CDR	1	2	3
V_H	GFTFSSYG [SEQ ID NO: 89]	ISYDGSDK [SEQ ID NO: 90]	ARDGSRYFDY [SEQ ID NO: 98]
V_L	QSVHISKY [SEQ ID NO: 99]	GAS [SEQ ID NO: 93]	QQDYNLPIT [SEQ ID NO: 151]
Полная V_H	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSDKYSADSVKGRFNISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDG SRYFDYWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO: 100]		
Полная	EIFMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVHISKYLSWYQQKPGQAPSLLIYGA		

V _L	STRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNLPITFGQGTRL EIK [SEQ ID NO: 101]
V _H -V _L scFv	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGS DKYSADSVKGRFNISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDG SRYFDYWGQGTLVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSEIFMTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVH SKYLSWYQQKPGQAPSL LIYGASTRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNLPITFGQGTRLEIK [SEQ ID NO: 102]

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 103, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 81, 83 и 103 приведены в таблице 12.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 104, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 105, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 73, 104 и 105 приведены в таблице 12.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 103, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 104, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 105, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность,

приведенную в SEQ ID NO: 103, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 104, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 105.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 106. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 106. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 106. SEQ ID NO: 106 приведена в таблице 12 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 107. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 107. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность,

приведенную в SEQ ID NO: 107. SEQ ID NO: 107 приведена в таблице 12 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 106, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 107. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления вариабельные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CLEC12A-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась вариабельная область тяжелой цепи (V_H). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, вариабельные области расположены от N-до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 108, которая приведена в таблице 12. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный scFv обозначен «CLEC12A-E». CDR, приведенные в таблице 12, идентифицированы в соответствии с системой нумерации IMGT.

Таблица 12 (CLEC12A-E)

CDR	1	2	3
V_H	GG SISTYY [SEQ ID NO: 81]	IY FSGST [SEQ ID NO: 103]	ARE DYYGSGSPFDY [SEQ ID NO: 83]
V_L	QGIRND [SEQ ID NO: 104]	AAS [SEQ ID NO: 73]	LQDYNYPRT [SEQ ID NO: 105]
Полная V_H	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISTYYWSWIRQPPGKGLEWLGYYIFSGSTNYNPSLKSRLTISVAASKSQFSLKLSSVTAADTAVYYCARE DYYGSGSPFDYWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO: 106]		
Полная V_L	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWFQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTYFTLTISLQPEDSATYYCLQDYNYPRTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 107]		
V_H - V_L scFv	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISTYYWSWIRQPPGKGLEWLGYYIFSGSTNYNPSLKSRLTISVAASKSQFSLKLSSVTAADTAVYYCARE DYYGSGSPFDYWGQGTLVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSAIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWFQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS		

	GSGTYFTLTISLQPEDSATYYCLQDYNYPRTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 108]
--	---

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 109, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 103, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 83, 103 и 109 приведены в таблице 13.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 110, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 73, 85 и 110 приведены в таблице 13.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 109, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 103, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 110, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 109, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 103, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 110, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 85.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен

CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 111. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 111. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 111. SEQ ID NO: 111 приведена в таблице 13 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 112. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 112. SEQ ID NO: 112 приведена в таблице 13 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 111, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера. В

некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления вариабельные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CLEC12A-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась вариабельная область тяжелой цепи (V_H). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, вариабельные области расположены от N-до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 113, которая приведена в таблице 13. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный scFv обозначен «CLEC12A-F». CDR, приведенные в таблице 13, идентифицированы в соответствии с системой нумерации IMGT.

Таблица 13 (CLEC12A-F)

CDR	1	2	3
V_H	GGSISTDY [SEQ ID NO: 109]	IYFSGST [SEQ ID NO: 103]	AREDYYGSGSPFDY [SEQ ID NO: 83]
V_L	QDIRND [SEQ ID NO: 110]	AAS [SEQ ID NO: 73]	LQDYNFPRT [SEQ ID NO: 85]
Полная V_H	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISTDYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYFSGSTKYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDYYGSGSPFDYWGQGTLLTVSS [SEQ ID NO: 111]		
Полная V_L	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNDLGWFQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNFPRTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 112]		
V_H - V_L scFv	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISTDYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYFSGSTKYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREDYYGSGSPFDYWGQGTLLTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSAIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNDLGWFQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNFPRTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 113]		

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, или ее

консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 114, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 89, 90 и 114 приведены в таблице 14.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 115, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 116, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 93, 115 и 116 приведены в таблице 14.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 114, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 115, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 116, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 114, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 115, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 116.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 117. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-

нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 117. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 117. SEQ ID NO: 117 приведена в таблице 14 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 118. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 118. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 118. SEQ ID NO: 118 приведена в таблице 14 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 117, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 118. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CLEC12A-нацеленного химерного рецептора должны быть

связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась вариабельная область тяжелой цепи (V_H). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, вариабельные области расположены от N-до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 119, которая приведена в таблице 14. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный scFv обозначен «CLEC12A-G». CDR, приведенные в таблице 14, идентифицированы в соответствии с системой нумерации IMGT.

Таблица 14 (CLEC12A-G)

CDR	1	2	3
V_H	GFTFSSYG [SEQ ID NO: 89]	ISYDGSDK [SEQ ID NO: 90]	ARDGQFYFDY [SEQ ID NO: 114]
V_L	QSVTSRY [SEQ ID NO: 115]	GAS [SEQ ID NO: 93]	QQDYNLPLT [SEQ ID NO: 116]
Полная V_H	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGEGLEWVTV ISYDGSDKYYADSVKGRFTISRDNKSTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQ FYFDYWGGTGLVTVSS [SEQ ID NO: 117]		
Полная V_L	EIVMTQSPATLSLSPGESATLSCRASQSVTSRYLSWYQQKPGQAPRLLMYG ASTRPTGIPARFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNLPLTFGGGTK VEIK [SEQ ID NO: 118]		
V_H - V_L scFv	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGEGLEWVTV ISYDGSDKYYADSVKGRFTISRDNKSTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQ FYFDYWGGTGLVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGE SATLSCRASQSVTSRYLSWYQQKPGQAPRLLMYGASTRPTGIPARFSGSGG TDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNLPLTFGGGTKVEIK [SEQ ID NO: 119]		

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 120, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 121, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 122, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 120-122 приведены в таблице 15.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в

SEQ ID NO: 123, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 124, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 125, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 123-125 приведены в таблице 15.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 120, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 121, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 122, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 123, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 124, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 125, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 120, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 121, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 122, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 123, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 124, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 125.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен химерного рецептора (например, scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 126. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен химерного рецептора (например, scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно

100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 126. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 126. SEQ ID NO: 126 приведена в таблице 15 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен химерного рецептора (например, scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 127. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен химерного рецептора (например, scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 127. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 127. SEQ ID NO: 127 приведена в таблице 15 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 126, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 127. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CLEC12A-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась переменная область тяжелой цепи (V_H). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, переменные области расположены от N-до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 128, которая приведена в таблице 15. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный scFv обозначен «CLEC12A-H». CDR, приведенные в таблице 15, идентифицированы в

соответствии с системой нумерации IMGT.

Таблица 15 (CLEC12A-H)

CDR	1	2	3
V _H	GFTFSNYG [SEQ ID NO: 120]	ISYDGS DK [SEQ ID NO: 121]	ARDSGRYFFDY [SEQ ID NO: 122]
V _L	QSVSSRS [SEQ ID NO: 123]	GPS [SEQ ID NO: 124]	HQDYNLPLT [SEQ ID NO: 125]
Полная V _H	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWV AVISYDGS DKSYKDSVKGRFTIARDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSGRYFFDYWGQGLTVTVSS [SEQ ID NO: 126]		
Полная V _L	EIIMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSRSLSWYQHKGPGQAPRLLIYGPSTRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCHQDYNLPLTFGGGTVKVEIK [SEQ ID NO: 127]		
V _H -V _L scFv	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWV AVISYDGS DKSYKDSVKGRFTIARDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSGRYFFDYWGQGLTVTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSEIIMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSRSLSWYQHKGPGQAPRLLIYGPSTRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCHQDYNLPLTFGGGTVKVEIK [SEQ ID NO: 128]		

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 129, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 130, или ее консервативную модификацию, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 131, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 129-131 приведены в таблице 16.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 132, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 133, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 134, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 132-134 приведены в таблице 16.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv)

содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 129, или ее консервативную модификацию, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 130, или ее консервативную модификацию, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 131, или ее консервативную модификацию, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 132, или ее консервативную модификацию, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 133, или ее консервативную модификацию, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 134, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 129, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 130, V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 131, V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 132, V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 133, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 134.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 135. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 135. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 135. SEQ ID NO: 135 приведена в таблице 16 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv)

содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80% (например, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95%) гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 136. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, которая является на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100% гомологичной или идентичной SEQ ID NO: 136. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 136. SEQ ID NO: 136 приведена в таблице 16 ниже.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора (например, CLEC12A-нацеленного scFv) содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 135, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 136. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CLEC12A-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась переменная область тяжелой цепи (V_H). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, переменные области расположены от N-до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 137, которая приведена в таблице 16. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный scFv обозначен «CLEC12A-J». CDR, приведенные в таблице 16, идентифицированы в соответствии с системой нумерации IMGT.

Таблица 16 (CLEC12A-J)

CDR	1	2	3
-----	---	---	---

V_H	GFTFSKYG [SEQ ID NO: 129]	IWYDGSIK [SEQ ID NO: 130]	ARGSLWFGEFYFDY [SEQ ID NO: 131]
V_L	QGISSA [SEQ ID NO: 132]	DAS [SEQ ID NO: 133]	QQFNYPRT [SEQ ID NO: 134]
Полная V_H	QVKLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSKYGMHWVRQAPGKGLEWV AFIWYDGSIKNYADSVKGRFTTSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGS�WFGEFYFDYWGQGTЛTVSS [SEQ ID NO: 135]		
Полная V_L	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQGISSALAWYQQKPGKTPKLLIYDAS SLESGVPSRFSGSSTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNYPRTFGQGTKV EIK [SEQ ID NO: 136]		
V_H - V_L scFv	QVKLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSKYGMHWVRQAPGKGLEWV AFIWYDGSIKNYADSVKGRFTTSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGS�WFGEFYFDYWGQGTЛTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSAIQLTQS PSSLSASVGDRVTITCRTSQGISSALAWYQQKPGKTPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSSTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNYPRTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 137]		

Аминокислотные последовательности V_H и/или V_L , имеющие по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95% (например, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) гомологии или идентичности с конкретной последовательностью (например, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 135 или SEQ ID NO: 136) могут содержать замены (например, консервативные замены), вставки или делеции по сравнению с конкретной(ыми) последовательностью(ями), но сохранять способность связываться с антигеном-мишенью (например, CLEC12A). В некоторых вариантах осуществления замещено, вставлено и/или удалено в целом от 1 до 10 аминокислот в конкретной последовательности (например, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 135 или SEQ ID NO: 136). В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или

делеции находятся в областях за пределами CDR (например, в FR) внеклеточного антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит последовательность V_H и/или V_L , выбранную из SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 135 или SEQ ID NO: 136, включая посттрансляционные модификации этой последовательности (SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 135 или SEQ ID NO: 136).

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного химерного рецептора перекрестно конкурирует за связывание с CLEC12A с эталонным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащими последовательности V_H CDR1, CDR2 и CDR3 и последовательности V_L CDR1, CDR2 и CDR3, например, любого из описанных в настоящем изобретении (например, CLEC12A-A, CLEC12A-B, CLEC12A-C, CLEC12A-D, CLEC12A-E, CLEC12A-F, CLEC12A-G, CLEC12A-H и CLEC12A-J). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении химерного рецептора перекрестно конкурирует за связывание с CLEC12A с эталонным антителом или его антигенсвязывающей частью, содержащими последовательности V_H и V_L , например, любого из описанных в настоящем изобретении scFv (например, CLEC12A-A, CLEC12A-B, CLEC12A-C, CLEC12A-D, CLEC12A-E, CLEC12A-F, CLEC12A-G, CLEC12A-H и CLEC12A-J).

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного химерного рецептора перекрестно конкурирует за связывание с CLEC12A с эталонным антителом или его антигенсвязывающей частью, содержащими последовательности V_H CDR1, CDR2 и CDR3 и последовательности V_L CDR1, CDR2 и CDR3 scFv CLEC12A-A. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного химерного рецептора перекрестно конкурирует за связывание с CLEC12A с эталонным антителом или его антигенсвязывающей частью, содержащими V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70; V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71; V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72; V_L CDR2, содержащую аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73; и V_L CDR3, содержащую аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного

химерного рецептора перекрестно конкурирует за связывание с CLEC12A с эталонным антителом или его антигенсвязывающей частью, содержащими последовательности V_H и V_L scFv CLEC12A-A. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного химерного рецептора перекрестно конкурирует за связывание с CLEC12A с эталонным антителом или его антигенсвязывающей частью, содержащими V_H , содержащую аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75, и V_L , содержащую аминокислоты, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанных в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленных химерных рецепторов связывается с тем же самым эпитопом на CLEC12A, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающая часть. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного химерного рецептора связывается с тем же эпитопом на CLEC12A, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащие последовательности V_H CDR1, CDR2 и CDR3 и последовательности V_L CDR1, CDR2 и CDR3, например, любого из описанных в настоящем изобретении scFv (например, CLEC12A-A, CLEC12A-B, CLEC12A-C, CLEC12A-D, CLEC12A-E, CLEC12A-F, CLEC12A-G, CLEC12A-H и CLEC12A-J). В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного химерного рецептора связывается с тем же эпитопом на CLEC12A, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащие последовательности V_H и V_L , например, любого из описанных в настоящем изобретении scFv (например, CLEC12A-A, CLEC12A-B, CLEC12A-C, CLEC12A-D, CLEC12A-E, CLEC12A-F, CLEC12A-G, CLEC12A-H и CLEC12A-J).

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного химерного рецептора связывается с тем же эпитопом на CLEC12A, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающая часть, содержащие последовательности V_H CDR1, CDR2 и CDR3 и последовательности V_L CDR1, CDR2 и CDR3 scFv CLEC12A-A. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного химерного рецептора связывается с тем же эпитопом на CLEC12A, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие V_H CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69, V_H CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70; V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71; V_L CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72; V_L CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73; и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного

химерного рецептора связывается с тем же или практически тем же эпитопом на CLEC12A, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательности V_H и V_L scFv CLEC12A-A. Например, внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного химерного рецептора связывается с тем же эпитопом на CLEC12A, что и эталонное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76.

Внеклеточные антигенсвязывающие домены описанных в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленных химерных рецепторов, которые перекрестно конкурируют или конкурируют с эталонным антителом или его антигенсвязывающими частями за связывание с CLEC12A, можно идентифицировать, используя рутинные способы, известные в данной области техники, например, описанные в разделе 5.3.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного химерного рецептора содержит линкер, соединяющий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи внеклеточного антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 149.

В некоторых вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CLEC12A-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась переменная область тяжелой цепи (V_H). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, переменные области расположены от N-до C-конца: V_H - V_L .

В некоторых вариантах осуществления переменные области во внеклеточном антигенсвязывающем домене CLEC12A-нацеленного химерного рецептора должны быть связаны одна за другой так, чтобы на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена размещалась переменная область легкой цепи (V_L). В некоторых вариантах осуществления, если внеклеточный антигенсвязывающий домен CLEC12A-нацеленного химерного рецептора представляет собой scFv, переменные области расположены от N-

до С-конца: V_L - V_H .

Кроме того, CLEC12A-нацеленный химерный рецептор может содержать лидерный или сигнальный пептид, который направляет растущий белок в эндоплазматический ретикулум. В некоторых вариантах осуществления лидерный или сигнальный пептид расположен на N-конце (например, ковалентно присоединен к нему) внеклеточного антигенсвязывающего домена CLEC12A-нацеленного химерного рецептора. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный химерный рецептор содержит лидерные или сигнальные пептиды, описанные в разделе 5.3. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный химерный рецептор содержит сигнальный пептид, который содержит полипептид CD8. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный химерный рецептор содержит сигнальный пептид, который содержит полипептид CD8, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 63.

5.6. Типовой CLEC12A-нацеленный химерный рецептор

В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный химерный рецептор представляет собой CCR. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный CCR содержит (a) внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i) V_H , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71, и (ii) V_L , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74; (b) внутриклеточный домен, содержащий полипептид 4-1BB (например, человеческий полипептид 4-1BB, например, внутриклеточный домен 4-1BB (например, человеческого 4-1BB) его часть). В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный CCR дополнительно содержит трансмембранный домен, содержащий полипептид CD8 (например, человеческий полипептид CD8, например, трансмембранный домен CD8 (например, человеческого CD8) или его часть). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит полипептид 4-1BB, содержащий или состоящий из аминокислот от 214 до 255 из SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит полипептид CD8, содержащий или состоящий из аминокислот от 137 до 207 из SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L расположены от N- до С-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 150. В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный CCR

содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 138, которая приведена ниже.

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSTYYWGWIRQPPRKGLEWIGSTHY
 RGSTYYNPSLKS RVTVISVDTSKNQFSLKVSSVTAADTAVYYCARELTGEVFDYWGGQTL
 VTVSSASTGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQ
 QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPFTF
 GPGTKVDIKRAAAPTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY
 IWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCNKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
 GGCEL [SEQ ID NO: 138]

Типовая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138, приведена в SEQ ID NO: 139, которая приведена ниже.

cagctccagctccaagagtcagggccaggtctcgtgaaaccgagtgagacctgtccctgacctgcacagtgagtgggtggtac
 aatctcaagctctactactattgggggtgattcgccagccccctagaaaggggcttgagtgattggcagcactcattatcgaggatctac
 ctattataatccttctctgaaaagcagagttaccatctctgtggatacgtccaaaatcagttcagctgaaggtatcatccgtgactgctgccga
 cacggccgtgtactattgctgcgagggagctgacaggtgaggtctttgactactggggccagggcacactcgtgacctgtcttctgcctca
 acaggaggggtgggagtgaggcggtggatcagggggaggaggagtgacatccagatgacgcagtccccttcagcttgccgcat
 ctgtgggtgatagggtcacgattacatgtagggctagtcagagtatttctagttacctgaattggtaccagcagaaccaggcaaggcacca
 aagttgctcatctatcgcgctcctctctgcaatctggcgtgccgtccagatttagtgatcaggctccggaaccgatttcacccttacgatctc
 ctacttcaaccgaggatttcgccacatattactgtcaacaagctattctacaccttcaccttcggaccggggacaaaagtgatattaaa
 cgggcccgcgccccaccacgacgcccagcgcgcccaccaccaacccggcgcccacgatcgcgtgcagcccctgtccctgcgccc
 agaggcgtgccggccagcggcgggggcgagtgacacaggggggctggacttcgctgtgatactacatctggcgcccctggcc
 gggactgtgggtccttctctgtcactggttatcaccctttactgcaacaacggggcagaagaagctcctgtatattcaacaaccatt
 tatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttcagaagaagaaggaggatgtgaactg [SEQ ID
 NO: 139]

В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный химерный рецептор содержит сигнальный пептид на N-конце внеклеточного антигенсвязывающего домена. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид содержит полипептид CD8, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 63.

5.7. Клетки

Раскрытый в настоящем описании объект изобретения относится к клеткам, содержащим описанный в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленный химерный рецептор (например, описанный в разделах 5.3 и 5.4). Кроме того, раскрытый в настоящем описании объект изобретения относится к клеткам, содержащим описанный в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленный химерный рецептор (например, описанный в разделах 5.5 и 5.6).

В некоторых вариантах осуществления клетка выбрана из группы, состоящей из клеток лимфоидной линии дифференцировки и клеток миелоидной линии дифференцировки. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой иммунореактивную клетку. В некоторых вариантах осуществления иммунореактивная

клетка представляет клетку лимфоидной линии дифференцировки.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет клетку лимфоидной линии дифференцировки. Клетки лимфоидной линии дифференцировки могут обеспечить выработку антител, регуляцию клеточной иммунной системы, выявление чужеродных агентов в крови, выявление клеток, чужеродных для хозяина и т. п. Неограничивающие примеры клеток лимфоидной линии дифференцировки включают Т-клетки, естественные клетки-киллеры (NK), В-клетки, дендритные клетки и стволовые клетки, из которых могут дифференцироваться лимфоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку (ESC) или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC).

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку. Т-клетки могут представлять собой лимфоциты, которые созревают в вилочковой железе и главным образом ответственны за клеточно-опосредованную иммунность. Т-клетки являются частью адаптивной иммунной системы. Т-клетки по описанному в настоящем изобретении предмету изобретения могут представлять собой любой тип Т-клеток, включая, но не ограничиваясь этим, хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, Т-клетки памяти (включая Т-клетки центральной памяти, подобные стволовым клеткам Т-клетки памяти (или подобные стволовым Т-клетки памяти) и два типа эффекторных Т-клеток памяти: например, клетки TEM и клетки TEMRA), регуляторные Т-клетки (также известные как супрессивные Т-клетки), опухоль-инфильтрирующий лимфоцит (ОИЛ), естественные Т-клетки-киллеры, мукозальные инвариантные Т-клетки и $\gamma\delta$ Т-клетки. Цитотоксические Т-клетки (ЦТЛ или Т-клетки-киллеры) представляют подгруппу Т-лимфоцитов, способных индуцировать гибель инфицированных соматических или опухолевых клеток. Собственные Т-клетки пациента можно генетически модифицировать для нацеливания на конкретные антигены путем внесения химерного рецептора, например, CAR или CCR. В некоторых вариантах осуществления иммунореактивная клетка представляет собой Т-клетку. Т-клетка может представлять собой $CD4^+$ Т-клетку или $CD8^+$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой $CD4^+$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой $CD8^+$ Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой NK-клетку. Естественные клетки-киллеры (NK) могут представлять собой лимфоциты, которые являются частью клеточно-опосредованной иммунности и действуют во время врожденного иммунного ответа. Для NK-клеток не нужна предварительная активация для осуществления цитотоксического действия на клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой генетически модифицированную NK-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой отредактированную NK-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой NK-клетку,

полученную из стволовой клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой НК-клетку, полученную из плюрипотентной стволовой клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой полученную из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPSC) НК-клетку.

Типы лимфоцитов по описанному в настоящем изобретении предмету изобретения включают, без ограничения, периферические донорные лимфоциты например, описанные в Sadelain et al., *Nat Rev Cancer* (2003); 3:35-45 (где описаны периферические донорные лимфоциты, генетически модифицированные для экспрессии CAR), в Morgan, R.A., et al. 2006 *Science* 314:126-129 (где описаны периферические донорные лимфоциты, генетически модифицированные для экспрессии полноразмерного распознающего опухолевый антиген комплекса Т-клеточного рецептора, содержащего гетеродимер α и β), в Panelli et al., *J Immunol* (2000);164:495-504; Panelli et al., *J Immunol* (2000);164:4382-4392 (где описаны культуры лимфоцитов, полученные из опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в опухолевых биопсиях) и в Dupont et al., *Cancer Res* (2005);65:5417-5427; Papanicolaou et al., *Blood* (2003);102:2498-2505 (где описаны селективно *in vitro* размноженные антиген-специфические лейкоциты периферической крови с применением искусственных антигенпрезентирующих клеток (ИАПК) или импульсно обработанных дендритных клеток).

Клетки (например, Т-клетки или НК-клетки) могут быть аутологичными, неаутологичными (например, аллогенными) или полученными *in vitro* из сконструированных клеток-предшественников или стволовых клеток.

Клетки по описанному в настоящем изобретении предмету изобретения могут быть клетками миелоидной линии дифференцировки. Неограничивающие примеры клеток миелоидной линии дифференцировки включают моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, базофилы, нейтрофилы, эозинофилы, мегакариоциты, тучные клетки, эритроциты, тромбоциты и стволовые клетки, из которых могут дифференцироваться миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку (например, эмбриональную стволовую клетку или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку).

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении клетки способны модулировать опухолевое микроокружение. Опухоли имеют микроокружение, которое враждебно настроено против иммунного ответа хозяина за счет ряда механизмов, осуществляемых злокачественными клетками для своей защиты от иммунного распознавания и устранения. Это «враждебное опухолевое микроокружение» содержит ряд иммуносупрессивных факторов, включая инфильтрирующие регуляторные CD4⁺ Т-клетки (Treg), миелоидные супрессорные клетки (МСК), опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ), иммуносупрессивные цитокины, включая TGF- β , и экспрессию лигандов, нацеленных на иммуносупрессивные рецепторы, экспрессируемые активированными Т-клетками (CTLA-4 и PD-1). Эти механизмы иммунной супрессии играют роль в поддержании толерантности и супрессии неприемлемых иммунных ответов, однако в

опухолевом микроокружении эти механизмы предотвращают эффективный противоопухолевый иммунный ответ. Вместе эти иммунные супрессивные факторы могут индуцировать заметную анергию или апоптоз адаптивно перенесенных модифицированных Т-клеток после взаимодействия с опухолевыми клетками-мишенями.

В некоторых вариантах осуществления клетки можно трансдуцировать описанным в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленным химерным рецептором и/или описанным в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленным химерным рецептором так, чтобы клетки экспрессировали химерный(е) рецептор(ы).

Кроме того, раскрытый в настоящем описании объект изобретения относится к клеткам, содержащим описанный в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленный химерный рецептор (например, описанный в разделе 5.3) и описанный в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленный химерный рецептор (например, описанный в разделе 5.4). В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный химерный рецептор представляет собой CAR. В некоторых вариантах осуществления CLEC12-нацеленный химерный рецептор представляет собой CCR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании объект изобретения относится к клеткам, содержащим описанный в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленный CAR и описанный в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленный CCR.

В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении клетки демонстрируют большую степень цитолитической активности против клеток, которые являются положительными в отношении как ADGRE2, так и CLEC12A, по сравнению с клетками, которые являются положительными только в отношении ADGRE2. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный CAR связывается с ADGRE2 с низкой аффинностью связывания или низкой авидностью связывания. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный CAR связывается с ADGRE2 в эпитопе низкой доступности. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный CAR связывается с ADGRE2 с аффинностью связывания, которая ниже по сравнению с аффинностью связывания, с которой CLEC12A-нацеленный CCR связывается с CLEC12A. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный CAR связывается с ADGRE2 с аффинностью связывания, которая по меньшей мере в 5 раз ниже по сравнению с аффинностью связывания, с которой CLEC12A-нацеленный CCR связывается с CLEC12A. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный CAR связывается с ADGRE2 с аффинностью связывания, которая по меньшей мере в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 200 раз, 500 раз, 1000 раз, 5000 раз или 10000 раз ниже по сравнению с аффинностью связывания, с которой CLEC12A-нацеленный CCR связывается с CLEC12A.

5.5.1. Типовые клетки

В некоторых вариантах осуществления клетка содержит ADGRE2-нацеленный CAR и CLEC12A-нацеленный CCR.

В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный CAR содержит (а)

внклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i) а V_H , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, и (ii) V_L , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38; (b) шарнирную/спейсерную область, содержащую полипептид CD28, (c) трансмембранный домен, содержащий полипептид CD28 (например, трансмембранный домен CD28 человека или его фрагмент), и (d) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий (i) полипептид CD3 ζ и (ii) а костимулирующую сигнальную область, содержащую полипептид CD28 (например, внутриклеточный домен CD28 человека или его фрагмент). В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L расположены от N- до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит полипептид CD28, содержащий или состоящий из аминокислот от 153 до 179 из SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления костимулирующая сигнальная область содержит полипептид CD28, содержащий или состоящий из аминокислот от 180 до 220 из SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления шарнирная/спейсерная область содержит полипептид CD28, содержащий или состоящий из аминокислот от 114 до 152 из SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления ADGRE2-нацеленный CAR содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 66.

В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный CCR содержит (a) внклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий (i) а V_H , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, и V_H CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71, и (ii) V_L , которая содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, и V_L CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74; (b) внутриклеточный домен, содержащий полипептид 4-1BB (например, человеческий полипептид 4-1BB, например, внутриклеточный домен 4-1BB (например, человеческого 4-1BB) его часть). В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный CCR дополнительно содержит трансмембранный домен, содержащий полипептид CD8 (например, человеческий полипептид CD8, например, трансмембранный домен CD8 (например, человеческого CD8) или его часть). В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный домен содержит полипептид 4-1BB, содержащий или состоящий из аминокислот от 214 до 255 из SEQ ID

NO: 30. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит полипептид CD8, содержащий или состоящий из аминокислот от 137 до 207 из SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L связаны посредством линкера, содержащего или состоящего из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L расположены от N- до C-конца: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления CLEC12A-нацеленный CCR содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 136.

5.8. Молекулы нуклеиновых кислот, векторы и генетические модификации

Раскрытый в настоящем описании объект изобретения относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим описанные в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленные химерные рецепторы (например, описанные в разделах 5.3 и 5.4). В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит промотор, который функционально связан с описанным в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленным CAR. Также предложены клетки, содержащие такие молекулы нуклеиновых кислот.

Кроме того, раскрытый в настоящем описании объект изобретения относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим описанные в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленные химерные рецепторы (например, описанные в разделах 5.5 и 5.6). В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит промотор, который функционально связан с описанным в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленным CAR. Также предложены клетки, содержащие такие молекулы нуклеиновых кислот.

Кроме того, описанный в настоящем описании объект изобретения относится к композициям нуклеиновых кислот, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую ADGRE2-нацеленный химерный рецептор, и молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CLEC12A-нацеленный химерный рецептор. Также предложены клетки, содержащие такие композиции нуклеиновых кислот.

В некоторых вариантах осуществления промотор является эндогенным или экзогенным. В некоторых вариантах осуществления экзогенный промотор выбран из группы, состоящей из промотора фактора элонгации (EF)-1, немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV), раннего промотора вируса обезьян 40 (SV40), промотора фосфоглицераткиназы (PGK), промотора металлотионеина и промотора убиквитина С. В некоторых вариантах осуществления эндогенный промотор выбран из промотора TCR альфа, промотора TCR бета и промотора бета 2-микроглобулина. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой индуцибельный промотор. В некоторых вариантах осуществления индуцибельный промотор выбран из группы, состоящей из промотора транскрипционного элемента NFAT (TRE), промотора CD69, промотора CD25, промотора IL-2, промотора 4-1BB, промотора PD1 и промотора LAG3.

Раскрытый в настоящем описании объект изобретения также относится к векторам,

содержащим описанные в настоящем изобретении молекулы нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор представляет собой гамма-ретровирусный вектор или лентивирусный вектор.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленный CAR и описанный в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленный CCR. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 140. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 141. SEQ ID NO: 140 и 141 приведены ниже.

MALPVTALLLPLALLLHAQVQLQQSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQ
WIKQAPGQGLEWIGAVYPGDGDTRHTQKFKGKATLTADKSTSTAYMEVSSLRSEDNAV
YYCARGFTAYGMDYWGQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATMSASPGE
RVTMSCSASSSVSYMHWYQQKSGQSPKRWIYDTSKLAGVPARFSGSGSGTDYTFITSS
MEPEDFATYYCQWSSNPLTFGGGKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGK
HLCPSPLFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYLLVTVAFIIFWVRSKRSLLHSDYMNMTPR
RPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL
DKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLFNELQKDKMAEAFSEIGMKGERRRGKGHDGLFQG
LSTATKDTFDALHMQUALPPRSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLLPLALLLH
AQLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSTYYWGWIRQPPRKGLEWIGSTHYRGST
YYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKVSSVTAADTAVYYCARELTGEVFDYWGQGLVTV
SSASTGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKP
GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGPGT
KVDIKRAAAPTTTTAPRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
LAGTCGVLLLSLVITLYCNKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE
L [SEQ ID NO: 140]

GGATTAGTCCAATTTGTAAAGACAGGATATCAGTGGTCCAGGCTCTAGTTTT
GACTCAACAATATCACCAGCTGAAGCCTATAGAGTACGAGCCATAGATAAAAATAAA
AGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTT
GGCAAGCTAGCTTAAGTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAG
AATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCA
AACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGG
AACAGCTGAATATGGGCCAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCT
CAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAG
AACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTT
GAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTC
AATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTC

GCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCT
CGCTGTTCCCTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTT
TCACATGCAGCATGTATCAAAATTAATTTGGTTTTTTTTCTTAAGTATTTACATTA
TGGCCATAGTACTTAAAGTTACATTGGCTTCCTTGAATAAACATGGAGTATTCAGA
ATGTGTCATAAATATTTCTAATTTTAAGATAGTATCTCCATTGGCTTTCTACTTTTTCT
TTATTTTTTTTTGTCCCTCTGTCTTCCATTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
TTGGTTGGTTGGTTAATTTTTTTTTAAAGATCCTACACTATAGTTCAAGCTAGACTAT
TAGCTACTCTGTAACCCAGGGTGACCTTGAAGTCATGGGTAGCCTGCTGTTTTAGCC
TTCCCACATCTAAGATTACAGGTATGAGCTATCATTTTTGGTATATTGATTGATTGAT
TGATTGATGTGTGTGTGTGTGATTGTGTTTGTGTGTGTGATTGTGTATATGTGTGTAT
GGTTGTGTGTGATTGTGTGTATGTATGTTTGTGTGTGATTGTGTGTGTGTGATTGTGC
ATGTGTGTGTGTGTGATTGTGTTTATGTGTATGATTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATATATATTTATGGTAGTGAGAGGCAAC
GCTCCGGCTCAGGTGTCAGGTTGGTTTTTGAGACAGAGTCTTTCACTTAGCTTGGAA
TTCCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCA
ACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCG
CACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCG
GTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCCTCTCAGT
ACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCT
GACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACC
GTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGA
CGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTT
TCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTA
TTTTTTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATG
CTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCGAG
GCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGA
TAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGATGCGCC
AGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGA
TGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTA
TCCGTA
CTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGAAAAACAGCAT
TCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAG
TGTTCCCTGCGCCGTTGCATTCGATTCTGTTTGTAAATTGCCTTTTAAACAGCGATCG
CGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAG
TGATTTT
GATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGC
ATAAACTTTTGCATTCTCACC GGATT CAGTCGTC ACTCATGGTGATT TCTCACTTGA
TAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGG
AATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGGA
ACTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTACATTACAGAAACGGCTTTTTCA
AAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAA
TAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTCTAACTGTCAGACCAAGTTTAC
TCATATATACTTTAGATTGATTTAA
AACTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGA

AGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTG
AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCG
CGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCC
GGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGAT
ACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGT
AGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG
CGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGC
AGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACC
TACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGA
AGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGC
ACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGC
CACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGG
AAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTC
ACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGA
GTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCG
AGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATT
CATTAAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAA
CGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTT
CCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG
CTATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGCTCTTAGGAGTTTCCTAATACATCCCAAAC
TCAAATATATAAAGCATTGACTTGTCTATGCCCTAGGGGGCGGGGGGAAGCTAA
GCCAGCTTTTTTTAACATTTAAAATGTTAATTCCATTTTAAATGCACAGATGTTTTTA
TTTCATAAGGGTTTCAATGTGCATGAATGCTGCAATATTCCTGTTACCAAAGCTAGT
ATAAATAAAAATAGATAAACGTGGAAATTACTIONTAGAGTTTCTGTCATTAACGTTTCC
TTCCTCAGTTGACAACATAAATGCGCTGCTGAGAAGCCAGTTTGCATCTGTCAGGAT
CAATTTCCATTATGCCAGTCATATTAATTACTAGTCAATTAGTTGATTTTTATTTTT
GACATATACATGTGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAACG
CCATTTTGCAAGGCATGGAAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAG
GTCAGGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCA
GTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACAGCTGAATATGGGCCAAAC
AGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCC
CCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTG
CCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTC
TCGCTTCTGTTGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAAGAGCCCACAACCCT
CACTCGGCGCGCCAGTCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGTACCCGTGTATCCAAT
AAACCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCCTGGGAGGGTCTCCT
CTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTTCAATTTGGGGGCTCGTCCGGGATC
GGGAGACCCCTGCCAGGGACCACCGACCCACCACCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCA
ACTTATCTGTGTCTGTCCGATTGTCTAGTGTCTATGACTGATTTTATGCGCCTGCGTC
GGTACTAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATCTGGCGGACCCGTGGTGGAACTGACGAGT

TCGGAACACCCGGCCGCAACCCTGGGAGACGTCCCAGGGACTTCGGGGGCCGTTTT
TGTGGCCCGACCTGAGTCCTAAAATCCCGATCGTTTAGGACTCTTTGGTGCACCCCC
CTTAGAGGAGGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAAACAGTTCCCGC
CTCCGTCTGAATTTTTGCTTTCGGTTTGGGACCGAAGCCGCGCCGCGCGTCTTGTCTG
CTGCAGCATCGTTCTGTGTTGTCTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAAT
ATGGGCCCGGGCTAGACTGTTACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTC ACTGGAAA
GATGTCGAGCGGATCGCTCACAACCAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGT
TACCTTCTGCTCTGCAGAATGGCCAACCTTTAACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCAC
CTTTAACCGAGACCTCATCACCCAGGTTAAGATCAAGGTCCTTTTACCTGGCCCCGA
TGGACACCCAGACCAGGTCCCCTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTGACCC
CCCTCCCTGGGTCAAGCCCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCCTCCTCTTCCCTCATCC
GCCCCGTCTCTCCCCCTTGAACCTCCTCGTTTCGACCCCGCCTCGATCCTCCCTTTATC
CAGCCCTCACTCCTTCTCTAGGCGCCCCCATATGGCCATATGAGATCTTATATGGGG
CACCCCGCCCCTTGTAACCTCCTGACCCTGACATGACAAGAGTTACTAACAGCC
CCTCTCTCAAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTTAGTCCAGCACGAAGTCTGGAGAC
CTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACA ACTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACC
GAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCCGCCGACACCAGACTAAGAACCTAGAACCTCGC
TGGAAGGACCTTACACAGTCCTGCTGACCACCCCAACCGCCCTCAAAGTAGACGG
CATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCACGTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGGTGGAC
CATCCTCTAGACTGCCatggctctcccagtgactgcctactgcttcccctagcgttctcctgcatgcacaagttcagctcca
gcagagcggcgcgaagtggcaaacgctggagcgtcagcaagctgtcctgcaaagcagtggtatacgttcacgaactactggatgc
agtggataaagcaggctcccgggcagggctctggagtggtggagcctctaccaggggacggcgacaccggcactcaaaagtt
caagggcaaggccaccctgaccgctgacaagagcacaagcacagcgtacatggagtgctctctttgagatccgaagataccgctgtgta
ttattgtccccgggcttactgcatacgggatggattactggggacaaggcactaccgtgactgtcagctccgggggtggaggctcaggc
ggggggggttcaggaggggggggatctgaaattgtctgacacagagccctgccacaatgtctgctagccctggcgagcgcgtgacat
gtctttagcgcagcagcagcgtgtcctacatgcatggatcaacagaagtccggcagctcccaagcggtgatctacgatacaagc
aagctggcctccggcgtgcccgcagatfttctggcagcggctctggaacagattacaccttcaccatcttagcatggaacctgaggatftt
gccactactattgccagcagtggtccagcaatcccctgacatttggaggaggaccaagctggaaattaagagagcggccgcaattgaa
gltatgtatcctccttacctagacaatgagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaaacaccttgtccaagtcacctattcc
cggaccttcaagcccttgggtgctggtggtggtggagctcctggcttctatagcttctagtaaacagtggccttattatttctgggtg
aggagtaagaggagcaggtcctgcacagtactacatgaacatgactccccgcccccggggccaccgcaagcattaccagcccta
tgccccaccacgcgacttgcagcctatcgtccagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaac
cagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaa
gccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtcaatgaactgcagaaagataagatggcggaggccttcagtgagattgggatgaaag
gcgagcgcgggaggggcaaggggcacgatggcctttccagggtctcagtacagccaccaaggacaccttcgacgcccttcatatgcag
gccctgccccctcgcggaagcggagctactaacctcagcctgctgaagcaggtggagacgtggaggagaacctggacctatggccct
gcccgtcaccgcttctctgccaactggccttctgctccacgctcagctccaagagttagggccaggtctctgaaaccgagtg
agacctgtccctgacctgcacagtgagtgggatcaatctcaagctctacctactattgggggtggattcggcagccccctagaagg
gcttgagtggtggcagcactcattatcgaggatctacctattataatccttctgaaagcagagttaccatctctgtggatacgtccaaa
atcagttcagctgaaggtatcatccgtgactgctgccgacacggcctgtactattgcgagggagctgacaggtgaggtctttgactact

ggggccagggcacactcgtgaccgtgtcttctgcctcaacaggaggggggtgggagtgaggcggtggatcagggggaggaggagtg
 acatccagatgacgcagtcctccagcttgcgcgcatctgtgggtgatagggcagcattacatgtagggctagtcagagtatttctagtta
 cctgaattggtaccagcagaaaccaggcaaggcaccaaagtgtctcatctatcggcctctctgcaatctggcgtgccgtccagattta
 gtggatcaggctccggaaccgatttcacccttacgatctcctcaactcaaccggaggatttcgccacatattactgtcaacaagctattctaca
 ccgttcacctcggaccggggacaaaagtggatattaacggggcggccgccccaccacgacgccagcgccgaccaccaaccccg
 gcgcccacgatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcgggggggcgagtgcacacgagggggct
 ggacttcgctgtgatctacatctgggcgcccctggccgggacttgggggtccttctctgtcactgggtatcacccttactgcaacaac
 ggggcagaaagaagctcctgtatatattcaacaaccatttatgagaccagtaacaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttc
 cagaagaagaaggaggatgtgaactgtaaCAGCCACTCGAGGATCC [SEQ ID NO: 141]

Молекулы нуклеиновых кислот можно доставлять в клетки известными в данной области техники способами или как описано в настоящем описании. Генетическую модификацию клетки можно осуществлять путем трансдукции практически гомогенной композиции клеток рекомбинантной конструкцией ДНК. В некоторых вариантах осуществления для внесения конструкции ДНК в клетку используют ретровирусный вектор (например, гамма-ретровирусный вектор или лентивирусный вектор). Например, полинуклеотид, кодирующий описанный в настоящем изобретении химерный рецептор, можно клонировать в ретровирусный вектор, а экспрессией может управлять его эндогенный промотор, ретровирусный длинный концевой повтор или промотор, специфический для представляющего интерес типа клеток-мишеней. Также можно использовать невирусные векторы.

Для исходной генетической модификации клетки для включения по меньшей мере одного описанного в настоящем изобретении химерного рецептора (например, описанных в настоящем изобретении химерных рецепторов, например, описанного в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленного химерного рецептора и описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного химерного рецептора) можно использовать ретровирусный вектор для трансдукции, однако можно использовать любые другие подходящие вирусный вектор или невирусную систему доставки. Химерный(е) рецептор(ы) можно конструировать в одной мультицистронной экспрессионной кассете, в нескольких экспрессионных кассетах в одном векторе или в нескольких векторах. Примеры элементов, которые создают полицистронные экспрессионные кассеты включают, но не ограничиваются этим, различные вирусные и невирусные участки внутренней посадки рибосом (IRES, например, FGF-1 IRES, FGF-2 IRES, VEGF IRES, IGF-II IRES, NF-κB IRES, RUNX1 IRES, p53 IRES, IRES гепатита А, IRES гепатита С, IRES пестивируса, IRES афтовируса, IRES пикорнавируса, IRES полиовируса и IRES вируса энцефаломиокардита) и расщепляемые линкеры (например, пептиды 2A, например, пептиды P2A, T2A, E2A и F2A). В некоторых вариантах осуществления пептид P2A содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 142, которая приведена ниже:

GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP [SEQ ID NO: 142]

Типовая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 142 приведена в 143, которая приведена ниже:

ggaagcggagctactaacttcagcctgctgaagcaggctggagacgtggaggagaaccctggacc [SEQ ID NO: 143]

Также подходят комбинации ретровирусного вектора и соответствующей пакующей линии, в которых капсидные белки будут функциональными для инфицирования человеческих клеток. Известны различные амфотропные вырабатывающие вирусы линии клеток, включая, но не ограничиваясь этим, PA12 (Miller *et al.*, (1985) *Mol Cell Biol* (1985);5:431-437); PA317 (Miller., *et al.*, *Mol Cell Biol* (1986); 6:2895-2902); и CRIP (Danos *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* (1988);85:6460-6464). Также подходят неамфотропные частицы, например, частицы, псевдотипированные оболочечными белками VSVG, RD114 или GALV, и любые другие, известные в данной области техники.

Возможные способы трансдукции также включают прямое совместное культивирование клеток с вырабатывающими клетками (Bregni *et al.*, *Blood* (1992);80:1418-1422) или культивирование с одним вирусным супернатантом или концентрированными векторными маточными растворами с соответствующими факторами роста и поликатионами или без них (Xu *et al.*, *Exp Hemat* (1994); 22:223-230; и Hughes *et al.* *J Clin Invest* (1992); 89:1817).

Для модификации клетки можно использовать другие трансдуцирующие вирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления выбранный вектор демонстрирует высокую эффективность инфицирования и стабильную интеграцию и экспрессию (смотрите, например, Cayouette *et al.*, *Human Gene Therapy* 8:423-430, 1997; Kido *et al.*, *Current Eye Research* 15:833-844, 1996; Bloomer *et al.*, *Journal of Virology* 71:6641-6649, 1997; Naldini *et al.*, *Science* 272:263-267, 1996; и Miyoshi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:10319, 1997). Другие вирусные векторы, которые можно использовать, включают, например, аденовирусные, лентивирусные и аденоассоциированные вирусные векторы, вирус осповакцины, папилломавирус крупного рогатого скота или вирус герпеса, такой как вирус Эпштейна - Барр (также смотрите, например, векторы в Miller, *Human Gene Thera* (1990);15-14; Friedman, *Science* 244:1275-1281, 1989; Eglitis *et al.*, *BioTechniques* (1988);6:608-614; Tolstoshev *et al.*, *Cur Opin Biotechnol* (1990); 1:55-61; Sharp, *The Lancet* (1991);337:1277-78; Cornetta *et al.*, *Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 36:311-22, 1987; Anderson, *Science* (1984);226:401-409; Moen, *Blood Cells* 17:407-16, 1991; Miller *et al.*, *Biotechnol* (1989);7:980-90; LeGal La Salle *et al.*, *Science* (1993);259:988-90; и Johnson, *Chest* (1995)107:77S- 83S). Ретровирусные векторы особенно хорошо разработаны и применялись в клинических условиях (Rosenberg *et al.*, *N Engl J Med* (1990);323:370, 1990; Anderson *et al.*, патент США № 5399346).

Для генетической модификации клетки также можно применять невирусные подходы. Например, молекулу нуклеиновой кислоты можно вносить в клетку путем введения нуклеиновой кислоты в присутствии липофекции (Feigner *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (1987);84:7413; Ono *et al.*, *Neurosci Lett* (1990);17:259; Brigham *et al.*, *Am J Med Sci* (1989);298:278; Staubinger *et al.*, *Methods in Enzymol* (1983);101:512, Wu *et al.*, *J Biol Chem*

(1988);263:14621; Wu et al., *J Biol Chem* (1989);264:16985) или путем микроинъекции в операционных условиях (Wolff et al., *Science* (1990);247:1465). Другие невирусные средства для переноса генов включают трансфекцию *in vitro* с использованием фосфата кальция, ДЭАЭ-декстран, электропорацию и слияние протопластов. Липосомы также могут быть потенциально полезны для доставки ДНК в клетку. Трансплантацию нормальных генов в пораженные ткани субъекта также можно осуществлять путем переноса нормальной нуклеиновой кислоты в культивируемый тип клеток *ex vivo* (например, аутологичные или гетерологичные первичные клетки или их потомство), после чего клетку (или ее потомство) вводят в целевую ткань или вводят систематически. Рекомбинантные рецепторы также можно получать, используя транспозазы или направленные нуклеазы (например, цинк-пальцевые нуклеазы, мегануклеазы или TALEN, CRISPR). Временную экспрессию можно обеспечивать путем электропорации РНК.

Также можно использовать любые направленные способы редактирования генома для доставки по меньшей мере одного описанного в настоящем изобретении химерного рецептора (например, двух описанных в настоящем изобретении химерных рецепторов, например, описанного в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленного химерного рецептора и описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного химерного рецептора) в клетку. В некоторых вариантах осуществления используют систему CRISPR для доставки по меньшей мере одного описанного в настоящем изобретении химерного рецептора (например, двух описанных в настоящем изобретении химерных рецепторов, например, описанного в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленного химерного рецептора и описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного химерного рецептора). В некоторых вариантах осуществления используют цинк-пальцевые нуклеазы для доставки по меньшей мере одного описанного в настоящем изобретении химерного рецептора (например, двух описанных в настоящем изобретении химерных рецепторов, например, описанного в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленного химерного рецептора и описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного химерного рецептора). В некоторых вариантах осуществления используют систему TALEN для доставки по меньшей мере одного описанного в настоящем изобретении химерного рецептора (например, двух описанных в настоящем изобретении химерных рецепторов, например, описанного в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленного химерного рецептора и описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного химерного рецептора).

Система коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR) представляет собой инструмент для редактирования генома, открытый в прокариотических клетках. В случае применения для редактирования генома эта система включает Cas9 (белок, способный модифицировать ДНК с использованием crРНК в качестве направляющей), CRISPR РНК (crРНК содержит РНК, используемую Cas9 для направления ее к подходящей секции ДНК хозяина наряду с областью, которая связывается с tracrРНК (в общем случае в форме шпилька - петля) с образованием активного комплекса

с Cas9), транс-активирующую crPНК (tracrPНК связывается с crPНК и образует активный комплекс с Cas9) и необязательную секцию матрицы репарации ДНК (ДНК, которая управляет процессом клеточной репарации, что позволяет вставлять конкретную последовательность ДНК). В CRISPR/Cas9 часто используют плазмиду для трансфекции клеток-мишеней. crPНК необходимо конструировать для каждого применения, поскольку она является последовательностью, которую Cas9 использует для идентификации и прямого связывания ДНК-мишени в клетке. Матрицу репарации, несущую экспрессионную кассету CAR, также необходимо конструировать для каждого применения, поскольку она должна перекрываться с последовательностями с другой стороны разреза и кодировать вставочную последовательность. Несколько crPНК и tracrPНК можно упаковывать вместе с образованием одинарной гидовой PНК (огPНК). ogPНК можно соединять вместе с геном Cas9 и встраивать в плазмиду с целью трансфекции в клетки.

Цинк-пальцевая нуклеаза (ZFN) представляет собой искусственный рестрикционный фермент, который создают путем объединения цинк-пальцевого ДНК-связывающего домена с ДНК-расщепляющим доменом. Цинк-пальцевый домен можно конструировать для нацеливания на конкретные последовательности ДНК, что позволяет цинк-пальцевой нуклеазе нацеливаться на необходимые последовательности в геноме. ДНК-связывающие домены отдельных ZFN, как правило, содержат несколько отдельных цинк-пальцевых повторов и могут каждый распознавать несколько пар оснований. Наиболее общепринятым способом создания нового цинк-пальцевого домена является объединение меньших цинк-пальцевых «модулей» с известной специфичностью. Наиболее общепринятым доменом расщепления в ZFN является домен неспецифического расщепления из рестрикционной эндонуклеазы типа II, FokI. Используя эндогенную машинерию гомологичной рекомбинации (ГР) и гомологичную ДНК-матрицу, несущую экспрессионную кассету CAR, можно использовать ZFN для вставки экспрессионной кассеты CAR в геном. Когда целевая последовательность расщепляется ZFN, машинерия ГР ищет гомологию между поврежденной хромосомой и гомологичной ДНК-матрицей, а затем копирует последовательность матрицы между двумя поврежденными концами хромосомы, за счет чего гомологичная ДНК-матрица интегрируется в геном.

Эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN) представляют собой рестрикционные ферменты, которые можно конструировать для разрезания конкретных последовательностей ДНК. Система TALEN функционирует практически по тому же принципу, что и ZFN. Их создают путем объединения ДНК-связывающего домена подобных активаторам транскрипции эффекторов и домена расщепления ДНК. Подобные активаторам транскрипции эффекторы (TALE) состоят из повторяющихся мотивов 33-34 аминокислот с двумя переменными позициями, которые характеризуются сильным распознаванием в отношении конкретных нуклеотидов. Путем сборки матриц этих TALE можно сконструировать ДНК-связывающий домен TALE для связывания с необходимой последовательностью ДНК и тем самым направить нуклеазу для разрезания конкретных локаций в геноме. Экспрессия кДНК для применения в способах

полинуклеотидной терапии может находиться под управлением любого подходящего промотора (например, человеческого цитомегаловируса (CMV), вируса обезьян 40 (SV40), промоторов металлотионеина или промотора убиквитина С) и регулироваться любым подходящим регуляторным элементом или интроном млекопитающего (например, энхансером/промотором/интронной структурой фактора элонгации 1а). Например, при необходимости, для управления экспрессией нуклеиновой кислоты можно использовать энхансеры, которые, как известно, преимущественно управляют генной экспрессией в конкретных типах клеток. Энхансеры могут включать, без ограничения, те, которые характеризуются как ткане- или клеточноспецифические энхансеры. В альтернативном варианте, если в качестве терапевтической конструкции используют геномный клон, регуляция может быть опосредована когнатными регуляторными последовательностями или, при необходимости, регуляторными последовательностями, полученными из гетерогенного источника, включая любые промоторы или регуляторные элементы, описанные выше.

Способы доставки агентов/систем для редактирования генома могут варьироваться в зависимости от потребностей. В некоторых вариантах осуществления компоненты выбранного способа редактирования генома доставляют в виде ДНК-конструкций в одной или более плазмидах. В некоторых вариантах осуществления компоненты доставляют посредством вирусных векторов. Общеизвестные способы доставки включают, но не ограничиваются этим, электропорацию, микроинъекцию, генную пушку, импалефекцию, гидростатическое давление, непрерывную инфузию, обработку ультразвуком, магнитофекцию, аденоассоциированные вирусы, псевдотипирование вирусных векторов оболочечными белками, цис- и транс-действующие элементы компетентных по репликации векторов, вирус простого герпеса и химические носители (например, олигонуклеотиды, липоплексы, полимеросомы, полиплексы, дендримеры, неорганические наночастицы и проникающие в клетки пептиды).

5.9. Составы и введение

Раскрытый в настоящем описании объект изобретения также относится к композициям, содержащим описанные в настоящем изобретении клетки (например, описанные в разделе 5.5). В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию, которая дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

Композиции, содержащие описанные в настоящем изобретении клетки, удобно предоставлять в виде стерильных жидких препаратов, например, изотонических водных растворов, суспензий, эмульсий, дисперсий или вязких композиций, которые можно забуферивать до выбранного рН. Жидкие препараты обычно легче готовить, чем гели, другие вязкие композиции и твердые композиции. Кроме того, жидкие композиции в некотором смысле более удобно вводить, особенно путем инъекции. Вязкие композиции, с другой стороны, можно составлять в пределах соответствующего диапазона вязкости для обеспечения более длительных периодов контакта с конкретными тканями. Жидкие или

вязкие композиции могут содержать носители, которые могут представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащие, например, воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль, и т. п.) и их подходящие смеси.

Композиции, содержащие описанные в настоящем изобретении клетки, можно применять систематически или непосредственно в отношении субъекта для индукции и/или усиления иммунного ответа на антиген и/или лечения и/или предотвращения новообразования. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем изобретении клетки или содержащие их композиции вводят непосредственно в представляющий интерес орган (например, орган, пораженный новообразованием). В альтернативном варианте описанные в настоящем изобретении клетки или содержащие их композиции вводят непрямо в представляющий интерес орган, например, путем введения в кровотоки (например, сосудистую систему опухоли). Агенты для размножения и дифференцировки можно вводить до, во время или после введения клеток или композиций для повышения выработки клеток *in vitro* или *in vivo*.

Число клеток для введения может варьироваться в зависимости от подлежащего лечению субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^{10} , от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^7 , от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^7 , от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^9 или от приблизительно 10^6 до приблизительно 10^8 описанных в настоящем изобретении клеток. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят от приблизительно 10×10^6 до приблизительно 150×10^6 описанных в настоящем изобретении клеток. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят от приблизительно 25×10^6 до приблизительно 150×10^6 описанных в настоящем изобретении клеток. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят от приблизительно 25×10^6 до приблизительно 50×10^6 описанных в настоящем изобретении клеток. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят по меньшей мере приблизительно 10×10^6 , приблизительно 25×10^6 , приблизительно 50×10^6 , приблизительно 100×10^6 или приблизительно 150×10^6 описанных в настоящем изобретении клеток. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят приблизительно 25×10^6 описанных в настоящем изобретении клеток. Точное определение того, что считать эффективной дозой, может быть основано на факторах, индивидуальных для каждого субъекта, включая их размер, возраст, пол, массу и состояние конкретного субъекта. Специалисты в данной области техники смогут легко установить дозировки на основании этого изобретения и знаний в данной области техники.

Описанные в настоящем изобретении клетки и композиции можно вводить любым способом, известным в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, внутривенное введение, подкожное введение, интранодальное введение, интратуморальное введение, интратекальное введение, интраплевральное введение, внутрикостное введение, внутрибрюшинное введение, плевральное введение и прямое введение субъекту. Описанные в настоящем изобретении клетки можно вводить в любом физиологически

приемлемом носителе, обычно интраваскулярно, хотя их также можно вводить в кость или другое удобное место, где клетки могут найти соответствующее место для регенерации и дифференцировки (например, вилочковая железа).

5.10. Способы лечения

Раскрытый в настоящем описании объект изобретения относится к различным способам применения описанных в настоящем описании клеток или содержащих их композиций. Описанные в настоящем изобретении клетки и содержащие их композиции можно использовать в терапии или лекарственном средстве. Например, раскрытый в настоящем описании объект изобретения относится к способам индукции и/или повышения иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта. Описанные в настоящем изобретении клетки и содержащие их композиции можно использовать для уменьшения опухолевой нагрузки у субъекта. Описанные в настоящем изобретении клетки и содержащие их композиции могут уменьшать число опухолевых клеток, уменьшать размер опухоли и/или устранять опухоль у субъекта. Описанные в настоящем изобретении клетки и содержащие их композиции можно использовать для лечения и/или предотвращения опухоли у субъекта. Описанные в настоящем изобретении клетки и содержащие их композиции можно использовать для продления выживаемости субъекта, имеющего опухоль. В некоторых вариантах осуществления каждый из вышеуказанных способов включает введение описанных в настоящем изобретении клеток или содержащей их композиции (например, фармацевтической композиции) для обеспечения необходимого эффекта, например, облегчения существующего состояния или предотвращения повторного появления. В случае лечения вводимое количество представляет собой количество, эффективное для оказания необходимого эффекта. Эффективное количество можно вводить за одно введение или в течение серии введений. Эффективное количество можно вводить в виде болюса или путем непрерывной перфузии.

В некоторых вариантах осуществления опухоль связана с ADGRE2 и/или CLEC12A. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка экспрессирует как ADGRE2, так и CLEC12A. В некоторых вариантах осуществления опухолевая клетка сверхэкспрессирует как ADGRE2, так и CLEC12A.

В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой рак крови. В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из группы, состоящей из множественной миеломы, лейкоза, лимфом и миелоидных злокачественных образований. Неограничивающие примеры лейкозов включают острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ), острый лейкоз смешанного типа (ОЛСТ), волосатоклеточный лейкоз и В-клеточный промиелоцитарный лейкоз. Неограничивающие примеры лимфомы включают СПИД-ассоциированную лимфому, ALK-положительную В-крупноклеточную лимфому, лимфому Беркитта, диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ), фолликулярную лимфому,

интраваскулярную В-крупноклеточную лимфому, В-крупноклеточную лимфому, возникающую при HHV8-ассоциированной многоочаговой болезни Кастанелана, лимфогранулематоз, лимфоплазмоцитарную лимфому, мантийноклеточную лимфому (МКЛ), В-клеточную лимфому маргинальной зоны (ЛМЗ), лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), нодальную В-клеточную лимфому маргинальной зоны (НЛМЗ), нодулярную с лимфоидным преобладанием лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, плазмобластную лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы, первичную выпотную лимфому, лимфому маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС) и макроглобулинемию Вальденстрема. Лимфома может представлять собой лимфому Ходжкина или неходжкинскую лимфому. Неограничивающие примеры миелоидные злокачественные образования включают миелодиспластические синдромы (МДС), миелопролиферативные новообразования (МПН), миелоидные/лимфоидные новообразования (например, миелоидные/лимфоидные новообразования с эозинофилией и перестройкой рецептора тромбоцитарного фактора роста альфа (PDGFRA), рецептора тромбоцитарного фактора роста альфа бета (PDGFRB) или рецептора фактора роста фибробластов 1 (FGFR1), или с PCM1-JAK2), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), бластное новообразование из плазматоидных дендритных клеток, В-лимфобластный лейкоз/лимфому и Т-лимфобластный лейкоз/лимфому. В некоторых вариантах осуществления миелоидные злокачественные образования включают миелодиспластические синдромы.

В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ). В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой рецидивирующий/рефрактерный острый миелоидный лейкоз (Р/Р ОМЛ).

В некоторых вариантах субъект представляет собой субъекта-человека. Субъекты могут иметь распространенную форму заболевания, в случае чего цель лечения может включать уменьшение или обращение прогрессирования заболевания и/или ослабление побочных эффектов. Субъекты могут иметь анамнез патологического состояния, лечение которого они уже проходили, в случае чего цель лечения, как правило, будет включать снижение или отсрочку риска повторного появления.

Как следствие поверхностной экспрессии по меньшей мере одного описанного в настоящем изобретении химерного рецептора (например, двух описанных в настоящем изобретении химерных рецепторов, например, описанного в настоящем изобретении ADGRE2-нацеленного CAR и описанного в настоящем изобретении CLEC12A-нацеленного CCR), адоптивно перенесенные клетки обладают повышенной и селективной цитолитической активностью в месте опухоли. Кроме того, после их локализации в опухоли и их пролиферации, клетки превращают место опухоли в очень проводящую среду для широкого диапазона клеток, участвующих в физиологическом противоопухолевом ответе.

В описанные в настоящем изобретении клетки можно вносить дополнительные модификации для предотвращения или минимизации риска иммунологических осложнений (известных как «злокачественная трансформация Т-клеток»), например,

болезни «трансплантат-против-хозяина» (БТПХ), или когда здоровые ткани экспрессируют те же антигены-мишени, что и опухолевые клетки, что приводит к результатам, сходным с БТПХ. Потенциальным решением этой проблемы является конструирование суицидального гена в описанных в настоящем изобретении клетках. Подходящие суицидальные гены включают, но не ограничиваются этим, тимидинкиназу вируса простого герпеса (hsv-tk), индуцибельный суицидальный ген каспазы 9 (iCasp-9) и усеченный полипептид рецептора эпидермального фактора роста человека (EGFRt). В некоторых вариантах осуществления суицидальный ген представляет собой полипептид EGFRt. Полипептид EGFRt может обеспечивать элиминацию Т-клеток за счет введения моноклонального антитела к EGFR (например, цетуксимаба). EGFRt может быть ковалентно соединен с верхней частью описанного в настоящем изобретении химерного рецептора. Суицидальный ген может быть включен в вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую описанный в настоящем изобретении химерный рецептор. Таким образом, введение пролекарства, сконструированного для активации суицидального гена (например, пролекарства (например, AP1903, который может активировать iCasp-9) во время злокачественной трансформации Т-клеток (например, GVHD) инициирует апоптоз в активированных суицидальным геном клетках, экспрессирующих описанный в настоящем изобретении химерный рецептор. Включение суицидального гена в описанный в настоящем изобретении химерный рецептор обеспечивает дополнительный уровень безопасности со способностью элиминировать большинство экспрессирующих рецептор клеток в течение очень короткого периода времени. Описанные в настоящем изобретении клетки, в которые включен суицидальный ген, могут быть заблаговременно элиминированы в заданный момент времени после инфузии клеток или устранены при ранних признаках токсичности.

6. ПРИМЕРЫ

При практической реализации настоящего изобретения применяют, если не указано иное, традиционные методики молекулярной биологии (включая рекомбинантные способы), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые хорошо известны специалисту в данной области техники. Такие методики полностью описаны в литературе, такой как, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991). Эти методики применимы для получения полинуклеотидов и полипептидов, описанных в настоящем описании, и, следовательно, их можно рассматривать при создании и практической реализации описанного в настоящем изобретении предмета изобретения. Особенно применимые методики для конкретных вариантов осуществления будут обсуждены в нижеприведенных разделах.

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в

данной области полное изложение и описание получения и применения описанных в настоящем изобретении клеток и композиций, и не подразумевают ограничения объема того, что авторы считают своим изобретением.

Пример 1 - Нацеливание на ADGRE2 и CLEC12A

Описанный в настоящем описании объект изобретения относится к оценке нового комбинаторного формата CAR для Р/Р ОМЛ, который обладает потенциалом обеспечивать улучшенную безопасность и эффективность по сравнению с альтернативными вариантами CAR-терапии, находящимися на данный момент на этапе клинических исследований.

Применение CAR-терапии при ОМЛ затрудняется фенотипической гетерогенностью отдельных индивидов и между разными индивидами, а идеальную мишень CAR необходимо валидировать. Чтобы идентифицировать потенциальные мишени CAR анализировали доступные транскриптомные и протеомные базы данных по злокачественным и нормальным тканям и проводили анализ методом проточной цитометрии образцов от пациентов с первичным ОМЛ, здоровых гемопоэтических стволовых клеток/клеток-предшественников костного мозга (HSPC) и здоровых первичных Т-клеток (Perna et al., *Cancer Cell* 2(4):506-519.e5. (2017)). Ни одна из мишеней не демонстрировала профиль поверхностной экспрессии сравнимый с CD19, который экспрессировался на высоких уровнях практически во всех клетках В-клеточного лейкоза, практически отсутствовал в HSPC и Т-клетках и был систематически невыявляемым за пределами участков В-клеток. При этом анализ позволил выявить адгезию сопряженного с протеином G рецептора E2 (ADGRE2), новой потенциальной мишени CAR в случае ОМЛ. Парный анализ потенциальных мишеней CAR позволил предположить, что в соответствии с клональной гетерогенностью ОМЛ комбинаторный подход нацеливания CAR может быть потенциально эффективным для устранения опухолей ОМЛ, при этом минимизируя токсичность.

ADGRE2 (EMR2) является членом семейства белков эпидермального фактора роста (EGF)-TM7 (Lin et al., *Genomics* 41.3 (1997): 301-308). Его экспрессия ограничена моноцитами/макрофагами и не повышена в активированных Т- и В-клетках (Lin et al., *Genomics* 67.2 (2000): 188-200). Анализ методом проточной цитометрии выявил положительность в отношении ADGRE2 в > 90% клеток ОМЛ у большинства анализируемой популяции пациентов с Р/Р ОМЛ (Фиг. 1). Было обнаружено, что ADGRE2 является положительным как в общей популяции ОМЛ, так и, что наиболее важно, в терапевтически релевантной фракции лейкозных стволовых клеток (LSC). Также было обнаружено, что другие мишени-кандидаты, такие как CD33 и CD123, являются положительными у большинства пациентов, хотя не настолько согласованно, как ADGRE2, в особенности в LSC. Следовательно, ADGRE2 был выбран как мишень CAR, поскольку он может обеспечить больший шанс для достижения полной ремиссии у пациентов с Р/Р ОМЛ.

Член А семейства 12 доменов лектина С-типа (CLEC12A/CD371) является хорошо изученной мишенью-кандидатом при ОМЛ и экспрессируется у большинства пациентов с ОМЛ (Perna et al., *Cancer cell* 32.4 (2017): 506-519; Haubner et al., *Leukemia* 33.1 (2019): 64-

74; Bakker et al., *Cancer research* 64.22 (2004): 8443-8450). Другие группы уже исследуют его как мишень CAR в текущих клинических исследованиях фазы 1 в США (Tashiro et al., *Molecular Therapy* 25.9 (2017): 2202-2213).

Описанный в настоящем описании объект изобретения относится к предложению использования комбинаторного CAR-CCR-вектора, называемого ADCLEC.syn1 (Фиг. 2), который кодирует CAR, специфический в отношении ADGRE2, и CCR, специфический в отношении CLEC12A, для лечения Р/Р ОМЛ. CAR содержит костимулирующий домен CD28 и ослабленный домен активации CD3 ζ 1XX. Ранее было продемонстрировано, что генетическая модификация мотивов ITAM сигнального домена CD3 ζ обеспечивала повышенную терапевтическую пользу за счет достижения благоприятного баланса эффекторных сигнатур и сигнатур памяти, тем самым повышая персистенцию функциональных CAR Т-клеток в мышинной модели пре-В-клеточного острого лимфобластного лейкоза NALM6 (Feucht et al., *Nature medicine* 25.1 (2019): 82-88). CCR обеспечивает костимуляцию 4-1BB для повышения персистенции Т-клеток и предотвращает уклонение ОМЛ с низким уровнем антигенов; он не содержит домен CD3 ζ и, таким образом, не опосредует уничтожение, как CAR.

Экспрессия ADGRE2 обычно повышена в клетках ОМЛ по сравнению с незлокачественными клетками. С учетом экспрессии ADGRE2 в некоторых нормальных типах клеток, включая HSC, а была разработана стратегия нацеливания, которая предпочтительно нацелена на клетки ОМЛ. В этом подходе первым этапом было снижение аффинности и потенциала активации ADGRE2 CAR для улучшения безопасности CAR-терапии, а вторым этапом было восстановление рекрутирования ADGRE2 CAR против LSC путем совместного нацеливания на CLEC12A (CD371), вторую молекулу, экспрессируемую на LSC, но не на HSC, для предотвращения уклонения ОМЛ. Нацеливание на CLEC12A проводили посредством химерного костимулирующего рецептора (CCR), который обеспечивает повышенную avidность и костимуляцию, но не инициирует цитолитическую активность. Таким образом, CCR помогает CAR выявлять ADGRE2 в клетках ОМЛ.

Сигнализация CAR инициируется после рекрутирования мишени scFv-частью CAR, что зависит от аффинности CAR scFv и плотности антигена-мишени CAR. Аффинность ADGRE2 CAR scFv оптимизировали так, чтобы здоровые клетки, которые имеют меньшие уровни антигена ADGRE2, чем опухолевые клетки ОМЛ, не инициировали активацию CAR и, следовательно не были затронуты, что повышает важную характеристику безопасности, но в то же время повышает риск уклонения ОМЛ за счет понижения регуляции уровней антигена ADGRE2 (Фиг. 3). Для уменьшения риска уклонения ОМЛ с низким уровнем ADGRE2 добавление CLEC12A CCR повышало общую avidность в отношении клеток ОМЛ и тем самым «компенсировало» низкоаффинный ADGRE2 CAR, но при этом не инициировало элиминацию ADGRE2-отрицательных/CLEC12a-положительных клеток. Поскольку в CLEC12A CCR отсутствует домен CD3 ζ , он не функционирует как CAR. Отдельная активация CCR в отсутствие одновременной активации CAR не инициирует активацию Т-клеток или цитотоксичность (Фиг. 3).

Выбор мишеней и разработку химерного рецептора проводили с учетом характеристик безопасности, связанных с экспрессией мишени в нормальных тканях и нормальным гемопоэзом. Коэкспрессия ADGRE2 и CLEC12A была ограничена подгруппой моноцитов, хотя все другие основные линии дифференцировки имели низкую или невыявляемую экспрессию ADGRE2 по данным проточной цитометрии (Фиг. 4А), что позволяет предположить, что ADCLEC.syn1 будет демонстрировать сниженную активность против HSC и гранулоцитов (Фиг. 5). по сравнению с этим, альтернативные мишени CD33 и CD123, которые коэкспрессировались в HSC, приводили к большей CAR-опосредованной гематологической токсичности (Фиг. 4В и 5). Используя коммерчески доступные антитела к ADGRE2 и CLEC12A для ИГХ, описанный в настоящем описании объект изобретения позволил продемонстрировать, что негемопоэтические ткани характеризовались по существу не перекрывающимся профилем экспрессии, при этом большая часть выявленного сигнала была связана с тканевыми миелоидными клетками, такими как макрофаги (Фиг. 4С). Вместе эти данные по экспрессии мишени показывают, что комбинаторное нацеливание на ADGRE2 с помощью CAR и на CLEC12A с помощью CCR посредством вектора ADCLEC.syn1 может минимизировать токсичность CAR-CCR Т-клеток для нормальных гемопоэтических и негемопоэтических тканей по сравнению с нацеливанием только на ADGRE2 и обеспечивает больший шанс не затронуть HSC по сравнению с CD33 или CD123 CAR Т-клетками.

В целом, ADGRE2 CAR и CLEC12A CCR, объединенные в векторе ADCLEC.syn1, снижают риск уклонения антигена ADGRE2 и повышают общую эффективность CAR Т-клеток за счет оптимизированной доставки костимулирующего сигнала CD28 и 4-1BB в контексте точно подобранной сигнализации CD3 ζ 1XX CAR, но без накопления потенциальной нецелевой/внеопухолевой токсичности, которая бы возникла при комбинации двух CAR. Этот рациональный комбинаторный выбор мишени и дизайна химерного рецептора может снизить риск нежелательной токсичности, одновременно повышая нацеливание на Р/Р ОМЛ, включая LSC.

Пример 2 - ADGRE2 scFv

Одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) к ADGRE2 в векторе ADCLEC.syn1 был выбран из 24 версий гуманизированных рекомбинантных антител, созданных с использованием пептидной последовательности моноклонального антитела к ADGRE2 человека, клон 2A1. Схема выбора связывающего фрагмента представлена на Фиг. 6. Мышиное моноклональное антитело к ADGRE2 человека, клон 2A1, является широко используемым антителом для выявления экспрессии ADGRE2 в человеческих образцах (Boyden et al., *N Engl J Med.* 374(7):656-63. (2016)). На основании (1) экспрессии вариантов гуманизированного антитела 2A1, (2) связывания рекомбинантных антител с ADGRE2-сверхэкспрессирующими клетками мышиной лимфомы EL4 по данным измерения методом проточной цитометрии и (3) оценки иммуногенности было отобрано 18 гуманизированных рекомбинантных антител из пула кандидатов. После этого были идентифицированы домены VH и VL для создания 18 scFv-кандидатов, которые затем интегрировали в гамма-

ретровирусные векторы CAR на основе SFG и исследовали в функциональных анализах CAR (Фиг. 7А-7С и 8).

ADGRE2-специфические CAR Т-клетки получали путем трансдукции Т-клеток SFG-гамма-ретровирусным вектором, экспрессирующим каждый из гуманизированных 2А1 scFv в каскаде CAR, и измеряли цитотоксичность CAR Т-клеток, используя линию клеток ОМЛ MOLM13. Зная экспрессию ADGRE2 в некоторых нормальных типах клеток, включая HSC, которые экспрессируют более низкие уровни ADGRE2, чем клетки ОМЛ, линии клеток MOLM13 генетически модифицировали для высоких (ДТ), низких или очень низких уровней экспрессии ADGRE2 с коэкспрессией низких (ДТ) или высоких уровней CLEC12A (смотрите таблицу 17 ниже).

Таблица 17. Линии клеток MOLM13 для исследований CAR, используемые для идентификации основных ADGRE2 и CLEC12A scFv

Линия клеток-мишеней	Уровень ADGRE2 (СИФ относительно ДТ)	Уровень CLEC12A (СИФ относительно ДТ)
MOLM13-ДТ	высокий (1x)	низкий (1x)
MOLM13_ADGRE2-1E8	низкий (0,2x)	низкий (1x)
MOLM13_ADGRE2-9D6	очень низкий (0,1x)	низкий (1x)
MOLM13_ADGRE2-E6_CLEC12A-C6	низкий (0,2x)	высокий (25,9x)
MOLM13_ADGRE2-9D6_CLEC12A-B6	очень низкий (0,1x)	высокий (15,7x)

Эти модифицированные линии клеток MOLM13 позволили идентифицировать гуманизированные ADGRE2 scFv с наибольшим потенциалом эффективного истощения клеток ОМЛ с высоким уровнем ADGRE2, при этом не затрагивая нормальные клетки с низким уровнем ADGRE2 и тем самым сохраняя благоприятный профиль безопасности (Фиг. 7А-7С и 8). *In vitro* скрининг CAR включал 18 разных ADGRE2 scFv-кандидатов в контексте двух разных сигнальных пептидов (CD8a или IgHV1-4). Была идентифицирована группа из 6 scFv, которые опосредовали наиболее подходящий профиль *in vitro* лизиса клеток-мишеней (максимальный лизис клеток с высокими уровнями ADGRE2 и минимальный лизис клеток с очень низкими уровнями ADGRE2), с высоким сходством между двумя исследуемыми сигнальными пептидами (Фиг. 7А-7С). Затем эти 6 scFv исследовали в *in vivo* модели, используя ту же самую линию клеток ОМЛ MOLM13 с высокими (ДТ), низкими или очень низкими уровнями ADGRE2. В данном случае ADGRE2 scFv ADGRE2-А демонстрировал наиболее подходящий *in vivo* профиль ответа с максимальной эффективностью против клеток-мишеней с высокими уровнями ADGRE2 и сниженной/отсутствующей эффективностью против клеток-мишеней с низкими/очень низкими уровнями ADGRE2, соответственно. Следовательно, ADGRE2-А был выбран как ADGRE2 scFv с сигнальным пептидом CD8a.

Пример 3 - CLEC12A scFv

CLEC12A scFv человека был выбран из 74 уникальных человеческих антител, полученных из гибридом, созданных путем слияния клеток P3X63Ag8U.1 с лимфоцитами, выделенными у мышей, иммунизированных рекомбинантным человеческим белком CLEC12A. Положительные клоны выбирали, используя связывание с CLEC12A-экспрессирующими клетками CHO-S на клетках и анализ методом поверхностного плазмонного резонанса. Схема отбора scFv приведена на Фиг. 9.

16 разных человеческих CLEC12A scFv-кандидатов исследовали в формате 28z1XX TRAC-CAR, используя *in vitro* анализ цитотоксичности CAR через 18 ч и *in vivo* ксенотрансплантатные модели. В отличие от стратегии идентификации ADGRE2 scFv, в данном случае эффективные scFv приоритизировать в контексте как высоких, так и низких уровней антигена-мишени с учетом того, что конечное применение scFv будет в CCR, но не CAR, и, следовательно, высокая чувствительность CLEC12A scFv к мишени не будет связана с повышением токсичности. *In vitro* скрининг 16 scFv в контексте линий клеток U937 (CLEC12A-высок.) и MOLM13 (CLEC12A-низк.) позволил идентифицировать 9 очень действенных CLEC12A scFv (Фиг. 10A и 10B). Последующий *in vivo* скрининг этих 9 scFv позволил идентифицировать основной CLEC12A scFv (CLEC12A-A) (Фиг. 11).

Пример 4 - Нецелевое связывание ADGRE2 scFv и CLEC12A scFv

Нецелевые взаимодействия связывания ADGRE2 scFv (ADGRE2-A) и CLEC12A scFv (CLEC12A-A) с человеческими белками плазматической мембраны исследовали в 4-фазном подходе: (1) предварительный скрининг для определения оптимальных концентраций исследуемых очищенных рекомбинантных белков ADGRE2 scFv-Fc и CLEC12A scFv-Fc для скрининга; (2) скрининг в отношении связывания исследуемых белков с фиксированными клетками HEK293, сверхэкспрессирующими 5474 полноразмерных человеческих белка плазматической мембраны и связанных с клеточной поверхностью человеческих секретиремых белка и 371 человеческий клеточный поверхностный гетеродимер, которые идентифицировали лучшие библиотечные результаты; (3) подтверждающий/специфический скрининг с использованием микрочипов фиксированных клеток и живых клеток; (4) последующее исследование методом проточной цитометрии для исследования дополнительных идентифицированных специфических для исследуемых белков взаимодействий на живых клетках; и (5) анализы связывания между клетками для подтверждения положительных результатов. В таблице ниже приведены данные по нецелевому связыванию для ADGRE2 scFv и CLEC12A scFv.

Таблица 18. Связывание ADGRE2 scFv и CLEC12A scFv с белками, идентифицированными при скрининге фиксированных и живых клеток

Исследуемый объект	Взаимодействующие белки, идентифицированные при скрининге	Название белка	EC50 по проточной цитометрии	Связывание между клетками
--------------------	---	----------------	------------------------------	---------------------------

ADGRE2 scFv-Fc	ADGRE2	Сопряженный с протеином G рецептор адгезии E2	He исследовано	He исследовано
CLEC12A scFv-Fc	CLEC12A	Член А семейства 12 доменов лектина С-типа	0,081 мкг/мл	от среднего до сильного
	SECTM1	Секретируемый и трансмембранный белок 1	799,5 мкг/мл	от слабого до очень слабого
	RTN4R	Рецептор ретикулона-4	> 300 мкг/мл	He исследовано

Из 5845 исследованных белков плазматической мембраны очищенный белок ADGRE2-scFv-Fc связывал только свой первичный белок-мишень клеточной поверхности, ADGRE2, в микрочипах как фиксированных клеток, так и живых клеток. Кроме того, ADGRE2-scFv-Fc не связывался с другими белками ADGRE: ADGRE1, ADGRE3 и ADGRE5.

CLEC12A scFv-Fc демонстрировал сильное специфическое взаимодействие со своей первичной мишенью CLEC12A. Он также демонстрировал низкое, но выявляемое взаимодействие с SECTM1 в микрочипах как фиксированных клеток, так и живых клеток, и с RTN3R только в микрочипе живых клеток. Последующие исследования с титрованием дозы и эксперименты по проточной цитометрии с очищенным CLEC12A scFv-Fc продемонстрировали, что EC50 CLEC12A scFv против SECTM1 и RTN4R были в 800- раз и > 3700 раз больше, чем против первичной мишени CLEC12A, соответственно. Кроме того, хотя CLEC12A CCR-экспрессирующие клетки Jurkat связывали CLEC12A-сверхэкспрессирующие клетки HEK293, CLEC12A CCR-экспрессирующие клетки Jurkat характеризовались очень слабым или слабым связыванием с SECTM1-сверхэкспрессирующими клетками HEK293. Вместе эти данные позволяют предположить, что связывание CLEC12A scFv-Fc с SECTM1 и RTN4R может не быть физиологически релевантным. Любое потенциальное нецелевое связывание CLEC12A CCR не приводит к цитотоксичности без одновременной активации ADGRE2 CAR, добавляя еще один слой безопасности (Фиг. 12).

Пример 5 - Валидация комбинаторной концепции нацеливания CAR+CCR с ADCLEC.syn1

Как показано на схемах на Фиг. 3 и 5, в описанном в настоящем описании предмете изобретения было предположено, что комбинаторный дизайн CAR+CCR для ADCLEC.syn1 позволит эффективно элиминировать ОМЛ, в то же время не затрагивая нормальные клетки с низкими уровнями мишени CAR. Что важно, один CCR должен способствовать CAR-

опосредованному цитолизу и усиливать его, однако не инициировать цитолитическую реакцию независимо. Этот подход был валидирован в *in vitro* и *in vivo* моделях (Фиг. 12). Сначала была создана *in vitro* модель с линией клеток-мишеней, не экспрессирующих мишень (ADGRE2-/CLEC12A-) экспрессирующих только мишень CAR (ADGRE2+/CLEC12A-), только мишень CCR (ADGRE2-/CLEC12A+) или как мишень CAR, так и CCR (ADGRE2+/CLEC12A+). Одна мишень CCR не инициирует *in vitro* уничтожение, однако одна мишень CAR инициирует уничтожение, которое было дополнительно повышено, когда мишень CCR коэкспрессировали на линии клеток-мишеней (Фиг. 12А). Далее было продемонстрировано *in vivo*, что одной сигнализации ADGRE2 CAR было недостаточно для полного устранения клеток с низкими уровнями ADGRE2 (моделирующих нормальные клетки), однако объединенная сигнализация ADGRE2 CAR и CLEC12A CCR обеспечивали полную и длительную ремиссию ОМЛ (Фиг. 12В и 12С). В целом, эти результаты показывают потенциал ADCLEC.syn1 для сбережения нормальных клеток с низкими уровнями мишени CAR и при этом эффективного устранения ОМЛ.

Пример 6 - Ретровирусный вектор SFG-ADCLEC.syn1

Конструировали гамма-ретровирусную плазмиду SFG-ADCLEC.syn1 (Фиг. 13) и подтверждали идентичность плазмиды с помощью анализа секвенирования по Сэнгеру. Гамма-ретровирусный вектор SFG-ADCLEC.syn1 экспрессирует как ADGRE2-специфический CAR, так и CLEC12A-специфический CCR, связанные посредством элемента P2A, как показано на Фиг. 14.

Плазмиду SFG используют для временной трансфекции клеток 293Vec-RD114, пакующей линии клеток на основе НЕК 293, которая вырабатывает ретровирусные векторы, псевдотипированные кошачьим оболочечным белком RD114. Векторный супернатант, который собирают из пакующих клеток 293Vec-RD114TM, затем используют для трансдукции 293Vec-GalVTM, второй пакующей линии клеток на основе НЕК 293, псевдотипированной оболочечным белком вируса лейкоза гиббонов, для создания стабильной популяции вырабатывающих клеток, экспрессирующей 293Vec-GalV-SFG-ADCLEC.syn1. Одиночные клоны выделяют из вырабатывающей вектор 293Vec-GalVTM SFG-ADCLEC.syn1 популяции, создают несколько посевных банков и изучают характеристики лучших титровальных клонов. Наилучшую линию вырабатывающих клеток, основной клон, используют для создания главного банка клеток (ГБК) из посевных банков. Исходный раствор ретровирусного вектора (РВ) получают из одного флакона с ГБК.

Пример 7 - Ex vivo трансдукция аутологичных Т-клеток с помощью SFG-ADCLEC.syn1

Активированные, аутологичные полученные от пациентов Т-клетки периферической крови трансдуцируют *ex vivo* исходными растворами GalV-псевдотипированного ретровирусного вектора SFG-ADCLEC.syn1. Проводят положительное выделение CD8+ и CD4+ Т-клеток, используя микрогранулы CD8 и CD4, используя Prodigy CliniMACS и инструмент (Miltenyi Biotec), и активируют гранулами

Dynabeads (ThermoFisher). Исходный положительный отбор CD8+ и CD4+ Т-клеток главным образом минимизирует число В-лимфоцитов, плазматических клеток и моноцитов в продукте трансдуцированных Т-клеток. Проводят анализы методом сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) с использованием меченых красителем очищенных полипептидов ADGRE2 или CLEC12A для измерения экспрессии ADGRE2 CAR и CLEC12A CCR для определения эффективности трансдукции. Продукты для введения пациентам имеют эффективность трансдукции, превышающую или равную 4%.

Пример 8 - Лекарственная форма, путь введения и схема введения (частота и продолжительность)

ADCLEC.syn1 CAR Т-клетки предоставляют в замороженном пакете, размораживают в помещении, например помещении госпиталя, и вводят в виде внутривенной (в/в) инфузии за счет гравитации. Запланированные уровни доз, подлежащие оценке во время повышения дозы, описаны в таблице 19 ниже.

Таблица 19. Запланированные уровни доз ADCLEC.syn1 CAR Т-клеток

Уровень дозы (дл)	Доза ADCLEC.syn1 CAR Т-клеток (фиксированная)
-1	10×10^6
1	25×10^6
2	50×10^6
3	100×10^6
4	150×10^6

Начальная доза для ADCLEC.syn1 CAR Т-клеток составляет 25×10^6 CAR Т-клеток. Эта доза существенно ниже, чем одобренная дозировка CD19 CAR (2×10^6 CAR Т-клеток/кг для аксикабтагена и $6-60 \times 10^7$ CAR Т-клеток для тисагенлеклейсела), и также ниже, чем дозы BCMA CAR, которые на данный момент исследуют в отношении множественной миеломы ($50-800 \times 10^6$ CAR Т-клеток). Повышение дозы проводят по стандартной схеме 3+3. После идентификации RP2D когорту дозы RP2D можно расширять.

Пример 9 - Клиническое исследование

В настоящем примере описано открытое исследование с повышением дозы фазы 1 для оценки безопасности и активности ADCLEC.syn1 CAR Т-клеток, описанных в настоящем описании, у взрослых пациентов с Р/Р ОМЛ. Использовали стандартную схему повышения дозы 3+3 для определения максимальной переносимой дозы (МПД) или максимальной вводимой дозы (МВД) в случае не достижения МПД. После идентификации МПД или МВД когорту расширяют для включения дополнительных пациентов для дополнительной оценки безопасности и активности ADCLEC.syn1 CAR Т-клеток.

Когортам из 3-6 пациентов посредством инфузии вводят возрастающие дозы ADCLEC.syn1 CAR Т-клеток, чтобы установить МПД. Запланировано 4 уровня дозы: 25×10^6 , 50×10^6 , 100×10^6 , 150×10^6 CAR Т-клеток. Осуществляют стандартный дизайн повышения дозы 3+3, начиная с дозы 25×10^6 . В каждой группе проводят лечение 3-6 пациентов, при этом повышение дозы продолжают в следующей группе, если менее 33%

пациентов в группе испытывают непредвиденную дозолIMITирующую токсичность (ДЛТ). Если неприемлемую токсичность наблюдают у 1 из 3 пациентов в любой заданной группе, до 6 пациентов в этой группе лечат, используя традиционную схему повышения дозы. Если 2 из 6 пациентов в любой заданной когорте испытывают неприемлемую токсичность, это означает, что МПД Т-клеток превышена и установлена на уровне дозы предыдущей когорты. если первый уровень дозы превышает МПД, лечение следующей когорты из 3-6 пациентов проводят при уровне дозы -1, составляющем 10×10^6 ADCLEC.syn1 CAR Т-клеток.

Кондиционирующая химиотерапия или химиотерапевтическая лимфодеплеция. Пациенты проходят кондиционирующую химиотерапию, состоящую из 25 мг/м² флударабина в дни -4, -3, -2 и 500 мг/м² циклофосфида в дни -3, -2, за чем следует инфузия CAR Т-клеток в день 0.

Переходная терапия. Согласно решению лечащего врача можно рассматривать вариант переходной терапии. Переходную терапию можно применять после лейкафереза, при этом ее следует прекращать по меньшей мере за 1 неделю перед применением кондиционирующей химиотерапии за исключением гидроксимочевины, прием которой можно продолжать до 24 часов до начала кондиционирующей химиотерапии. Субъектов необходимо повторно стадировать после окончания переходной терапии и перед началом кондиционирующей химиотерапии или в течение 48 часов перед применением кондиционирующей химиотерапии.

Оценка ответа заболевания. Биопсию костного мозга получают в день 28-35 инфузии CAR Т-клеток для оценки ответа и оценивают по критериям ELN.

Курс лечения после оценки ответа заболевания в Д28-35. После оценки ответа заболевания последующий уход осуществляют согласно предложенному алгоритму, показанному на Фиг. 16.

Оценка токсичности. во время каждого визита на протяжении исследования оценивают токсичность в соответствии с общими терминологическими критерии нежелательных явлений (СТСAE) Национального института рака (NCI) версии 5.0 и консенсусной оценкой ASTCT для синдрома высвобождения цитокинов (CRS) и синдрома нейротоксичности, связанной с иммунными эффекторными клетками (ICANS).

Фармакокинетическая оценка. Взятие крови для фармакокинетических измерений проводят перед введением, в день 1, 3, 5, 7, 14, 21 и 28-30. Последующие образцы крови получают в месяцы 2, 3, 6, 9, 12 и 24.

Уровни доз ADCLEC.syn1 CAR Т-клеток. Начальная доза для ADCLEC.syn1 CAR Т-клеток составляет 25×10^6 CAR Т-клеток. Эта доза существенно ниже, чем одобренная дозировка CD19 CAR (2×10^6 CAR Т-клеток/кг для аксикабтагена и $6-60 \times 10^7$ CAR Т-клеток для тисагенлеклейсела), и также ниже, чем дозы BCMA CAR, которые на данный момент исследуют в отношении множественной миеломы ($50-800 \times 10^6$ CAR Т-клеток). Исходя из массы тела 70 кг, предложенная начальная доза составляет 2×10^5 CAR Т-клеток/кг и является сравнимой (или немного меньшей) с другими начальными дозами

аутологичных ОМЛ CAR.

Дозолимитирующая токсичность (ДЛТ). ДЛТ определяется как последующее нежелательное явление (НЯ), которое возникает в течение 28 дней после инфузии ADCLEC.syn1 CAR T-клеток, на основании общих терминологических критериев нежелательных явлений (CTCAE) v5.0 или руководства по консенсусной оценке ASTCT для синдрома высвобождения цитокинов (CRS) и синдрома нейротоксичности, связанной с иммунными эффекторными клетками (ICANS): (a) негематологические НЯ любой степени ≥ 3 в жизненно-важных органах (за исключением CRS и ICANS), которые не разрешаются до степени 2 или меньше в течение 7 дней; (b) нейтропения или тромбоцитопения степени 4 и клеточность костного мозга в течение 28 дней $< 5\%$ в отсутствие персистирующего ОМЛ. Персистирующие цитопении, которые присутствовали на исходном уровне (предварительной кондиционирующей химиотерапии и инфузии T-клеток), которые сохранялись до дня 30 в отсутствие активного заболевания, не считаются ДЛТ; (c) инфузионная реакция степени ≥ 3 ; (d) ICANS степени 3 или 4 любой длительности; (e) CRS степени 4 любой длительности; (f) синдром лизиса опухоли степени 4; (g) синдром повышенной проницаемости капилляров степени 4; и (h) любое явление степени 5, связанное с ADCLEC.syn1 CAR T-клетками.

Повышение дозы. Целью повышения дозы является определение МПД/МВД для ADCLEC.syn1 CAR T-клеток. Повышение дозы проводят по правилам повышения дозы 3+3 следующим образом: (a) субъектов включают в когорты по три субъекта на уровень дозы с минимум 10 днями между введением ADCLEC.syn1 CAR T-клеток первому и второму субъекту в группе; (b) если в исходной группе из трех субъектов не зафиксировано ДЛТ, повышение дозы можно продолжать до следующего большего уровня дозы; (c) если у одного субъекта наблюдается ДЛТ, группу расширяют до шести субъектов. Если не наблюдается дополнительной ДЛТ, этот уровень дозы считают переносимым, и повышение дозы можно продолжать до следующего большего уровня дозы; (d) субъекта, который прекращает прием исследуемого лечения или выбывает из исследования до окончания периода наблюдения ДЛТ по причинам, отличным от ДЛТ, считают не подлежащим оценке в отношении ДЛТ и заменяют; (e) если у более чем одного субъекта из шести включенных субъектов из группы с одинаковым уровнем дозы возникает ДЛТ, это означает превышение МПД. Дополнительное включение в эту дозовую когорту прекращается; включают шесть субъектов при меньшем уровне дозы для определения МПД по правилам повышения дозы 3+3; (f) если уровень дозы, которая превысила МПД, является в ≥ 2 раза большим, чем предшествующий наибольший переносимый уровень дозы, можно включать другой уровень дозы, приблизительно посередине между этими двумя уровнями, для определения МПД по правилам повышения дозы 3+3; (g) МПД представляет собой когорту с наибольшим уровнем дозы с не более чем одной ДЛТ у шести оцениваемых субъектов.

Расширение дозы. Целью расширения дозы является дополнительная оценка безопасности и переносимости и идентификация сигналов активности для направления и обоснования будущей разработки. Доза ADCLEC.syn1 CAR T-клеток в расширении дозы

представляет собой МПД/МВД, которое было установлено во время повышения дозы. Во время фазы расширения дозы субъектов с Р/Р ОМЛ лечат таким же образом, что и в фазе повышения дозы, и включают приблизительно 12 субъектов.

Исследуемый медицинский продукт. ADCLEC.syn1 CAR Т-клетки предоставляют в замороженном пакете, размораживают в помещении и вводят в виде внутривенной (в/в) инфузии за счет гравитации. Запланированные уровни доз оценивают во время повышения дозы, описанного в настоящем описании. ADCLEC.syn1 CAR Т-клетки вводят в день 0.

Неисследуемые медицинские продукты. Кондиционирующая химиотерапия включает (а) циклофосфамид (СУ), 500 мг/м² в/в в дни -3 и -2 каждого цикла лечения; и (b) флударабин (FLU), 25 мг/м² в/в в дни -4, -3 и -2 каждого цикла лечения. Дозу и схему СУ и FLU можно модифицировать на основании цитопении и сопутствующих патологий.

Конечные точки исследования. Первичные конечные точки включают частоту и природу ДЛТ при введении ADCLEC.syn1 CAR Т-клеток пациентам с Р/Р ОМЛ. Вторичные конечные точки включают (а) частоту, природу и тяжесть нежелательных явлений, связанных с ADCLEC.syn1 CAR Т-клетками; (b) оцениваемую исследователем частоту объективного ответа (ЧОО), определяемую как часть субъектов, достигших полного ответа (ПО), ПО с неполным гематологическим восстановлением (ПОн), состояния без морфологических признаков лейкоза (СБМПЛ) и частичного ответа (ЧО) согласно критериям ответа ELN; (c) выживаемость без прогрессирования (ВБП), определяемую как период от первой дозы ADCLEC.syn1 CAR Т-клеток (день 0) до прогрессирования заболевания (ПЗ) или до дня смерти по любой причине, в зависимости от того, что наступает раньше; (d) общая выживаемость в течение одного года (ОВ), определяемая как процент субъектов, живых через один год после начала исследуемого лечения; и (e) клеточную кинетику ADCLEC.syn1 CAR Т-клеток, пиковое расширение и персистенцию, определяемые как период от дня 1 до последней оценки выявляемых уровней ADCLEC.syn1 CAR Т-клеток, оцениваемых методом ПЦР или проточной цитометрии. Поисковые конечные точки включают (а) связь ЧОО и/или ВБП с расширением и продолжительностью ADCLEC.syn1 CAR Т-клеток, с экспрессией антигена ADGRE2 и CLEC12A и фенотипами CAR Т-клеток; (b) оценку ИОЗ у тех пациентов, которые достигли ПО или ПОн по оценке методом многопараметрической проточной цитометрии и/или СНК; (c) анализ сывороточных цитокинов после инфузии CAR Т-клеток; (d) анализ иммуногенности в отношении конструкции CAR-CCR; и (e) связь рецидива с уровнями экспрессии ADGRE2 и CLEC12A, персистенцией ADCLEC.syn1 CAR Т-клеток и фенотипом и изменениями в опухолевом микроокружении.

Критерии оценки ответа опухоли. Противоопухолевые ответы оценивают в соответствии с критериями ответа ELN при ОМЛ. Критерии включения включают (а) возраст ≥ 18 лет на момент подписания ФИС; (b) пациенты с рефрактерным или рецидивным ОМЛ, которые истощены или не подлежат лечению или не переносят стандартные терапевтические варианты (следующий статус заболевания соответствует включению в исследование: (1) первичное рефрактерное заболевание после двух курсов

индукционной химиотерапии или после одного курса приема гипометилирующего препарата или низкой дозы цитарабина в комбинации с венетоклаксом, которые не обеспечили ПО/ПОН или СБМПЛ по критериям ELN; или (2) повторный ОМЛ после достижения ответа (ПО или ПОН) во время или после курса лечения, включая HSCT); (с) любая степень выявляемого заболевания подлежит включению; (d) оценка общего состояния по шкале ECOG 0 или 1; (е) наличие идентифицированного подходящего донора стволовых клеток, который может стать донором стволовых клеток в случае, если субъект нуждается или проходит терапию аллогенными HSCT для восстановления после длительной аплазии костного мозга (донор может быть из родственного или неродственного совпадающего источника, гаплоидентичного или пуповинной крови, и должен быть признан подходящим в соответствии со стандартными критериями); и (f) адекватная органная функция, определяемая как сывороточный креатинин $< 2,0$ мг/100 мл, прямой билирубин $< 2,0$ мг/100 мл, АСТ и/или АЛТ $\leq 5 \times$ ВПН, если только это не учитывается из-за лейкозного вовлечения органов. Критерии исключения включают (а) диагноз острого промиелоцитарного лейкоза; (b) радиологически выявленное или симптоматическое заболевание ЦНС или заболевание ЦНС 3, т.е. наличие ≥ 5 /мкл WBC в ЦСЖ (субъекты с адекватно вылеченным лейкозом ЦНС подлежат включению); (с) насыщение кислородом $< 90\%$ при комнатном воздухе; (d) предыдущая терапия аллогенными HSCT в течение 3 месяцев до подписания ФИС или текущая необходимость в системной терапии болезни трансплантат-против-хозяина; (е) клинически значимое сердечно-сосудистое заболевание, включая инсульт или инфаркт миокарда, в течение 6 месяцев перед первым приемом исследуемого препарата; или наличие нестабильной стенокардии или врожденного порока сердца степени 2 или выше по шкале Нью-Йоркской кардиологической ассоциации, или фракция выброса сердца $< 40\%$; (f) неконтролируемые клинически значимые инфекции; (g) положительные серологические результаты теста на ВИЧ; (h) острая или хроническая инфекция HBV или HCV, оцененная по серологическим (HBVsAg или антитела к HCV) или ПЦР-результатам; и (i) активное вторичное злокачественное образование, которое требует системного лечения, за исключением злокачественного образования, вылеченного и без признаков заболевания в течение > 2 лет перед скринингом. Правила прекращения участия в исследовании включают (а) в случае повышения дозы правила прекращения соответствуют правилам повышения дозы; (b) в случае расширения дозы временное прекращение включения в исследование происходит, когда смерть любого пациента предположительно или вероятно связана с ADCLEC.syn1 CAR T-клетками, или $\geq 30\%$ субъектов в когорте расширения, в которую было включено по меньшей мере 6 субъектов, испытывают связанную с лечением ADCLEC.syn1 CAR T-клетками токсичность в любой момент исследования, которую в ином случае квалифицировали бы как ДЛТ.

Статистические способы. В общем случае клинически данные обобщали по когорте, отдельно для каждой схемы, используя описательную статистику (n, среднее значение, стандартное отклонение, медианное значение, первый квартиль (Q1), третий квартиль (Q3),

минимум и максимум для непрерывных переменных и частота и процентное значение для категориальных переменных). При наличии категориальных данных процентные значения опускают, когда значение частоты равно нулю. Ненулевые процентные значения округляют до десятых за исключением 100%, которые отображаются без каких-либо знаков после запятой. Для выбранных оценок отображают доверительные интервалы (ДИ). Переменные времени до наступления события обобщают, используя методы Каплана - Майера.

Пример 10 - Идентификация и изучение характеристик антител и scFv к ADGRE2

Настоящий пример демонстрирует получение и характеристики аффинности связывания антител и scFv к ADGRE2. Антитела разрабатывали, используя технологию гибридомы, содержащей 24 гуманизированные последовательности мышино-эталонного клона 1. Антитела отбирали на основании экспрессии в виде вариантов рекомбинантного белка, связывания с ADGRE2-сверхэкспрессирующими клетками мышины лимфомы EL4 по данным измерения FACS и оценки иммуногенности; было выбрано 18 гуманизированных рекомбинантных антител, представляющих диапазон значений аффинности связывания ADGRE2. Аминокислотную последовательность эталонного антитела 1 к ADGRE2 определяли путем расщепления эндопротеазами и последующего анализа пептидных пулов методом ЖХ-МС/МС. Вкратце, тяжелые и легкие цепи антитела разделяли с помощью ДСН-ПААГ в восстановительных условиях. После окрашивания синим кумасси соответствующие полосы вырезали из геля и расщепляли с Asp N, химотрипсином, трипсином и эндопептидазами эластазы. Кроме того, антитело расщепляли в растворе пепсином. Пул пептидов, созданных при расщеплении, анализировали на анализаторе Orbitrap (ЖХ-МС/МС Q-Exactive, ThermoFisher). Данные ЖХ-МС/МС обрабатывали, используя программное обеспечение для секвенирования антител PEAKS AB. VH- и VL-кодирующие последовательности эталонного антитела 1 к ADGRE2 получали из последовательностей соответствующих цепей антитела и клонировали с константной областью IgG2. Рекомбинантное эталонное антитело 1 экспрессировали в клетках HEK293, а очищенное антитело сравнивали с коммерчески доступным эталонным антителом 1 с помощью анализа K_D методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с использованием рекомбинантно полученного белка, содержащего внеклеточный домен ADGRE2, а также проводили определение EC50 в отношении связывания с клетками, экспрессирующими ADGRE2. Для последующего скрининга антитела в качестве эталонного антитела использовали очищенное рекомбинантное эталонное антитело 1.

Пример 11 - Связывание scFv к ADGRE2 на клетках

Этот пример иллюстрирует связывание scFv к ADGRE2 на клетках, измеренное методом проточной цитометрии. Связывание scFv к ADGRE2 на клетках оценивали методом проточной цитометрии на клетках E4, сверхэкспрессирующих ADGRE2. Каждый из scFv исследовали в отношении связывания с ADGRE2 и сравнивали с эталонным mAb 1. Вкратце, 100000 клеток на лунку высевали в 96-луночный планшет с V-образным дном, scFv разводили до 200 нМ, затем scFv серийно разводили 1:4 до 0,01 нМ. Дозозависимое

титрование scFv подтвердило сворачивание и связывание рекомбинантных scFv с ADGRE2. Аффинность в терминах EC₅₀ сравнивали с целью лучшей интерпретации любых различий, наблюдаемых *in-vivo*, которые могли быть вызваны вариациями в аффинности в результате процесса гуманизации. Данные анализировали, используя программное обеспечение Prism, используя четырехпараметрическую регрессию. Приблизительные значения EC₅₀ определяли, используя уравнение: $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$, где подгоночные параметры определены следующим образом: Bottom, нижнее плато, описывающее минимальное достижимое связывание; Top, верхнее плато, описывающее максимальное достижимое связывание; LogEC₅₀, точка перегиба кривой доза - ответ, также известная как концентрация, вызывающая полумаксимальный ответ; и Hill-Slope, наклон кривой доза - ответ.

Таблица 20. Аффинность связывания scFv с ADGRE2

scFv	Аффинность (EC ₅₀ нМ)
ADGRE2-D	16,4
ADGRE2-B	55,3
ADGRE2-E	10,6
ADGRE2-A	93,8
ADGRE2-F	16,4
ADGRE2-C	53,2
Эталон 1	10,1

Как показано в таблице 20, значения EC₅₀, рассчитанные из кривых, показывают, что каждое из антител связывает клетки с аффинностью от 10,2 до 93,8. В целом, результаты показали, что исследуемые гуманизированные scFv имели значения EC₅₀ сравнимые со стандартным эталоном 1.

Пример 12 - In silico анализ иммуногенности scFv к ADGRE2

Этот пример иллюстрирует *in silico* анализ иммуногенности. Вкратце, последовательности scFv эталона 1 анализировали с гуманизированными scFv с помощью программного обеспечения для прогноза презентации ГКГCI и ГКГCII на основании различных прогнозных баз данных IEDB, SMN-Align, NN-Align.

Таблица 21. Иммуногенность scFv к ADGRE2

scFv	Иммуногенность		
	ГКГC I	ГКГC II	ГКГC I+ГКГC II
ADGRE2-D	533	645	1178
ADGRE2-B	686	876	1562
ADGRE2-E	500	685	1185
ADGRE2-A	647	995	1642
ADGRE2-F	628	844	1472

ADGRE2-C	643	941	1584
Эталон 1	886	1183	2069

Как показано в таблице 21, иммуногенность антитела характеризовали на основании связывания ГКГС I или ГКГС II или связывания как с ГКГС I, так и с ГКГС II. В целом, эти данные прогнозируют низкую иммуногенность для всех исследуемых гуманизированных антител.

Пример 13 - Анализ панели нецелевого скрининга scFv к ADGRE2

Этот пример иллюстрирует специфичность scFv к ADGRE2 в анализе нецелевого связывания. Вкратце, гуманизированные варианты scFv исследовали в отношении нецелевого связывания. Три типовых клон ADGRE2 scFv исследовали в «анализе сокращения» для скрининга в отношении связывания с более чем 3000 человеческими рецепторами. В анализе сокращения чем выше связывание, тем выше вероятность реальности взаимодействия. В общем случае результаты, помеченные как «V. слаб.» маловероятно являются реальными взаимодействиями. Результаты показали, что все исследуемые клоны не демонстрировали какого-либо нецелевого связывания. Таким образом, было обнаружено, что эти клоны являются высокоспецифическими к ADGRE2.

Пример 14 - Характеристики связывания Clec12A scFv к CLEC12A

Настоящий пример демонстрирует получение и характеристики аффинности связывания антител к CLEC12A. Для отбора и скрининга в отношении антител к Clec12A использовали технологию гибридомы. Отбор проводили на Clec12A-сверхэкспрессирующих клетках CHO-S. Антитела отбирали на основании разнообразия последовательностей. Было отобрано 16 антител из 74 антител для диапазона аффинности связывания растворимого и находящегося на клетках Clec12A. Аффинность связывания антител к Clec12A определяли с помощью анализа Biacore.

Кроме того, в настоящем примере оценивается неспецифическое связывание антител к CLEC12A. Чтобы оценить потенциал антител к CLEC12A к связыванию неспецифических мембранных белков, scFv, полученные из 4 основных антител, оценивали в анализе поверхностных мембранных белков (ПМБ) (Фиг. 17А). В анализе ПМБ использовали анализ на основе ELISA с мембранами клеток НЕК-293 человека или клеток SF9 насекомых, нанесенными на планшет для исследования неспецифического связывания с этими мембранами исследуемых антител. В качестве внутреннего контроля были включены антитела с высоким и низким неспецифическим связыванием. Используемым контролем с высоким неспецифическим связыванием, sc209, было антитело, которое характеризовалось нецелевой токсичностью в клинических условиях, тогда как контроль с низким неспецифическим связыванием, 5f9, не демонстрировал нецелевую токсичность в клинических условиях (Фиг. 17В).

В целом, результаты показали низкое неспецифическое связывание антителами к CLEC12A CLEC12-C, CLEC12-D и CLEC12A (Фиг. 17В).

Пример 15 - Анализ панели нецелевого скрининга scFv к CLEC12A

Этот пример иллюстрирует специфичность scFv к CLEC12A в анализе нецелевого

связывания. Вкратце, чтобы исследовать scFv к CLEC12A в отношении специфичности к Clec12A, а также другим мембранным белкам, проводили анализ нецелевого связывания. Два выбранных клон Clec12A scFv исследовали в «анализе сокращения» для скрининга в отношении связывания с более чем 3000 человеческими рецепторами. В анализе сокращения чем выше связывание, тем выше вероятность реальности взаимодействия. В общем случае результаты, помеченные как «V. слаб.» маловероятно являются реальными взаимодействиями. scFvCLEC12A-A не демонстрировал каких-либо неспецифических взаимодействий с любым рецептором, отличным от Clec12A, или рецепторами, которые появляются в этом анализе как артефакты. Анализ сокращения использовали для скрининга клонов для нецелевых анализов. Отобранные клоны scFv-Fc исследуют более тщательно в дополнительных скрининговых и подтверждающих анализах.

Пример 16 - Доклиническое исследование

Терапия CAR T-клетками обеспечивает действенный терапевтический вариант при различных связанных с B-клетками гемобластозах. Одной из основных проблем эффективности является уклонение опухолевых клеток с низкой плотностью антигена, которое наблюдали клинически при нескольких злокачественных образованиях, которые лечили с помощью CAR-терапии. Необходимы новые концепции дизайна CAR для разрешения фенотипической гетерогенности, включая клональную вариабельность экспрессии антигена-мишени. На Фиг. 18А проиллюстрированы ранее представленные концепции CAR, включая концепции с гейтингом «булева логика ИЛИ- и И», а также экспрессию CAR с гейтингом «ЕСЛИ-ТО».

Авторы изобретения разработали комбинаторную концепцию CAR, которая может преодолеть резистентность ОМЛ вследствие гетерогенности мишени и уклонения при низких уровнях антигена. Рецидив при низких уровнях антигена можно предотвратить с помощью нового дизайна химерного рецептора с комбинированной сигнализацией, которая является синергетической и подбирается для соответствующего выбора мишени.

Профилирование экспрессии антигена методом проточной цитометрии при ОМЛ в сравнении с нормальным гемопоэзом проводили для нескольких ранее обнаруженных кандидатов-мишеней CAR при ОМЛ. Чтобы обеспечить платформу для идентификации идеального комбинаторного дизайна CAR, создавали *in-vitro* и *in-vivo* модели на основании линий клеток ОМЛ с повышенными или пониженными уровнями антигена ADGRE2 и CLEC12A для имитации гетерогенности ОМЛ и уклонения при низких уровнях антигена. Используя бицистронный γ -ретровирусный вектор, проводили скрининг разных комбинаторных форматов CAR, нацеленных на ADGRE2 и CLEC12A.

ADGRE2 был выбран как мишень CAR из-за его высокого уровня положительности в общих и лейкозных стволовых клетках (LSC) ОМЛ в молекулярно гетерогенной популяции пациентов с ОМЛ (Фиг. 1А и 1В). Измеряли аффинность ADGRE2-нацеленного CAR, содержащего внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий ADGRE2-A scFv, и точно подбирали сигнализацию CD3zeta для достижения идеального порога уничтожения, который бы позволил не затрагивать нормальные клетки с низкими уровнями

ADGRE2. После этого авторы изобретения исследовали потенциал совместного нацеливания на второй связанный с ОМЛ антиген для уменьшения потенциального уклонения ОМЛ с низкими уровнями антигена-мишени CAR. CLEC12A был идентифицирован как подходящая совместная мишень благодаря его неперекрывающимся профилям экспрессии при нормальном гемопоэзе и в других жизненно-важных тканях (Фиг. 4А-4С).

Была разработана ADCLEC.syn1, новая комбинаторная конструкция CAR, содержащая ADGRE2-нацеленный 28z1XX-CAR, который содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий ADGRE2-A scFv, и CLEC12A-нацеленный химерный костимулирующий рецептор (CCR), который содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий CLEC12A-A scFv. Кроме того, также была разработана конструкция, содержащая ADGRE2-нацеленный 28z1XX-CAR, который содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий ADGRE2-A scFv, и CLEC12A-нацеленный BBz-CAR, который содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий CLEC12A-A scFv.

ADCLEC.syn1 действует на основании стратегии гейтинга, описанной как «ЕСЛИ-ЛУЧШЕ» (Фиг. 18В): сама по себе высокая экспрессия мишени CAR инициирует уничтожение, тогда как низкая экспрессия мишени CAR - нет, если отсутствует мишень CCR. Дополнительное взаимодействие CCR снижает порог для CAR-опосредованного уничтожения посредством повышения авидности и костимуляции, что обеспечивает большую чувствительность CAR, которая преднамеренно ограничена клетками-мишенями, экспрессирующими оба антигена.

В контексте ADCLEC.syn1, ADGRE2-положительные/CLEC12A-отрицательные и ADGRE2-положительные/CLEC12A-положительные клетки инициируют клеточный лизис, тогда как ADGRE2-отрицательные/CLEC12A-положительные клетки и ADGRE2-отрицательные/CLEC12A-отрицательные клетки не были затронуты. Что важно, ADCLEC.syn1 опосредовал более эффективное уничтожение ADGRE2-положительных/CLEC12A-положительных клеток по сравнению с ADGRE2-положительными/CLEC12A-отрицательными клетками (Фиг. 19А).

При использовании линий клеток ОМЛ с разными уровнями ADGRE2 для моделирования уклонения антигена ADCLEC.syn1 имел превосходящую способность к уничтожению против ADGRE2-низк./CLEC12A-низк. и ADGRE2-очень-низк./CLEC12A-низк. клеток-мишеней ОМЛ по сравнению с ADGRE2-CAR (Фиг. 19В).

При использовании *in-vivo* ксенотрансплантатных моделей NSG сконструированных вариантов линии клеток ОМЛ MOLM13 с низкими уровнями ADGRE2 для моделирования уклонения антигена было обнаружено, что ADCLEC.syn1 превосходил ADGRE2-нацеленный CAR, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, содержащий только ADGRE2-A scFv без CLEC12A-нацеленного CCR с отсутствием помощи со стороны CLEC12A-CCR. Что важно, ADCLEC.syn1 также превосходил в остальном идентичную альтернативную версию двойного CAR (ADGRE2-CAR+CLEC12A-CAR с гейтингом

«ИЛИ») в условиях MOLM13 с низкими уровнями ADGRE2, что дополнительно подчеркивает важность точного подбора общей сигнализации (Фиг. 20). Высокая *in-vivo* действенность также была подтверждена против ряда линий клеток ОМЛ с широким диапазоном уровней ADGRE2 и CLEC12A, отражающих гетерогенность ОМЛ в популяции (Фиг. 20).

При клинически релевантных дозах CAR T-клеток ADCLEC.syn1 индуцировал полную и продолжительную ремиссию в ксенотрансплантатных моделях MOLM13 (ADGRE2-выс./CLEC12A-низк.) и U937 (ADGRE2-низк./CLEC12A-выс.). В частности, в ксенотрансплантатных моделях NSG с использованием вариантной линии клеток ОМЛ MOLM13 с высокими уровнями ADGRE2 (ДТ) и высокими уровнями антигена CLEC12A ADCLEC.syn1 CAR T-клетки титровали до низких доз, установив 1×10^5 ADCLEC.syn1 T-клеток как минимальную эффективную дозу для индукции полной и продолжительной ремиссии (Фиг. 20). Было обнаружено, что ADCLEC.syn1 CAR T-клетки функционально сохраняются в течение > 70 дней, при этом одна доза CAR T-клеток действенным образом предотвращает рецидив, моделируемый повторной стимуляцией ОМЛ (Фиг. 21).

В целом, эти данные обеспечивают доклинические доказательства того, что при гейтинге «ЕСЛИ-ЛУЧШЕ» CAR+CCR T-клетки (ADCLEC.syn1) могут превосходить одиночные CAR T-клетки (ADGRE2-CAR) и двойные CAR T-клетки (ADGRE2-CAR+CLEC12A-CAR). ADCLEC.syn1 повышал противолейкозную эффективность и предотвращал уклонение ОМЛ при низких уровнях антигена посредством выявления рационально выбранной комбинаторной сигнатуры антигена-мишени, которая обычно присутствует при ОМЛ, но ограничена в нормальных клетках. Используя фенотипически репрезентативные ксенотрансплантатные модели ОМЛ и клинически релевантные дозы T-клеток, был продемонстрирован высокий терапевтический потенциал ADCLEC.syn1 CAR T-клеток, что дополнительно свидетельствует в пользу клинической трансляции концепции CAR с гейтингом «ЕСЛИ-ЛУЧШЕ» в исследование фазы I.

Хотя описанный в настоящем описании объект изобретения и некоторые его преимущества были подробно описаны, следует понимать, что в данном случае можно осуществлять различные изменения, замены и перемены, не отступая от сути и объема изобретения. Кроме того, подразумевается, что объем настоящей заявки не ограничен конкретными вариантами осуществления процесса, машин, производства и композиции вещества, а также способами, описанными в данном тексте. Как будет понятно специалисту в данной области техники из изложения описанного в настоящем изобретении предмета изобретения, процессы, машины, производство, композиции веществ или способы, существующие на данный момент или разработанные в будущем, которые осуществляют практически такую же функцию или позволяют достичь практически такого же результата, что и соответствующие варианты осуществления, описанные в настоящем описании, можно использовать в соответствии с описанным в настоящем изобретении предметом изобретения. Соответственно, подразумевается, что объем прилагаемой формулы изобретения включает такие процессы, машины, производство, композиции веществ или

способы.

Различные патенты, заявки на патенты, публикации, описания продуктов, протоколы и номера доступа последовательностей, цитируемые в настоящей заявке, в полном объеме и во всех целях включены в настоящее описание посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный рецептор, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с ADGRE2, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию.

2. Химерный рецептор по п.1, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), Fab или F(ab)₂.

3. Химерный рецептор по п.2, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

4. Химерный рецептор по п.3, где scFv представляет собой гуманизированный scFv.

5. Химерный рецептор по любому из пп. 1-4, где вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35.

6. Химерный рецептор по любому из пп. 1-5, где вариабельная область легкой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38.

7. Химерный рецептор по любому из пп. 1-6, где вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35; а вариабельная область легкой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38.

8. Химерный рецептор по любому из пп. 1-7, где вариабельная область тяжелой цепи

содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55 или SEQ ID NO: 146.

9. Химерный рецептор по любому из пп. 1-8, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:46 или SEQ ID NO:49.

10. Химерный рецептор по любому из пп. 1-9, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39.

11. Химерный рецептор по любому из пп. 1-10, где переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 147.

12. Химерный рецептор по любому из пп. 1-11, где переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 50.

13. Химерный рецептор по любому из пп. 1-12, где переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40.

14. Химерный рецептор по любому из пп. 1-13, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 55 или SEQ ID NO: 146; и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%,

приведенную в SEQ ID NO: 43; а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44;

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46; а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 47; или

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 49; а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50;

18. Химерный рецептор по любому из пп. 1-17, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39; а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40.

19. Химерный рецептор по любому из пп. 1-18, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит линкер между переменной областью тяжелой цепи и переменной областью легкой цепи.

20. Химерный рецептор по п.19, где линкер состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 149.

21. Химерный рецептор по любому из пп. 1-20, где переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи расположены от N- до C-конца: V_H - V_L .

22. Химерный рецептор по любому из пп. 1-21, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит или представляет собой scFv, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 148.

23. Химерный рецептор по любому из пп. 1-22, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит или представляет собой scFv, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 51.

24. Химерный рецептор по любому из пп. 1-23, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит или представляет собой scFv, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 41.

25. Химерный рецептор по любому из пп. 1-24, где внеклеточный антигенсвязывающий домен связывается с ADGRE2 с константой диссоциации (K_D) менее чем приблизительно 10^{-8} М, менее чем приблизительно 10^{-9} М, менее чем приблизительно 10^{-10} М, менее чем приблизительно 10^{-11} М, менее чем приблизительно 10^{-12} М или менее чем приблизительно 10^{-13} М.

26. Химерный рецептор по любому из пп. 1-25, где внеклеточный антигенсвязывающий домен связывается с ADGRE2 с EC50 от приблизительно 1 нМ до приблизительно 100 нМ.

27. Химерный рецептор по п.26, где EC50 составляет от приблизительно 10 нМ до приблизительно 95 нМ.

28. Химерный рецептор по п.26, где EC50 составляет от приблизительно 25 нМ до приблизительно 75 нМ.

29. Химерный рецептор по любому из пп. 1-28, где трансмембранный домен содержит полипептид CD8, полипептид CD28, полипептид CD3 ζ , полипептид CD4, полипептид 4-1BB, полипептид OX40, полипептид ICOS, полипептид CTLA-4, полипептид PD-1, полипептид LAG-3, полипептид 2B4 или полипептид BTLA.

30. Химерный рецептор по п.29, где трансмембранный домен содержит полипептид CD28.

31. Химерный рецептор по любому из пп. 1-30, где внутриклеточный домен содержит полипептид CD3 ζ .

32. Химерный рецептор по п.31, где полипептид CD3 ζ представляет собой модифицированный полипептид CD3 ζ .

33. Химерный рецептор по п.32, где модифицированный полипептид CD3 ζ содержит нативный ITAM1, вариант ITAM2, состоящий из двух мутаций с потерей функции, и вариант ITAM3, состоящий из двух мутаций с потерей функции.

34. Химерный рецептор по п.33, где нативный ITAM1 состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 15.

35. Химерный рецептор по п.33 или п.34, где вариант ITAM2 состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 21.

36. Химерный рецептор по любому из пп. 33-35, где вариант ITAM3 состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 25.

37. Химерный рецептор по любому из пп. 32-36, где модифицированный полипептид CD3 ζ содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 27.

38. Химерный рецептор по любому из пп. 31-37, где внутриклеточный домен дополнительно содержит по меньшей мере одну костимулирующую сигнальную область.

39. Химерный рецептор по п.38, где по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит полипептид CD28, полипептид 4-1BB, полипептид OX40, полипептид ICOS, полипептид DAP-10 или их комбинацию.

40. Химерный рецептор по п.39, где по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит полипептид CD28.

41. Химерный рецептор по любому из пп. 1-40, где химерный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), химерный костимулирующий рецептор (CCR) или TCR-подобную слитую молекулу.

42. Химерный рецептор по п.41, где химерный рецептор представляет собой CAR.

43. Химерный рецептор, содержащий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CLEC12A, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, причем внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит:

и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 116, или ее консервативную модификацию;

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 123, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 124, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 125, или ее консервативную модификацию; или

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 132, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 133, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 134, или ее консервативную модификацию.

44. Химерный рецептор по п.43, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), Fab или F(ab)₂.

45. Химерный рецептор по п.44, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

46. Химерный рецептор по п.45, где scFv представляет собой человеческий scFv.

47. Химерный рецептор по любому из пп. 43-46, где переменная область тяжелой цепи содержит:

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71;

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 82, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83;

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 91;

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 98;

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 103, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83;

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID

аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 98; а переменная область легкой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 99, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 93, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 151.

55. Химерный рецептор по любому из пп. 43-54, где переменная область тяжелой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71; а переменная область легкой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74.

56. Химерный рецептор по любому из пп. 43-55, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 126 или SEQ ID NO: 135.

57. Химерный рецептор по любому из пп. 43-56, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 126 или SEQ ID NO: 135.

58. Химерный рецептор по любому из пп. 43-57, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 95 или SEQ ID NO: 100.

59. Химерный рецептор по любому из пп. 43-58, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75.

60. Химерный рецептор по любому из пп. 43-59, где переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75; а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76;

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86; а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87;

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 95; а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 96; или

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 100; а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 101.

66. Химерный рецептор по любому из пп. 43-65, где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75; а вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76.

67. Химерный рецептор по любому из пп. 43-66, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит линкер между вариабельной областью тяжелой цепи и вариабельной областью легкой цепи.

68. Химерный рецептор по п.67, где линкер состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 149.

69. Химерный рецептор по любому из пп. 43-68, где вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи расположены от N- до C-конца: V_H - V_L .

70. Химерный рецептор по любому из пп. 43-69, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит или представляет собой scFv, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 128 или SEQ ID NO: 137.

71. Химерный рецептор по любому из пп. 43-70, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит или представляет собой scFv, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 97 или SEQ ID NO: 102.

72. Химерный рецептор по любому из пп. 43-71, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит или представляет собой scFv, который содержит или состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 79.

73. Химерный рецептор по любому из пп. 43-72, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит или представляет собой scFv, связывающийся с CLEC12A с константой диссоциации (K_D) менее чем приблизительно 10^{-8} M, менее чем приблизительно 10^{-9} M, менее чем приблизительно 10^{-10} M, менее чем приблизительно 10^{-10} M.

¹¹ M, менее чем приблизительно 10^{-12} M или менее чем приблизительно 10^{-13} M.

74. Химерный рецептор по п.73, где K_D составляет приблизительно 0,1 пМ или меньше.

75. Химерный рецептор по п.73, где K_D составляет от приблизительно 0,05 пМ до приблизительно 0,5 пМ.

76. Химерный рецептор по п.73, где K_D составляет от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 5,0 нМ.

77. Химерный рецептор по п.76, где K_D составляет от приблизительно 0,3 нМ до приблизительно 3,5 нМ.

78. Химерный рецептор по любому из пп. 43-77, где внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит или представляет собой scFv, связывающийся с CLEC12A с EC50 от приблизительно 1 нМ до приблизительно 100 нМ.

79. Химерный рецептор по любому из пп. 43-78, где трансмембранный домен содержит полипептид CD8, полипептид CD28, полипептид CD3 ζ , полипептид CD4, полипептид 4-1BB, полипептид OX40, полипептид ICOS, полипептид CTLA-4, полипептид PD-1, полипептид LAG-3, полипептид 2B4 или полипептид BTLA.

80. Химерный рецептор по п.79, где трансмембранный домен содержит полипептид CD8.

81. Химерный рецептор по любому из пп. 43-80, где химерный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), химерный костимулирующий рецептор (CCR) или TCR-подобную слитую молекулу.

82. Химерный рецептор по п.81, где химерный рецептор представляет собой химерный костимулирующий рецептор (CCR).

83. Химерный рецептор по любому из пп. 43-82, где внутриклеточный домен не содержит полипептид CD3 ζ .

84. Химерный рецептор по любому из пп. 43-83, где внутриклеточный домен содержит по меньшей мере одну костимулирующую сигнальную область.

85. Химерный рецептор по п.84, где по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит полипептид CD28, полипептид 4-1BB, полипептид OX40, полипептид ICOS, полипептид DAP-10 или их комбинацию.

86. Химерный рецептор по п.85, где по меньшей мере одна костимулирующая сигнальная область содержит полипептид 4-1BB.

87. Химерный рецептор по любому из пп. 1-86, где химерный рецептор экспрессируется из вектора.

88. Химерный рецептор по п.87, где вектор представляет собой вирусный вектор.

89. Химерный рецептор по п.88, где вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор.

90. Клетка, содержащая химерный рецептор по любому из пп. 1-89.

91. Клетка, содержащая а) первый химерный рецептор, который представляет собой химерный рецептор по любому из пп. 1-42 и 87-89, и б) второй химерный рецептор, который

представляет собой химерный рецептор по любому из пп. 43-89.

92. Клетка по п.91, где первый химерный рецептор представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR), а b) второй химерный рецептор представляет собой химерный костимулирующий рецептор (CCR).

93. Клетка по п.92, где CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с ADGRE2 и содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию; и/или

вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию.

94. Клетка по п.93, где вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35; а вариабельная область легкой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38.

95. Клетка по п.93 или п.94, где

вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 39; и/или

вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%,

приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 40.

96. Клетка по п.95, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39; а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40.

97. Клетка по любому из пп. 92-96, где CCR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с CLEC12A и содержит:

переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71, или ее консервативную модификацию; и/или

переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72, или ее консервативную модификацию, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, или ее консервативную модификацию, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74, или ее консервативную модификацию.

98. Клетка по п.97, где переменная область тяжелой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71; а переменная область легкой цепи содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 74.

99. Клетка по п.97 или п.98, где

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 75; и/или

переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%,

приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% идентичной или гомологичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 76.

100. Клетка по п.95, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 75; а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76.

101. Клетка по любому из пп. 90-100, где клетка трансдуцирована химерным рецептором.

102. Клетка по любому из пп. 90-101, где химерный рецептор конститутивно экспрессируется на поверхности клетки.

103. Клетка по любому из пп. 90-102, где клетка представляет собой иммунореактивную клетку.

104. Клетка по любому из пп. 90-103, где клетка представляет собой клетку лимфоидной линии дифференцировки или клетку миелоидной линии дифференцировки.

105. Клетка по любому из пп. 90-104, где клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, естественной клетки-киллера (NK), стволовой клетки, из которой может дифференцироваться лимфоидная клетка, и стволовой клетки, из которой может дифференцироваться миелоидная клетка.

106. Клетка по любому из пп. 90-105, где клетка представляет собой Т-клетку.

107. Клетка по п.105 или п.106, где Т-клетка выбрана из группы, состоящей из хелперных Т-клеток, цитотоксических Т-клеток, Т-клеток памяти, регуляторных Т-клеток, опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), естественных Т-клеток-киллеров, инвариантных Т-клеток слизистой оболочки и $\gamma\delta$ Т-клеток.

108. Клетка по любому из пп. 90-105, где клетка представляет собой естественную клетку-киллера (NK).

109. Клетка по п.108, где NK-клетка получена из стволовой клетки.

110. Клетка по п.105 или п.109, где стволовая клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку.

111. Клетка по п.110, где плюрипотентная стволовая клетка представляет собой эмбрионную стволовую клетку или индуцированную плюрипотентную стволовую клетку.

112. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный рецептор по любому из пп. 1-89.

113. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный рецептор по любому из пп. 1-42 и 87-89.

114. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая химерный рецептор по любому из пп. 43-89.

115. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из пп. 112-114, дополнительно содержащая промотор, который функционально связан с химерным рецептором.

116. Молекула нуклеиновой кислоты по п.115, где промотор является эндогенным или экзогенным.

117. Молекула нуклеиновой кислоты по п.116, где экзогенный промотор выбран из группы, состоящей из промотора фактора элонгации (EF)-1, немедленно-раннего промотора цитомегаловируса (CMV), раннего промотора вируса обезьян 40 (SV40), промотора фосфоглицераткиназы (PGK), промотора металлотионеина и промотора убиквитина С.

118. Молекула нуклеиновой кислоты по п.117, где промотор представляет собой индуцибельный промотор.

119. Молекула нуклеиновой кислоты по п.118, где индуцибельный промотор выбран из группы, состоящей из промотора транскрипционного элемента NFAT (TRE), промотора CD69, промотора CD25, промотора IL-2, промотора 4-1BB, промотора PD1 и промотора LAG3.

120. Молекула нуклеиновой кислоты по п.116, где промотор представляет собой эндогенный промотор.

121. Молекула нуклеиновой кислоты по п.120, где эндогенный промотор выбран из промотора TCR альфа, промотора TCR бета и промотора бета 2-микроглобулина.

122. Композиция нуклеиновых кислот, содержащая первую молекулу нуклеиновой кислоты, которая представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 113 и 114-121, и вторую молекулу нуклеиновой кислоты, которая представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 114-121.

123. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 112-121.

124. Вектор, содержащий композицию нуклеиновых кислот по п.122.

125. Вектор по п.123 или п.124, где вектор представляет собой вирусный вектор.

126. Вектор по п.125, где вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор.

127. Клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 112-121.

128. Клетка, содержащая композицию нуклеиновых кислот по п.122.

129. Клетка, содержащая вектор по любому из пп. 123-126.

130. Клетка по любому из пп. 127-129, где клетка представляет собой Т-клетку.

131. Клетка по любому из пп. 127-129, где клетка представляет собой естественную клетку-киллера (NK).

132. Клетка по п.131, где NK-клетка получена из стволовой клетки.

133. Композиция, содержащая клетку по любому из пп. 90-111 и 127-132.

134. Композиция по п.133, которая представляет собой фармацевтическую композицию, дополнительно содержащую фармацевтически приемлемый носитель.

135. Композиция по п.133 или п.134, содержащая от приблизительно 25×10^6 до приблизительно 150×10^6 клеток.

136. Композиция по любому из пп. 133-135, содержащая от приблизительно 25×10^6 до приблизительно 50×10^6 клеток.

137. Композиция по любому из пп. 133-136, содержащая приблизительно $2,5 \times 10^6$ клеток.

138. Способ уменьшения опухолевой нагрузки у субъекта, включающий введение субъекту клетки по любому из пп. 90-111 и 127-132 или композиции по любому из пп. 133-137.

139. Способ по п.138, где способ обеспечивает уменьшение числа опухолевых клеток, уменьшение размера опухоли и/или уничтожение опухоли у субъекта.

140. Способ повышения или продления выживаемости у субъекта, имеющего опухоль, включающий введение субъекту клетки по любому из пп. 90-111 и 127-132 или композиции по любому из пп. 133-137.

141. Способ лечения и/или предотвращения развития опухоли у субъекта, включающий введение субъекту клетки по любому из пп. 90-111 и 127-132 или композиции по любому из пп. 133-137.

142. Способ по любому из пп. 138-141, где опухоль экспрессирует ADGRE2 и/или CLEC12A.

143. Способ по любому из пп. 138-142, где опухоль представляет собой рак.

144. Способ по любому из пп. 138-143, где опухоль представляет собой рак крови.

145. Способ по п.144, где опухоль выбрана из группы, состоящей из множественной миеломы, лейкоза, лимфом и миелоидных злокачественных образований.

146. Способ по п.145, где лейкоз выбран из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ), острого лейкоза смешанного типа (ОЛСТ), волосатоклеточного лейкоза и В-клеточного промиелоцитарного лейкоза.

147. Способ по п.146, где лейкоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ).

148. Способ по п.147, где ОМЛ представляет собой рецидивирующий/рефрактерный острый миелоидный лейкоз (P/P ОМЛ).

149. Способ по п.145, где миелоидные злокачественные образования выбраны из группы, состоящей из миелодиспластических синдромов (МДС), миелопролиферативных новообразований (МПН), миелоидных/лимфоидных новообразований (например, миелоидных/лимфоидных новообразований с эозинофилией и перестройкой рецептора тромбоцитарного фактора роста альфа (PDGFRA), рецептора тромбоцитарного фактора роста альфа бета (PDGFRB) или рецептора фактора роста фибробластов 1 (FGFR1), или с PCM1-JAK2), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), бластного новообразования из плазматоидных дендритных клеток, В-лимфобластных лейкоза/лимфомы и Т-лимфобластных лейкоза/лимфомы.

150. Способ по п.149, где миелоидные злокачественные образования включают

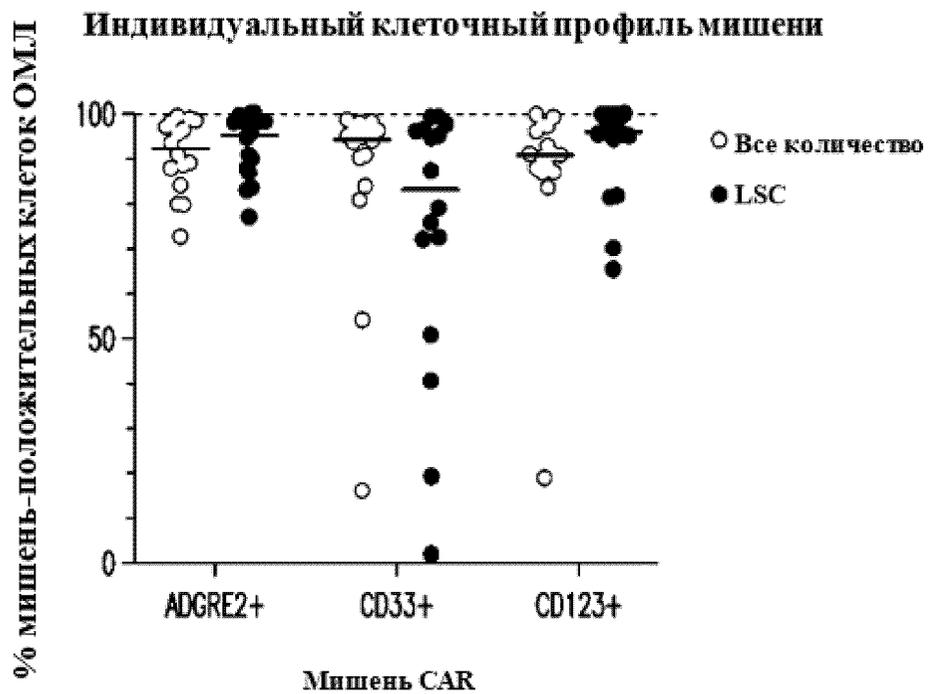
миелодиспластические синдромы (МДС).

151. Способ по любому из пп. 138-150, где субъект представляет собой субъекта-человека.

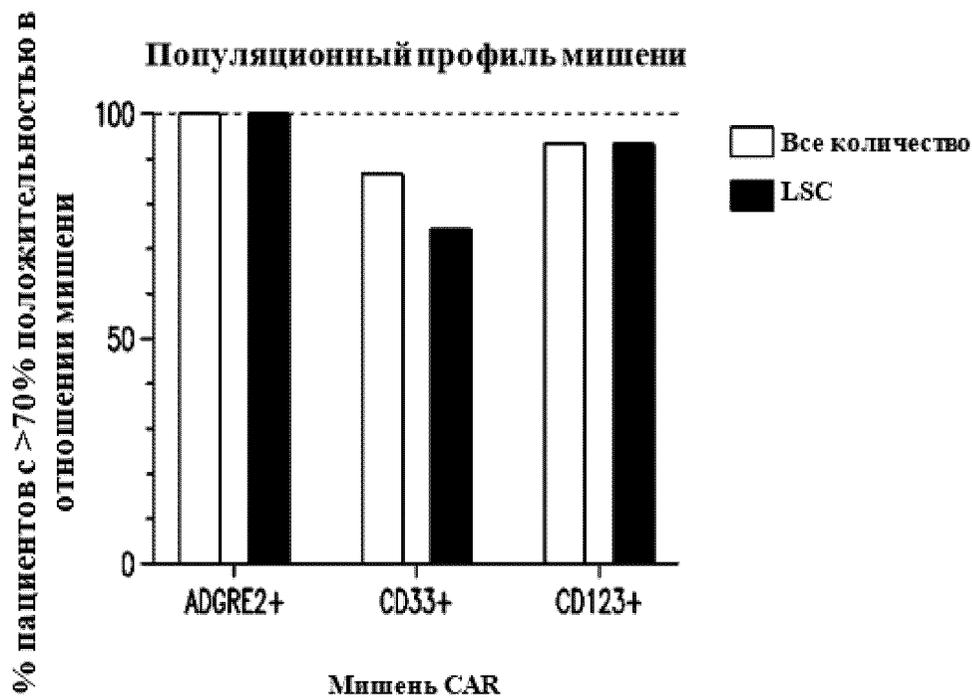
152. Способ получения клетки, содержащей химерный рецептор по любому из пп. 1-90, включающий внесение в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует химерный рецептор по любому из пп. 1-90.

153. Способ получения клетки, содержащей химерный рецептор по любому из пп. 1-42 и 87-89 и химерный рецептор по любому из пп. 43-89, включающий внесение в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует химерный рецептор по любому из пп. 1-42 и 87-89 и химерный рецептор по любому из пп. 43-89.

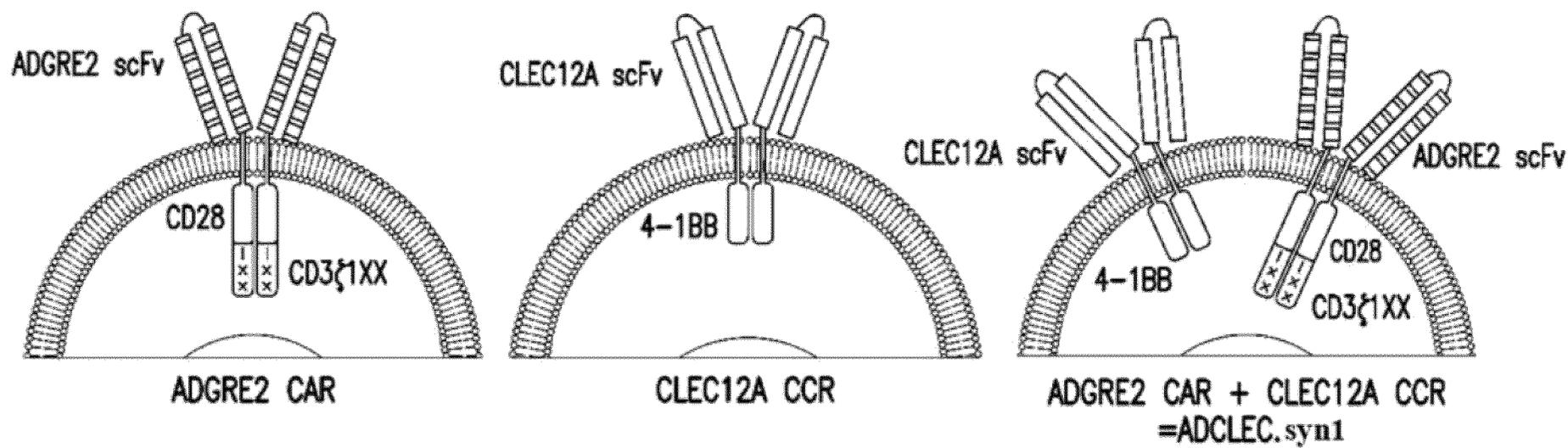
По доверенности



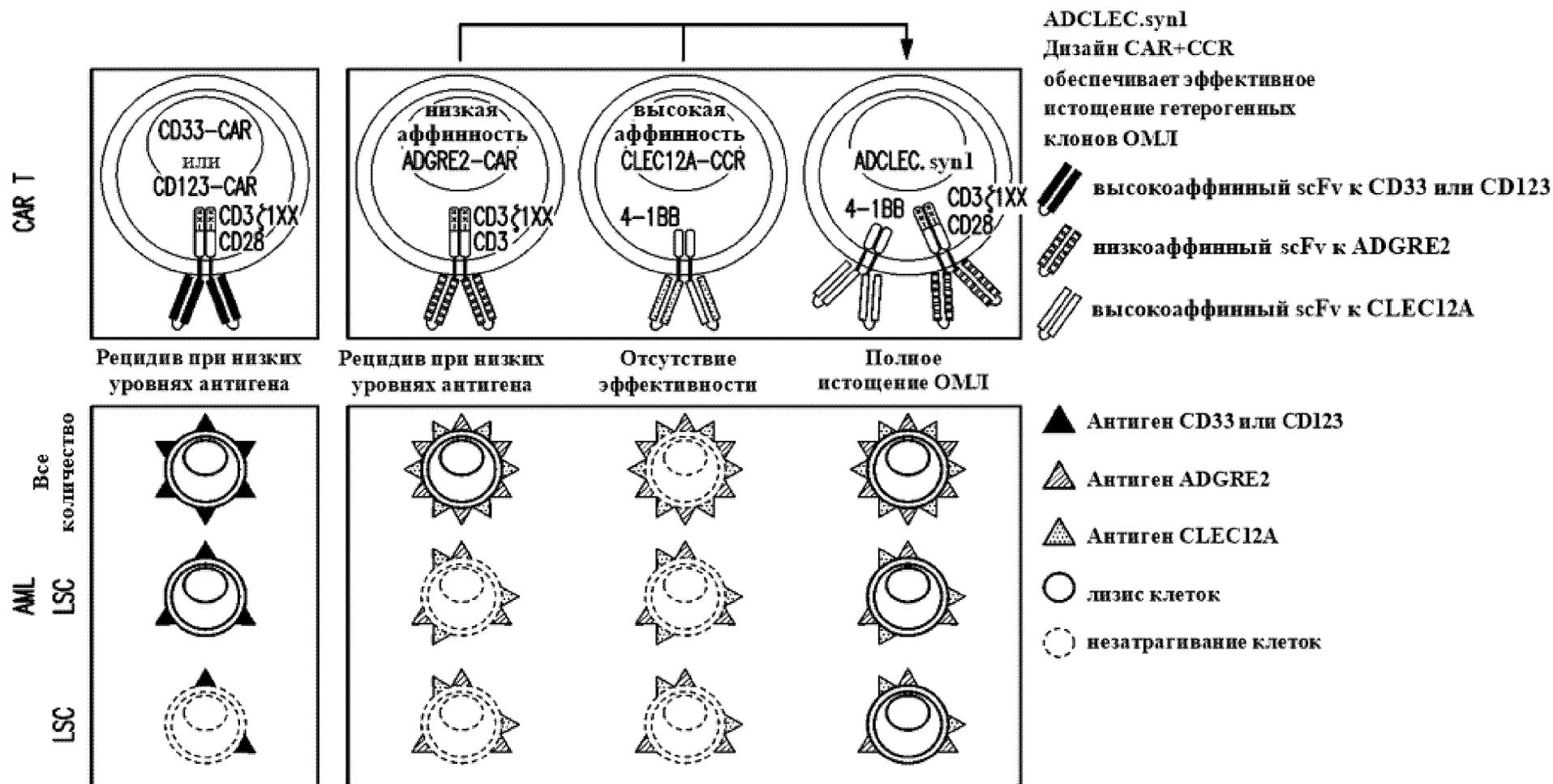
Фиг. 1А



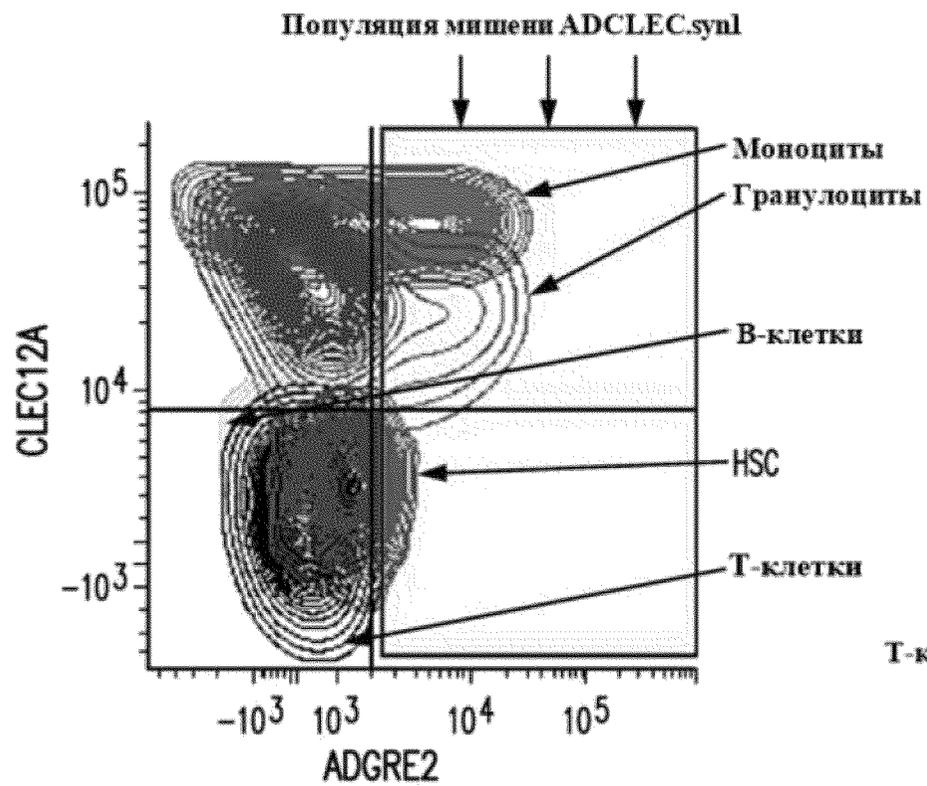
Фиг. 1В



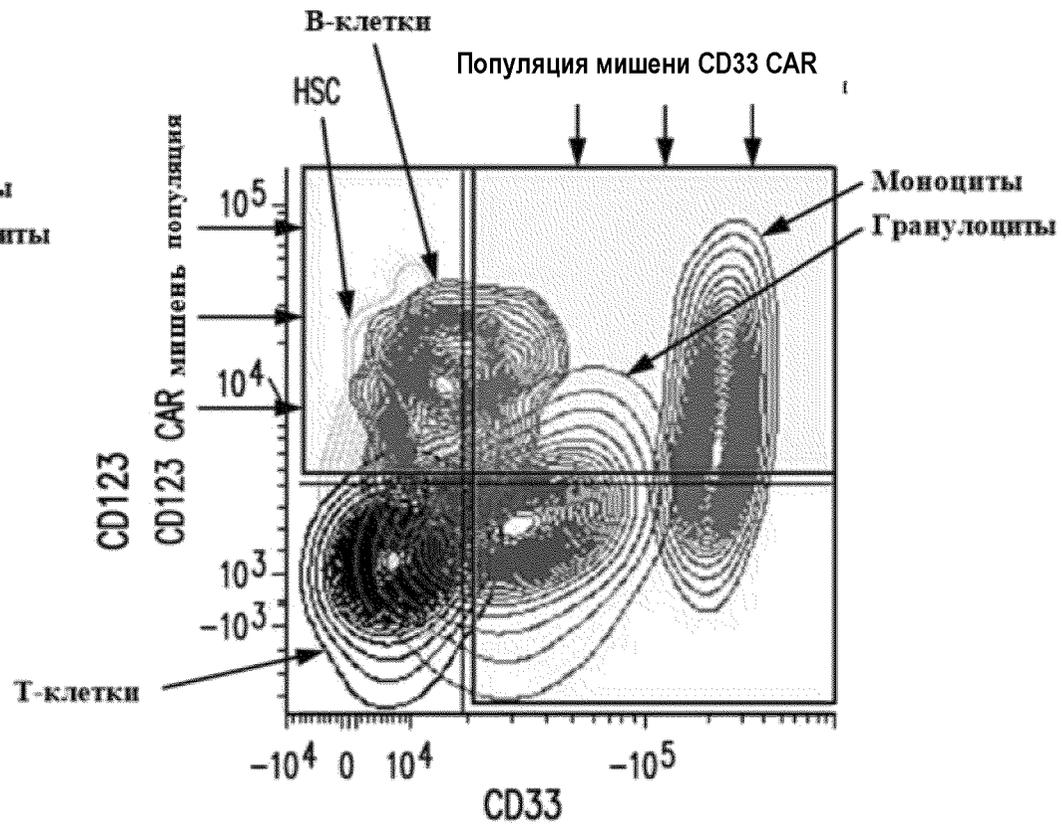
Фиг. 2



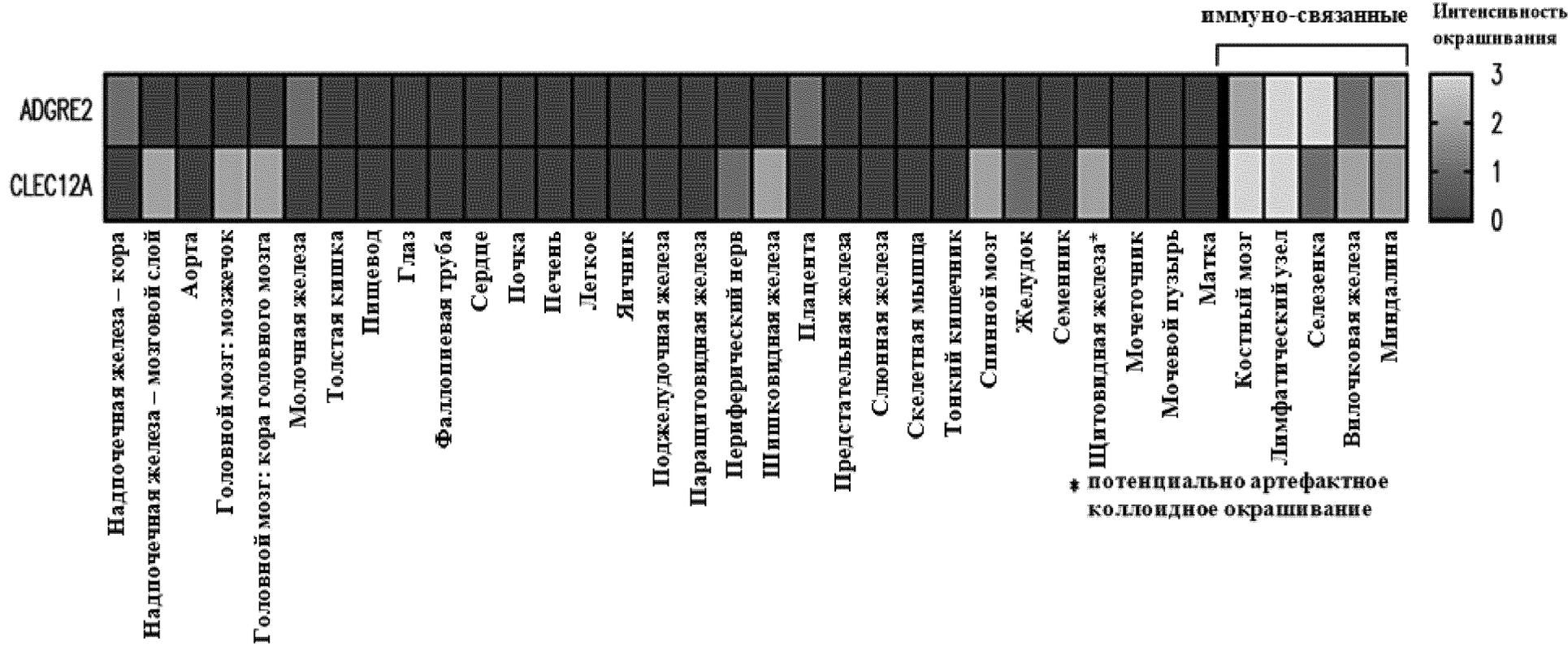
Фиг. 3



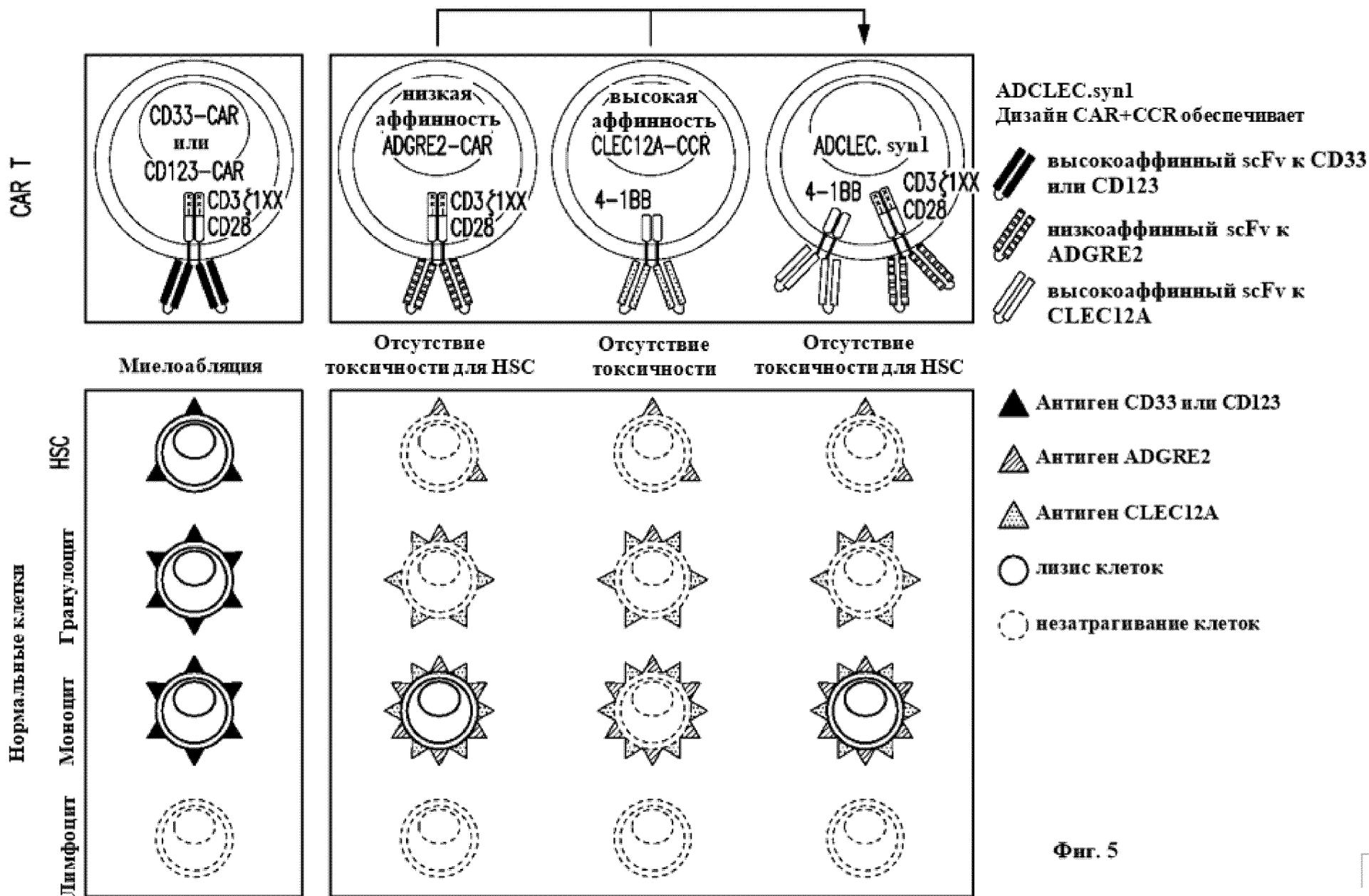
Фиг. 4А



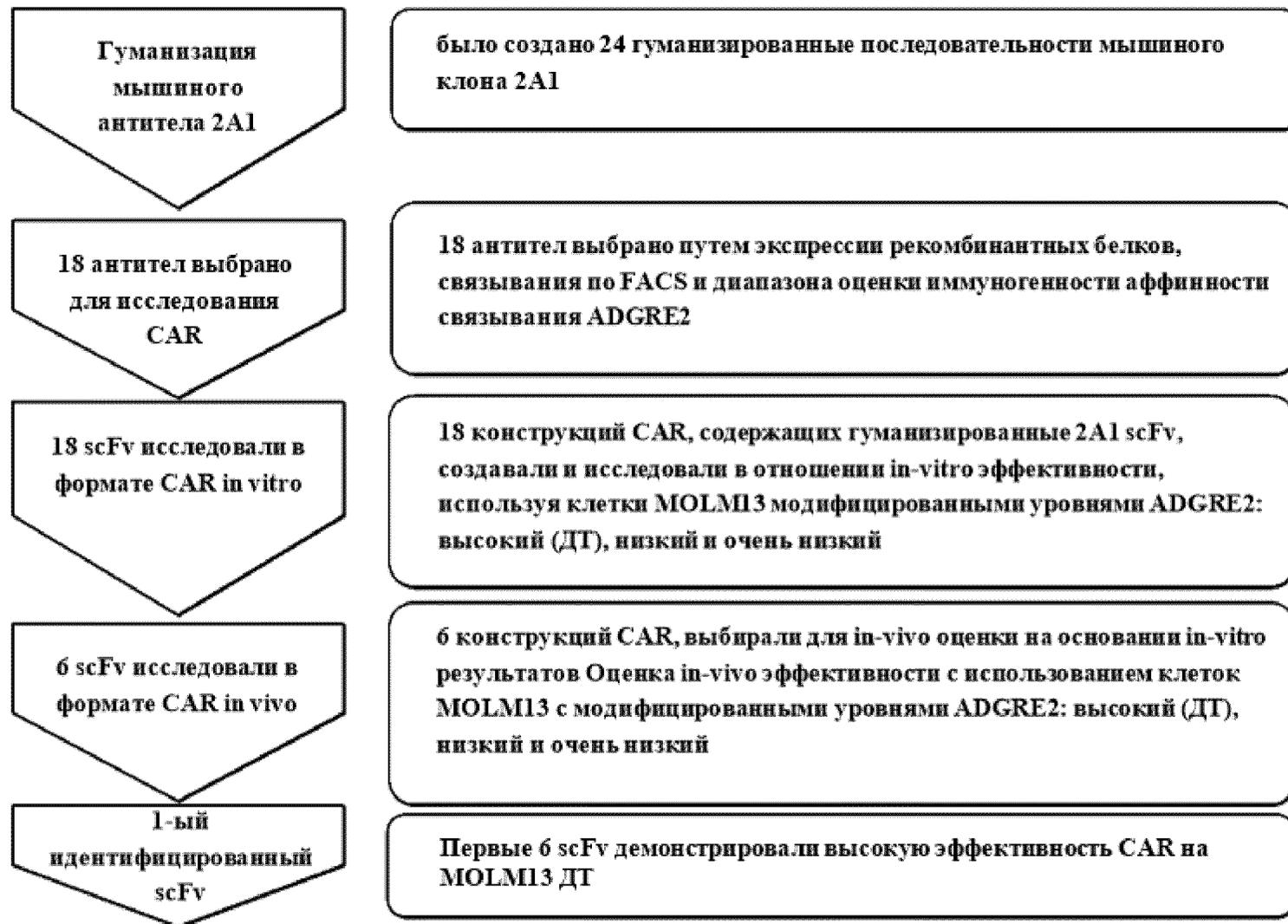
Фиг. 4В



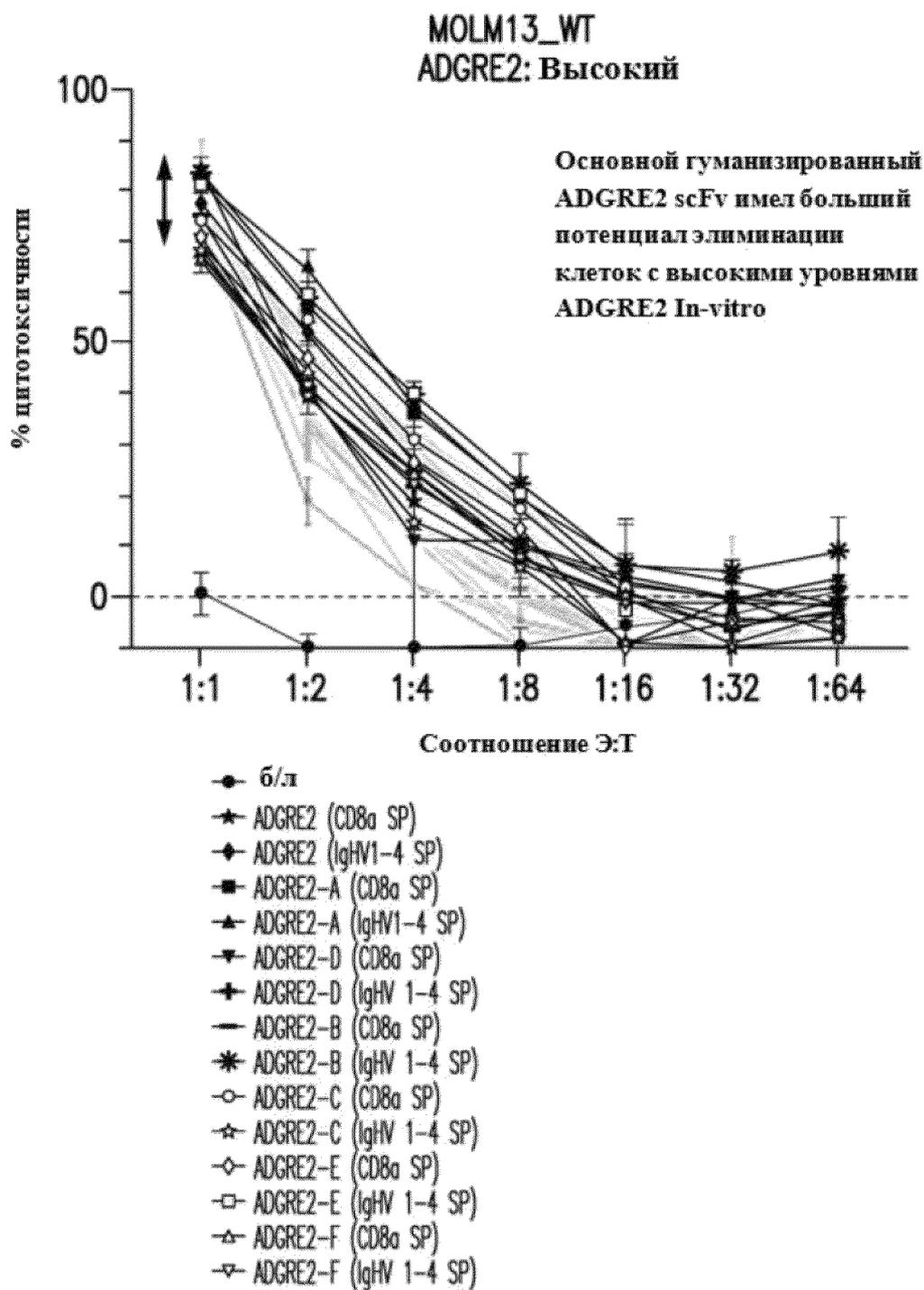
Фиг. 4С



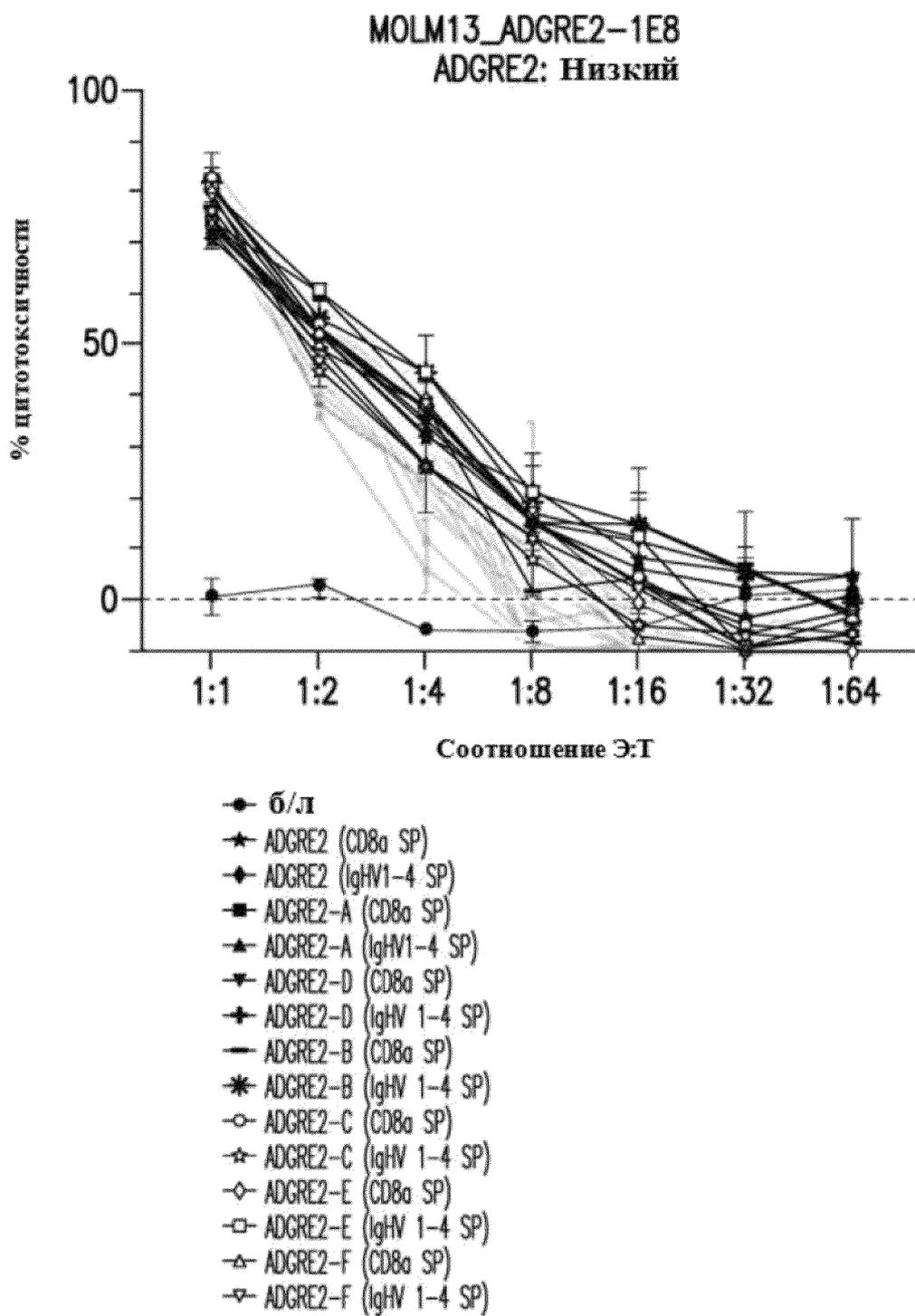
Фиг. 5



Фиг. 6



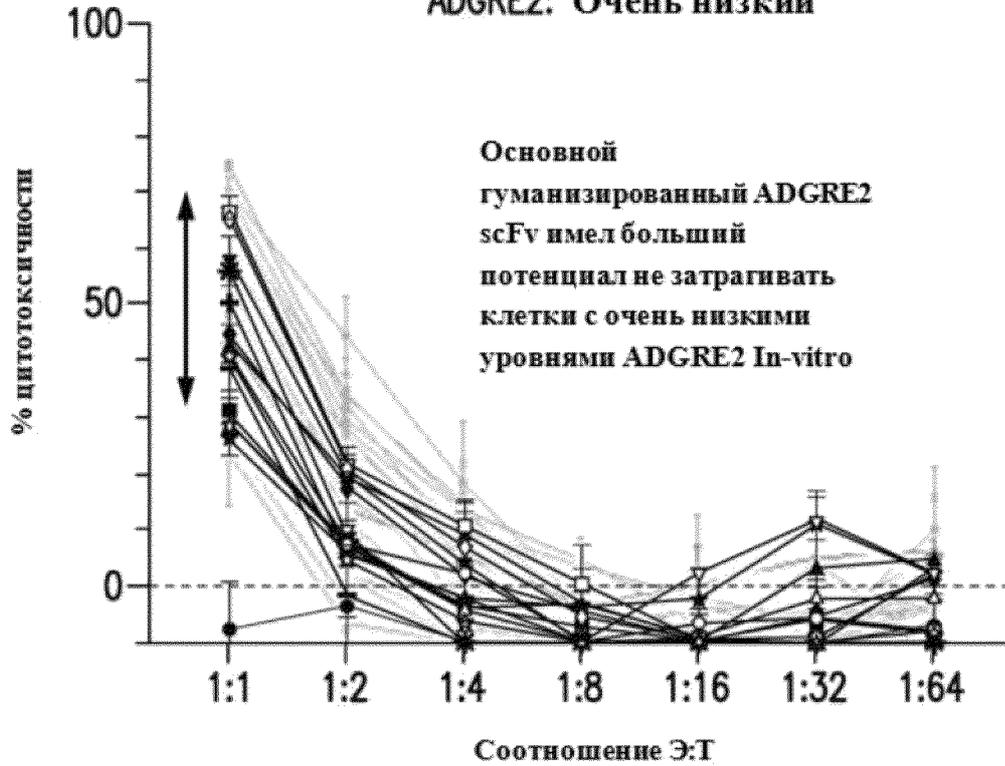
Фиг. 7А



Фиг. 7В

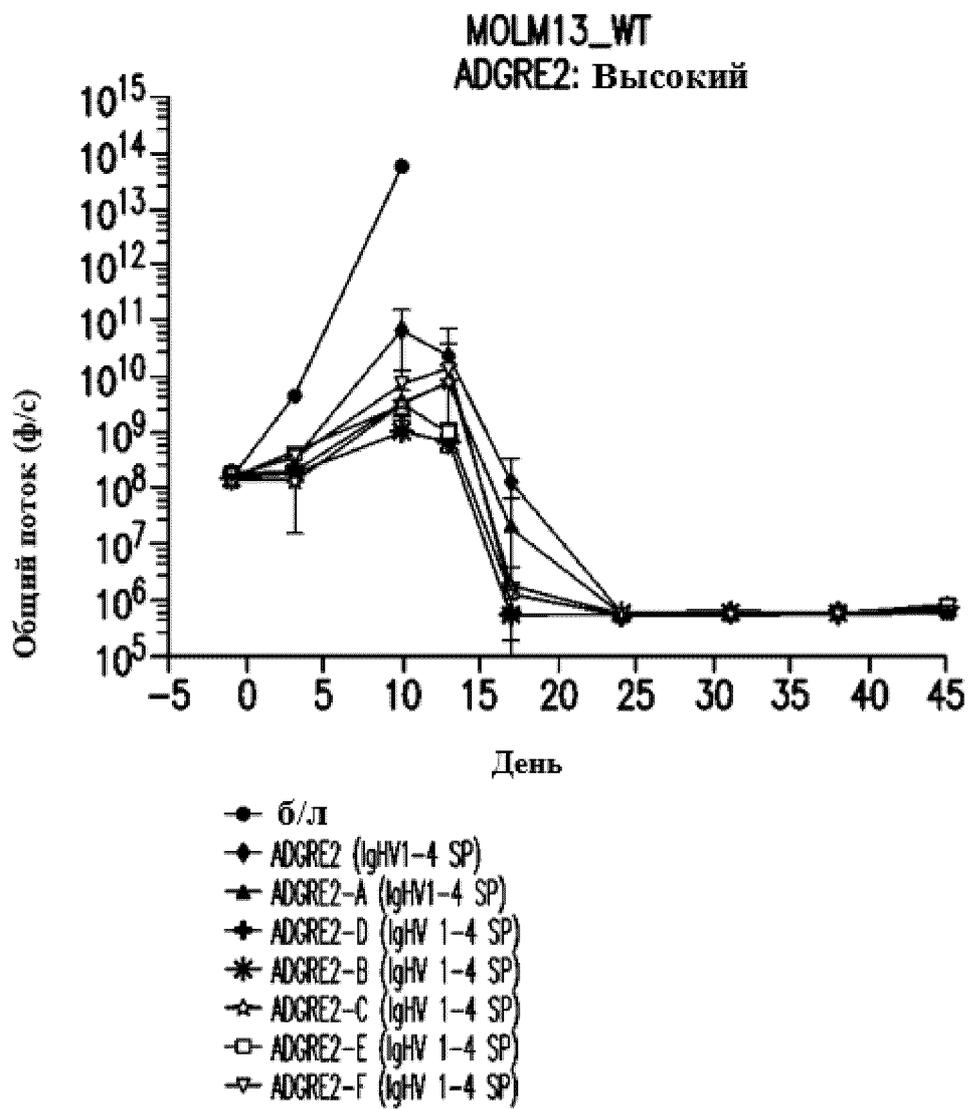
MOLM13_ADGRE2-9D6

ADGRE2: Очень низкий

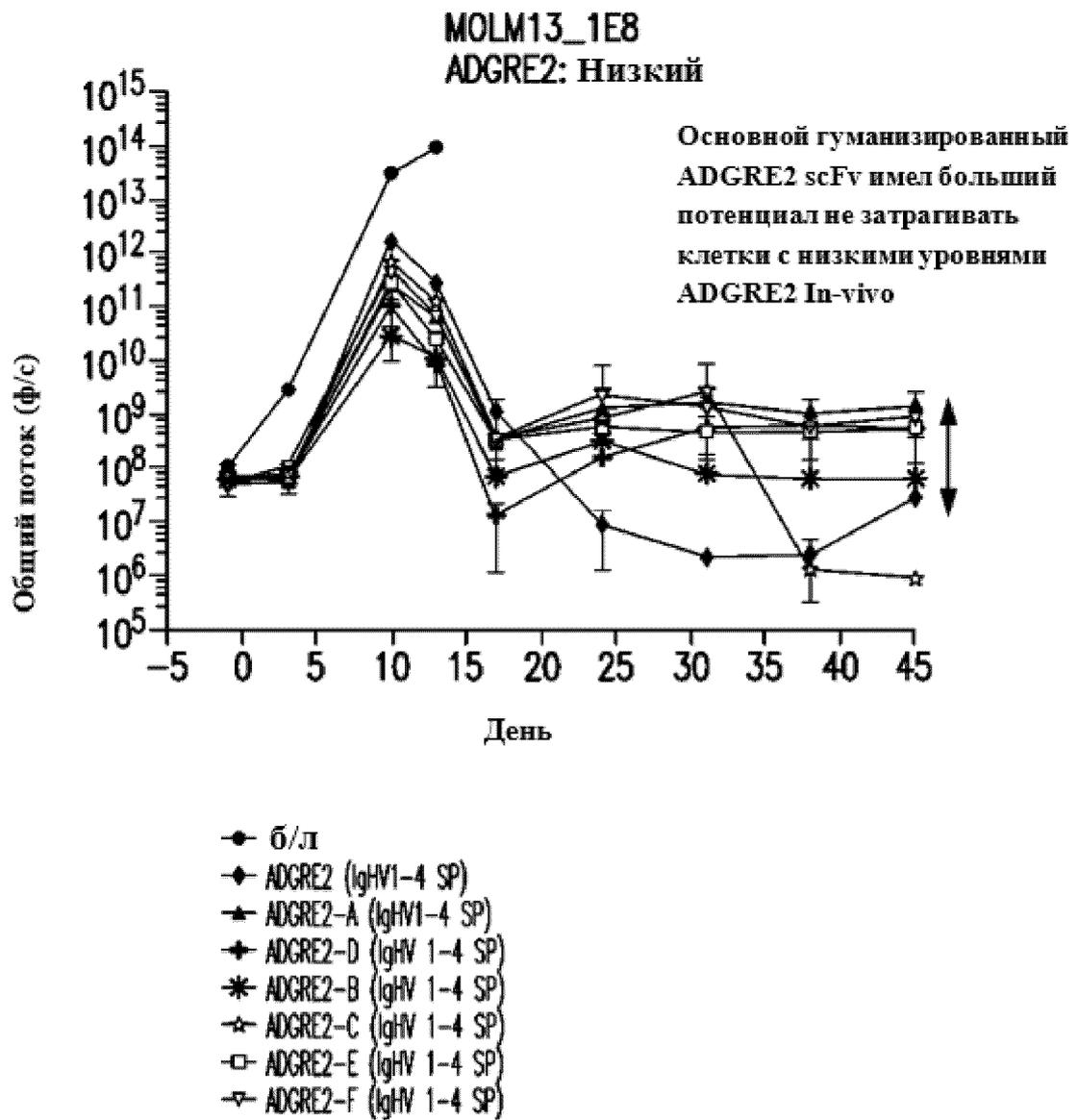


- ◆ б/л
- ★ ADGRE2 (CD8α SP)
- ◆ ADGRE2 (IgHV1-4 SP)
- ADGRE2-A (CD8α SP)
- ★ ADGRE2-A (IgHV1-4 SP)
- ▼ ADGRE2-D (CD8α SP)
- ◆ ADGRE2-D (IgHV 1-4 SP)
- ADGRE2-B (CD8α SP)
- * ADGRE2-B (IgHV 1-4 SP)
- ADGRE2-C (CD8α SP)
- ☆ ADGRE2-C (IgHV 1-4 SP)
- ◇ ADGRE2-E (CD8α SP)
- ADGRE2-E (IgHV 1-4 SP)
- △ ADGRE2-F (CD8α SP)
- ▽ ADGRE2-F (IgHV 1-4 SP)

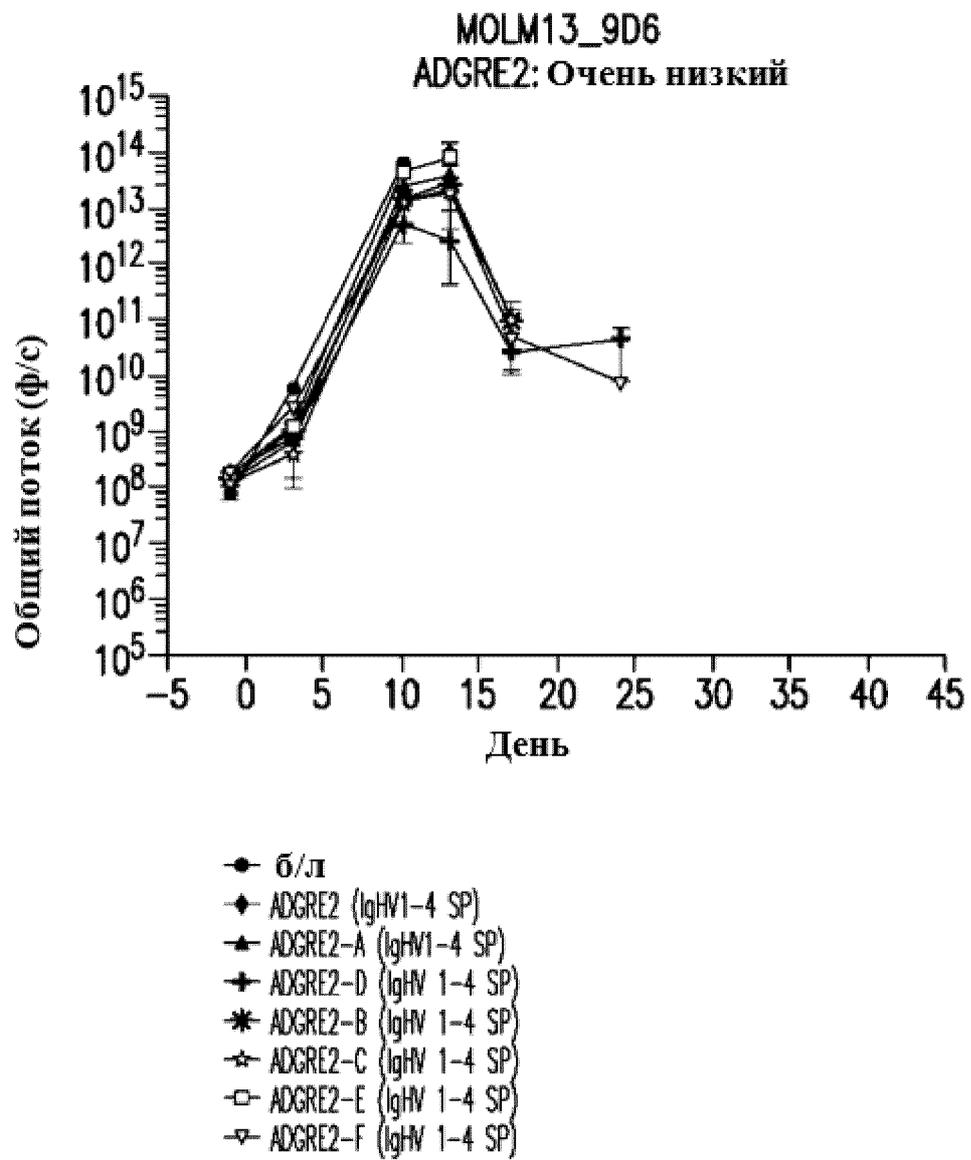
Фиг. 7С



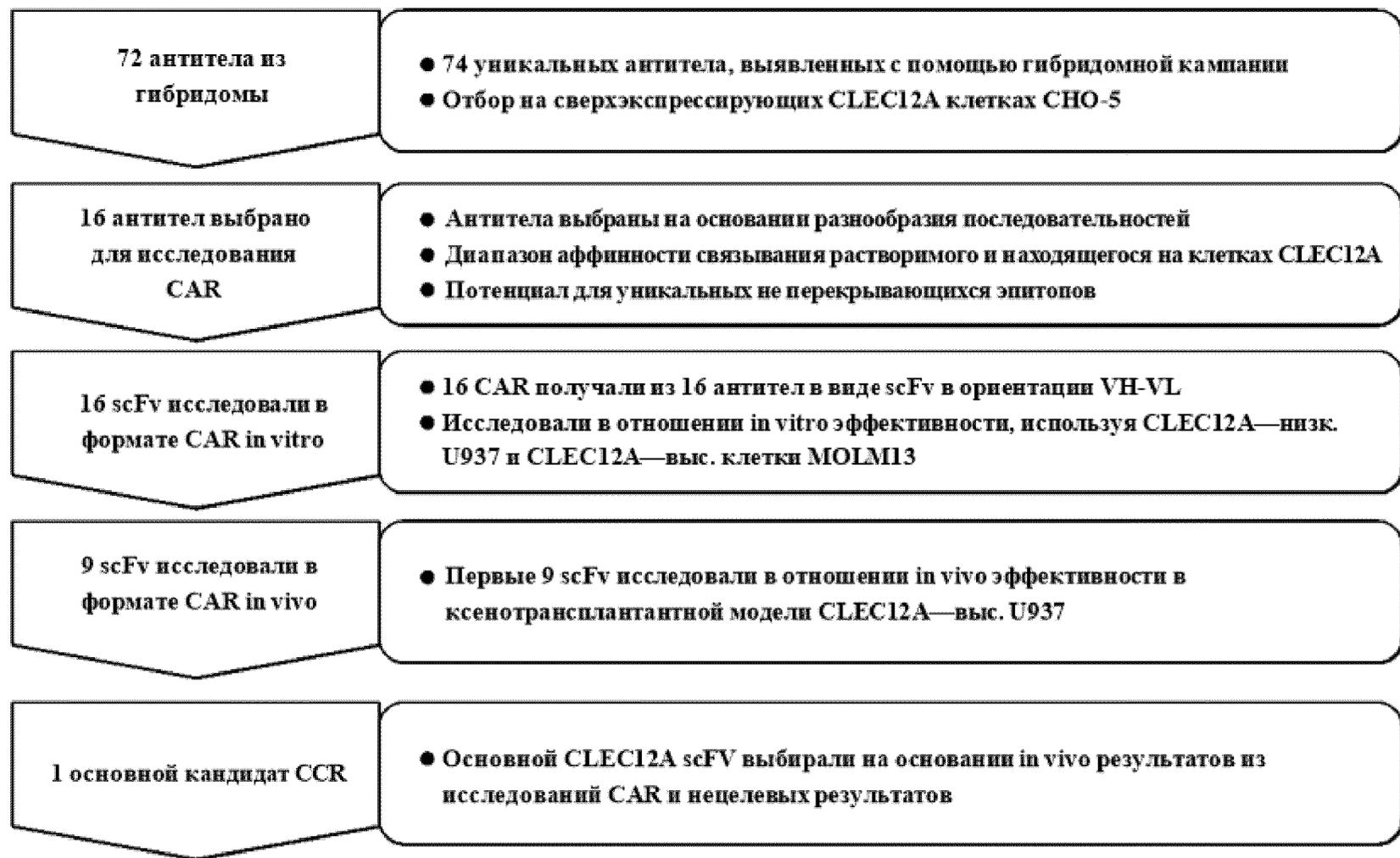
Фиг. 8



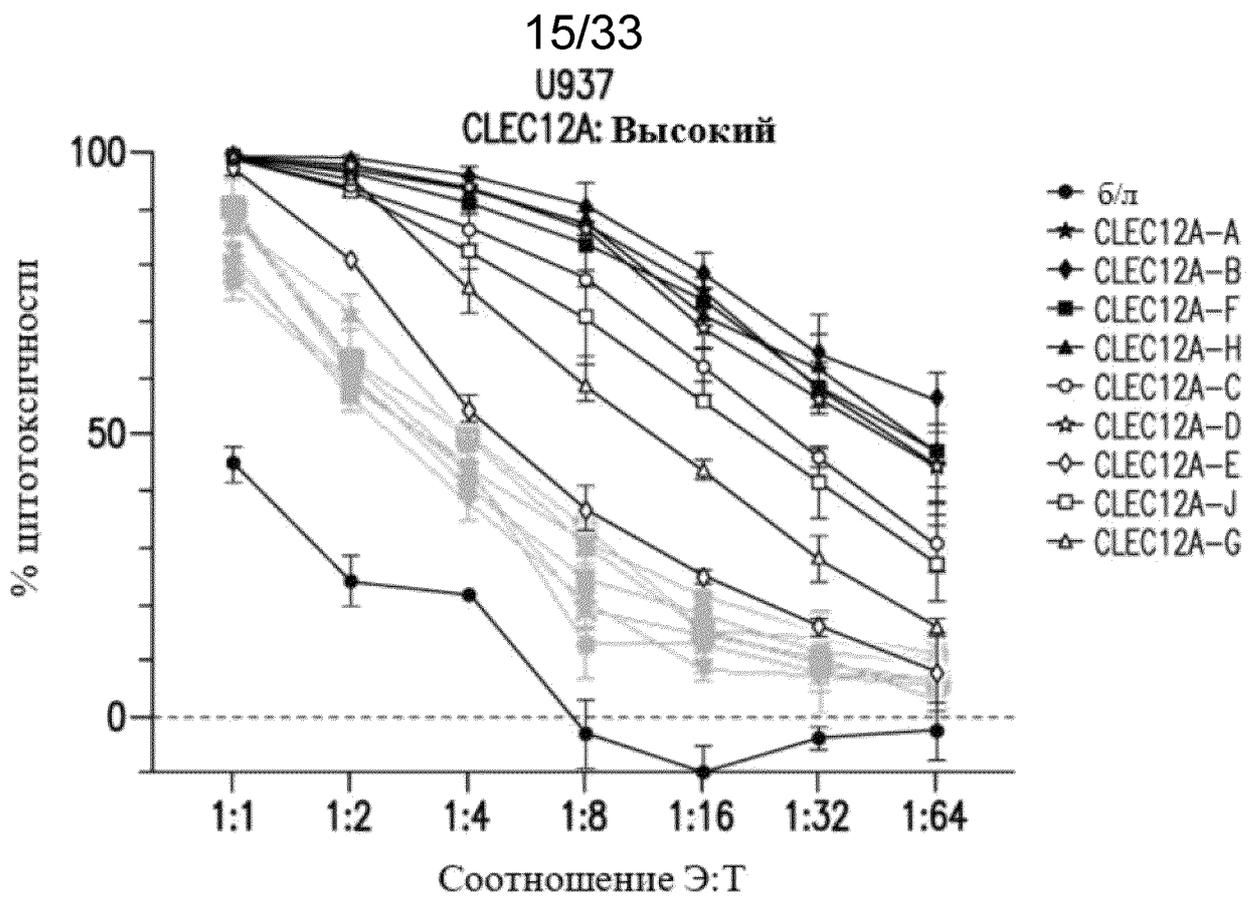
Фиг. 8, продолжение



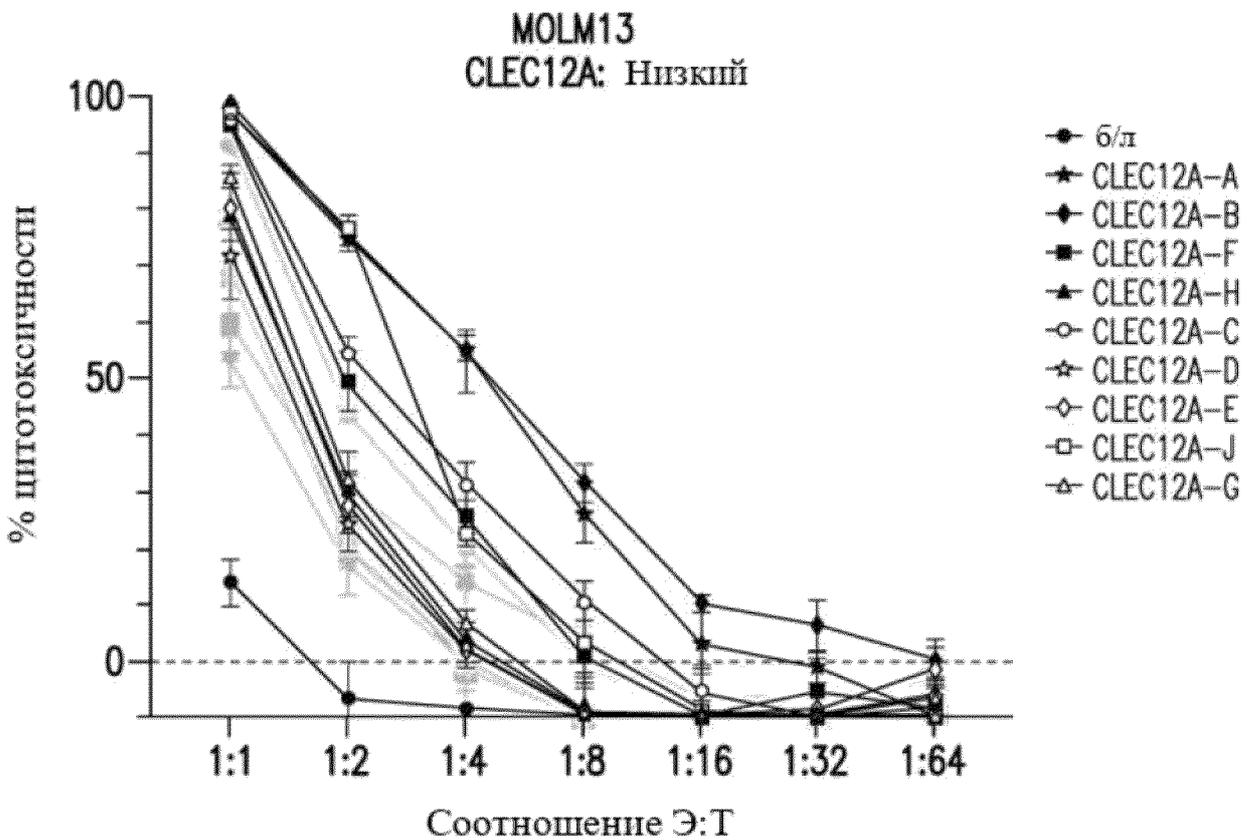
Фиг. 8, продолжение



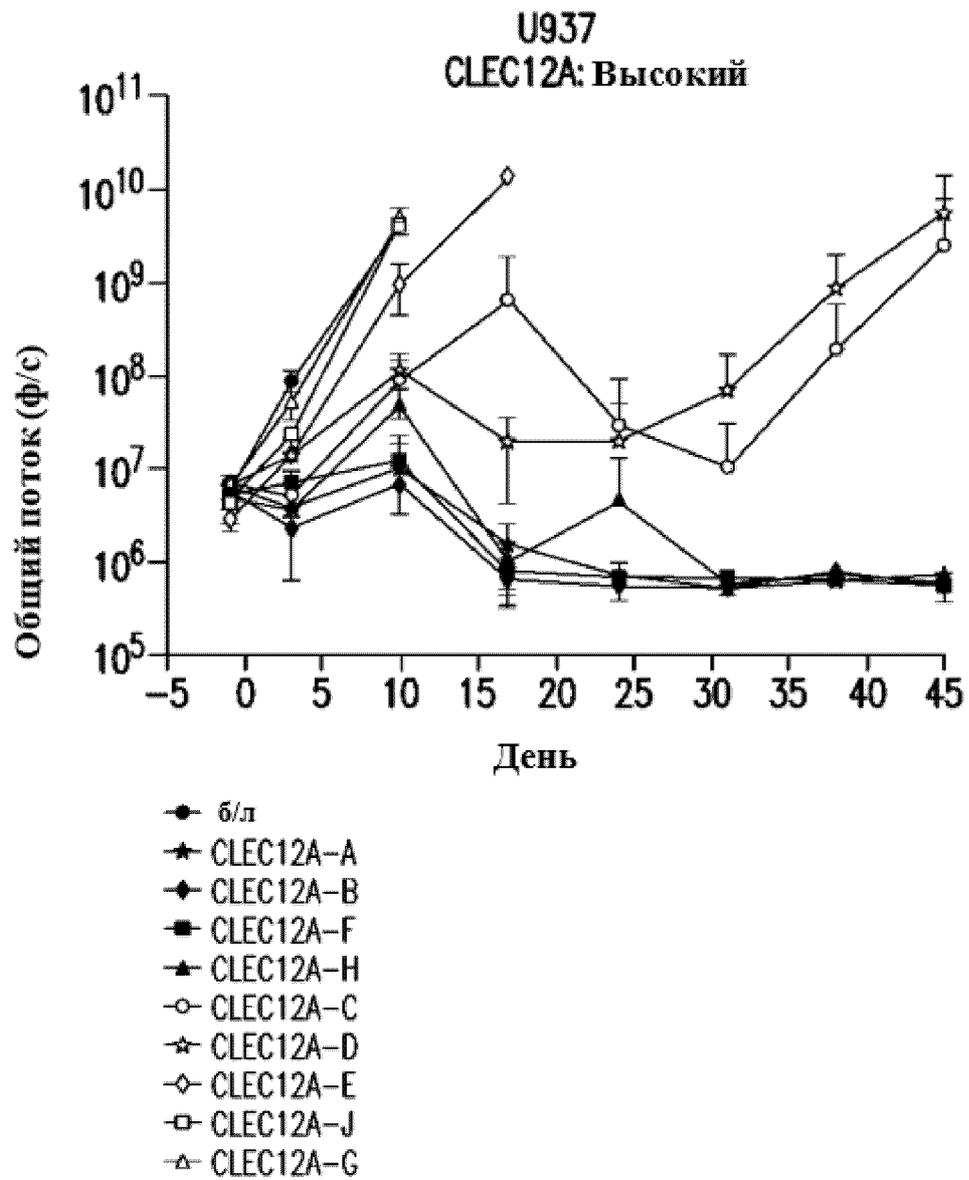
Фиг. 9



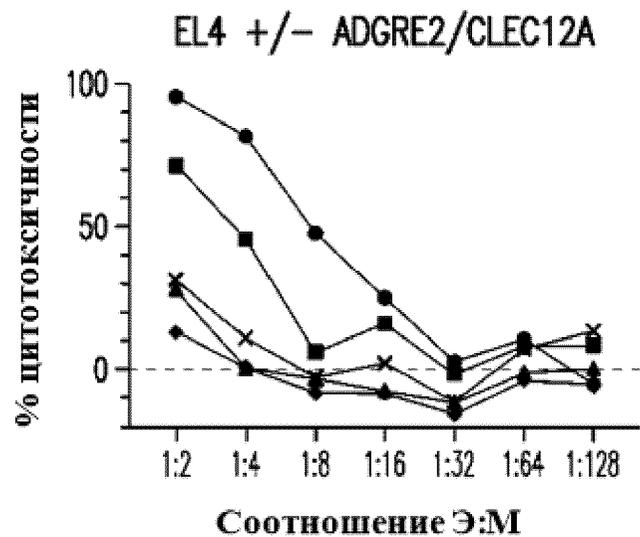
Фиг. 10А



Фиг. 10В

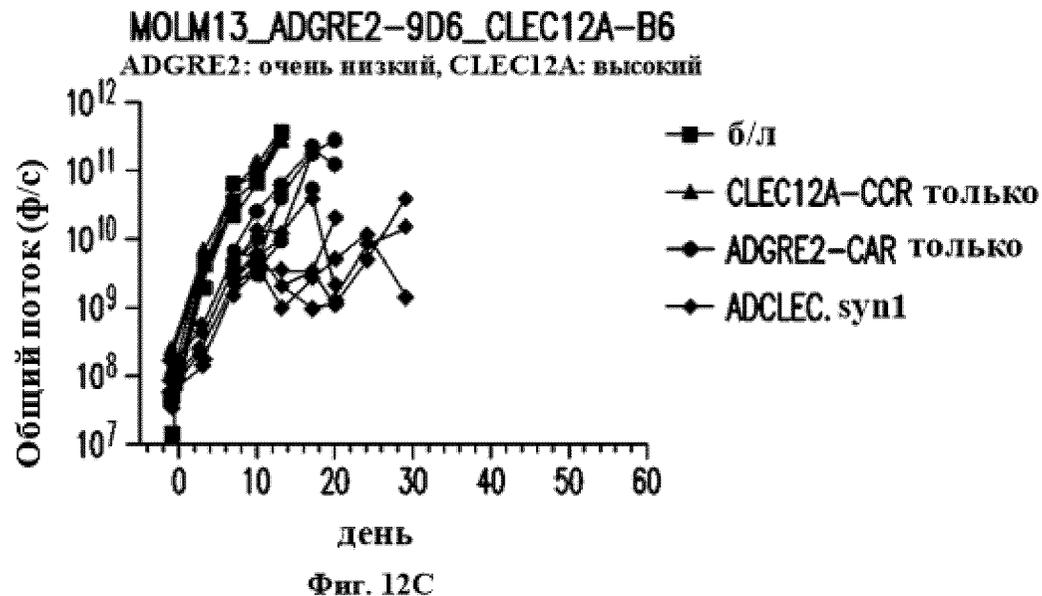
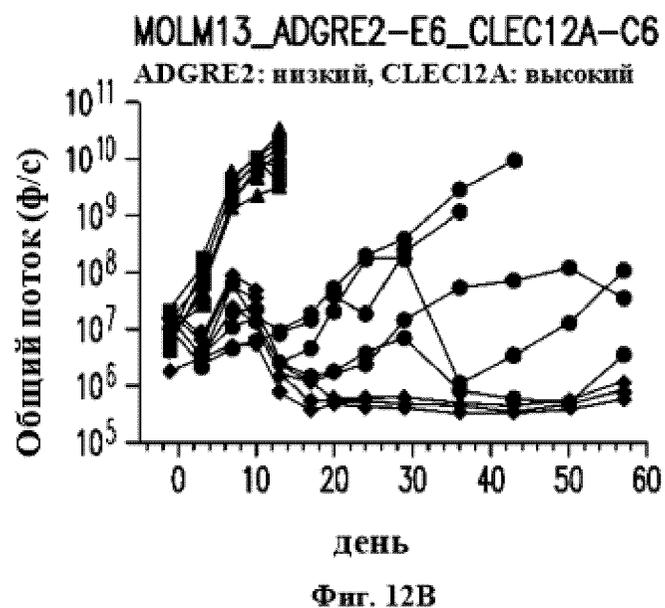


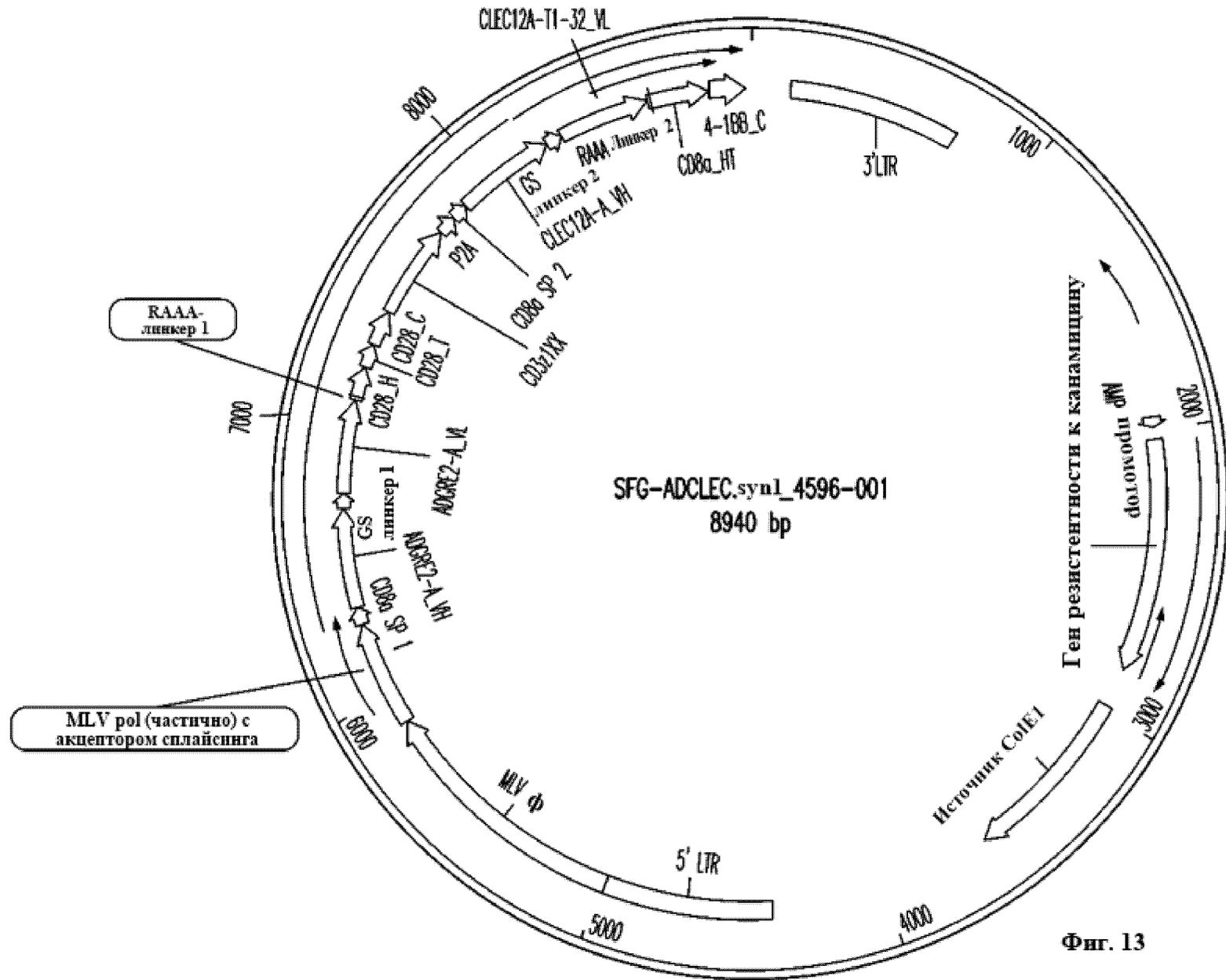
Фиг. 11



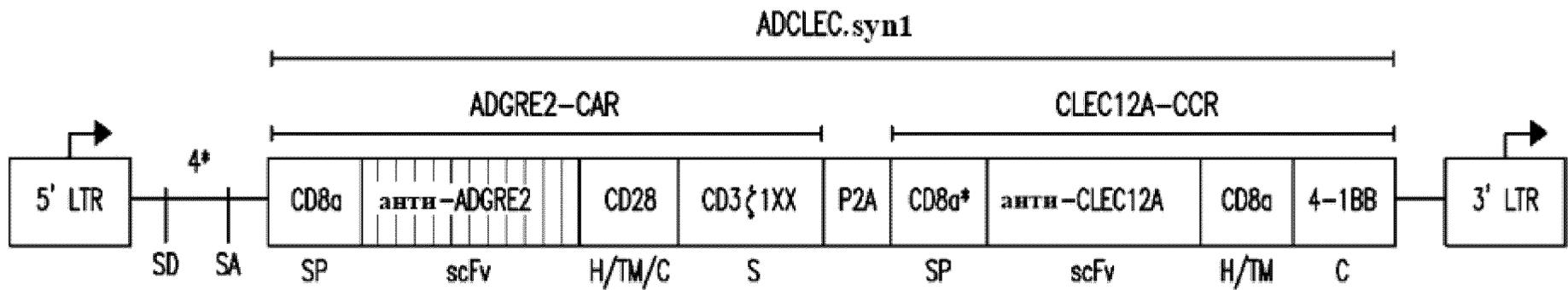
Фиг. 12А

Конструкция CAR	Линия клеток-мишеней	Сценарий
✕ ADCLEC.syn1	ADGRE2-/CLEC12A-	Без антигена-мишени
■ ADCLEC.syn1	ADGRE2+/CLEC12A-	Только антиген-мишень CAR
▲ ADCLEC.syn1	ADGRE2-/CLEC12A+	Только антиген-мишень CCR
● ADCLEC.syn1	ADGRE2+/CLEC12A+	Антигены-мишени CAR и CCR
◆ 1928z1XX	CD19-	Без антигена-мишени





Фиг. 13



Фиг. 14

План производства CAR T-клеток

Выбор CD4+ и CD8+ клеток из аутологичного продукта афереза пациента

Сбор афереза

Выбор CD4+ и CD8+ T-клеток с помощью гранул Miltenyi



Замораживание CD4+/CD8+ клеточного продукта в 10% ЧСА в плазмалите, смешанном с CS10 в соотношении 1:1 (объем:объем) и определение % CD3+ в замороженном клеточном продукте



Получение ADCLEC.syn1 CAR T-клеток

[День 0] Активация

Размораживание CD8+/CD4+ T-клеток при 37 °C
Промывка клеток 3 объемами 1% ЧСА в плазмалите путем центрифугирования при 300xg в течение 10 мин



Подсчет числа клеток промытых CD8+/CD4+ T-клеток



На основании % CD3+ клеток ресуспендирование от 100E6 до 300E6 CD3+ в полной среде
X—Vivo15 (X—Vivo15 + 5% человеческой сыворотки АВ + 1x глутамакс + 20 мМ
ГЭПЭС + 1 мМ пирувата натрия + 1x МЕМ раствора витаминов + 1,6 мг/мл N-ацетилцистеина) + 45 мг/мл гентамицина + 20 МЕ/мл IL7 + 100 МЕ/мл IL15

21/33



Активация Т-клеток с помощью Dynabeads® ClinEx Vivo CD3/CD28 с использованием соотношения гранул и Т-клеток 1:1 в течение прибл. 48 ч в 37 °С инкубаторе с 5% CO₂



[День 2] Трансдукция

Трансдукция активированных Т-клеток маточными растворами вектора ADCLEC.syn1 в пакете PL72/PL240 с внешней упаковкой/герметизацией. Центрифугирование при 1200 об/мин в течение 60 мин при КТ при 0,5Е6 клеток/мл



[День 3]

Перенос трансдуцированных клеток в биореактор G-Rex и выращивание клеток в полной среде X-Vivo15 без гентамицина



[День 7 и День 10]

Добавление IL7 и IL15 в среду для поддержания 20 МЕ/мл IL7 + 100 МЕ/мл IL15



[День ≤14]

При достижении целевого числа клеток промывка клеток 1% ЧСА в 1х плазмалите А с использованием закрытой системы cell washer & debead с использованием магнита ClinExVivo



Фиг. 15, продолжение

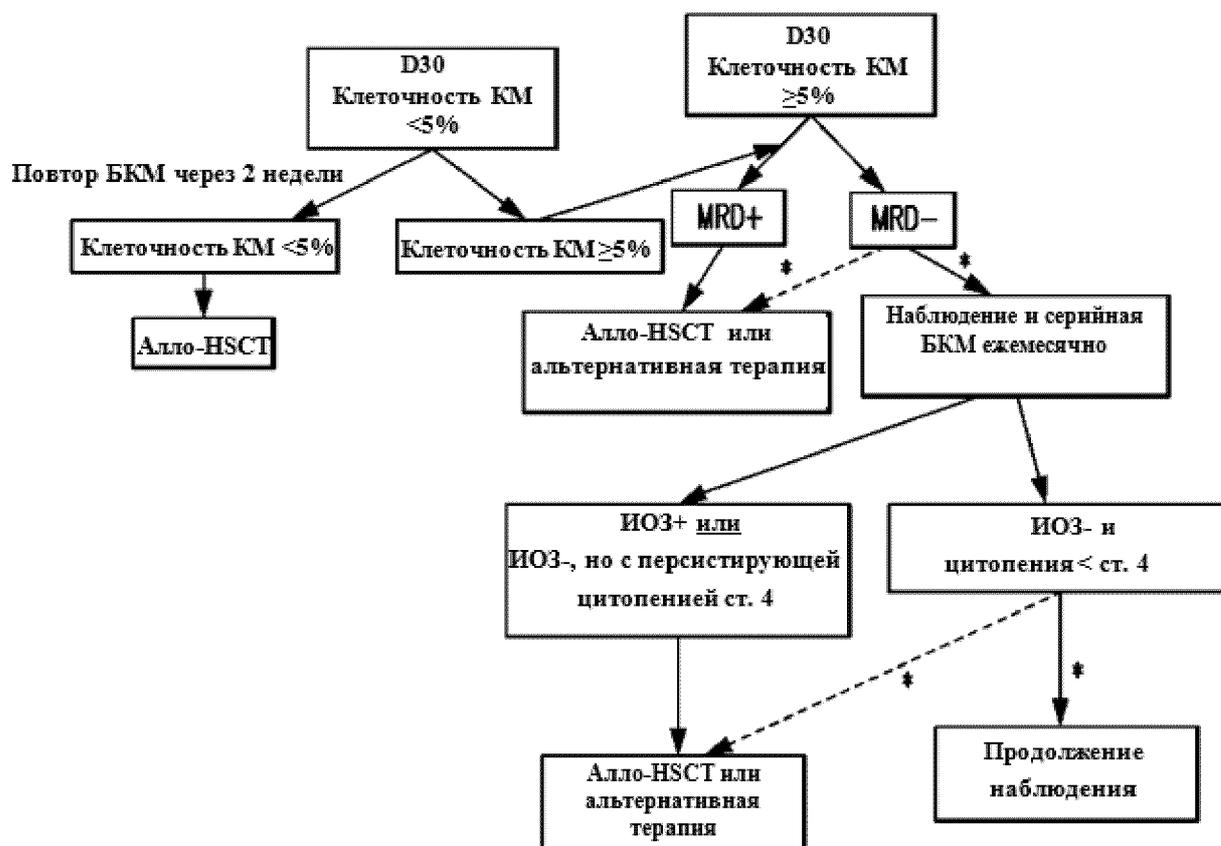
Замораживание и хранение конечного продукта

Составление конечного продукта в буфере для замораживания
Cryostor CS10 (50% CS10 + 5% ЧСА в плазмалите)



Хранение конечного продукта приблизительно в 1 мл – 130 мл в
флаконе CellSeal на 2 мл, флаконе Cell Seal на 5 мл, CryoStor 50,
пакетах CryoStor 250 или их эквивалентах в жидком азоте в фазе
испарения

Фиг. 15, продолжение



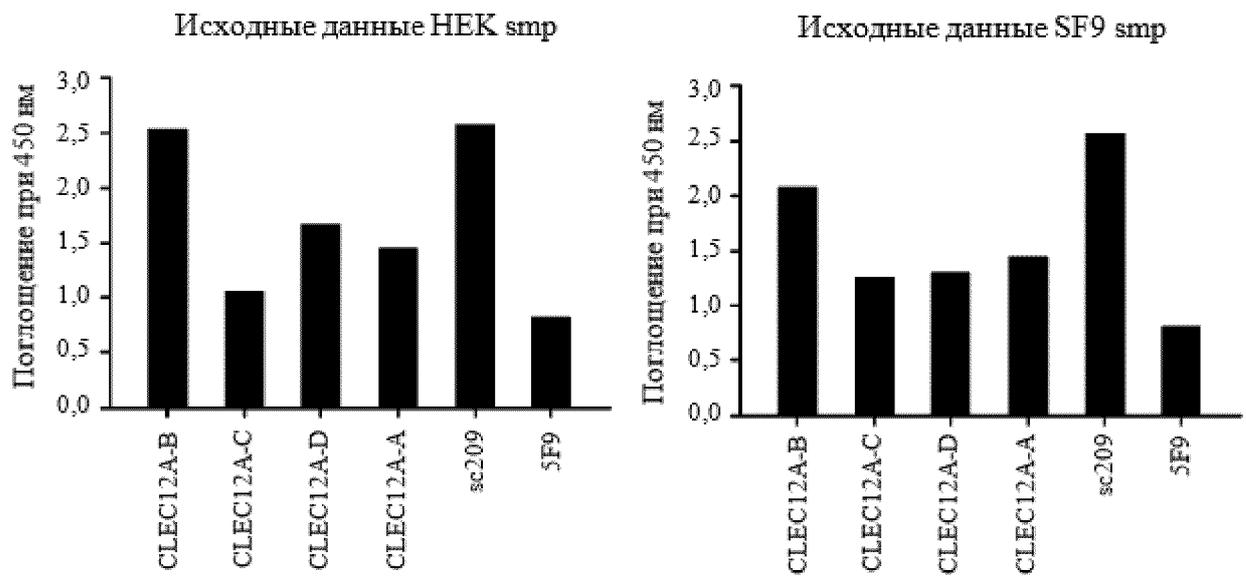
КМ: костный мозг
 БКМ: биопсия костного мозга
 ИОЗ: измеряемое остаточное заболевание по оценке методом проточной цитометрии или NGS
 Алло-НССТ: трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток

*Решение между наблюдением и Алло-НССТ принимает лечащий врач и после обсуждения с ГИ исследования на основании предыдущего лечения пациента, целей терапии и др.

Фиг. 16



Фиг. 17А



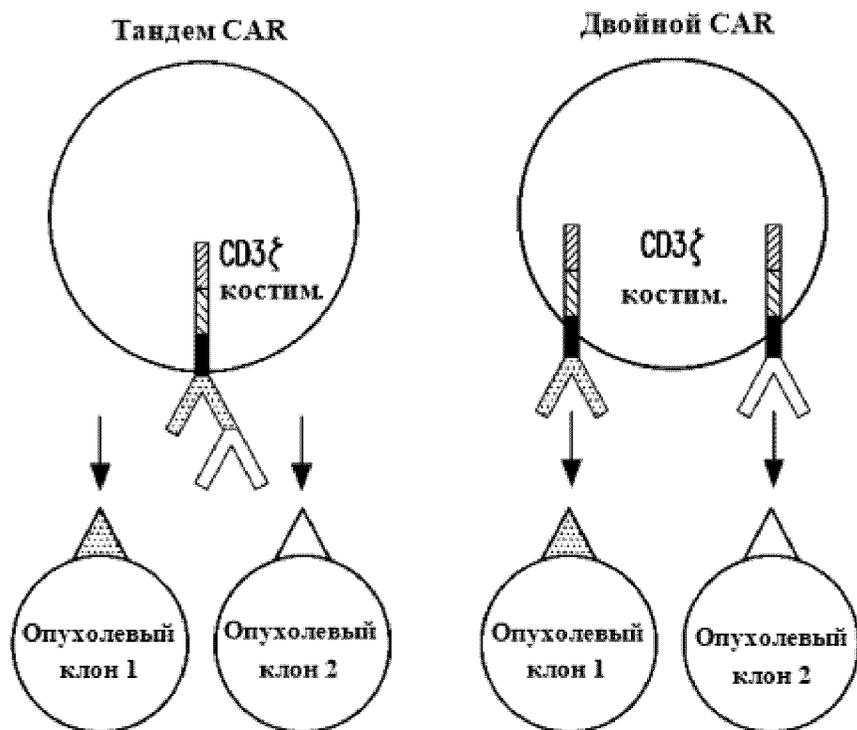
Фиг. 17В

ИЛИ-ГЕЙТ

«Необходим антиген А или В»

Преодолеывает гетерогенность мишени,

2-е покол. CAR + 2-е покол. CAR

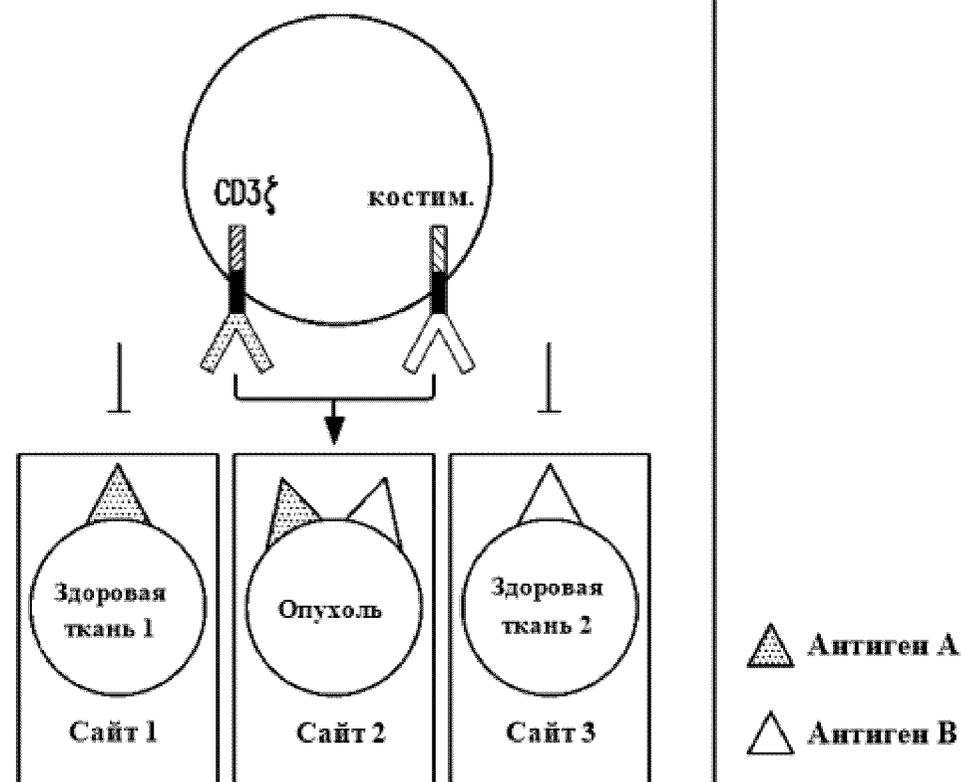


И-ГЕЙТ

«Необходим антиген А и В»

Повышает опухолевую

селективность, 1-е покол. CAR + CCR

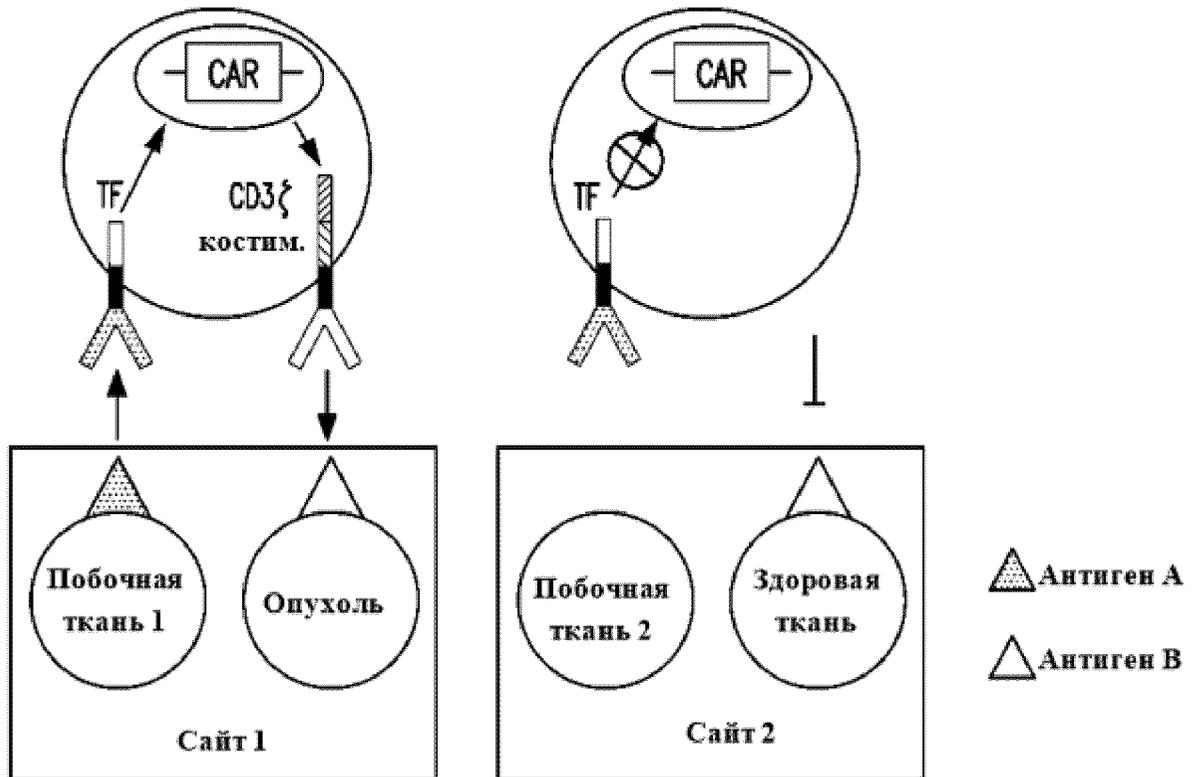


Фиг. 18А

ЕСЛИ-ТО-ГЕЙТ

«Необходим антиген А для индукции
CAR для антигена В»

Повышает опухолевую селективность,
рецептор суп-Notch + 2-е покол. CAR



Фиг. 18А, продолжение

27/33

ЕСЛИ-ЛУЧШЕ-ГЕЙТ

(в данном случае посредством платформы ADCLEC.syn

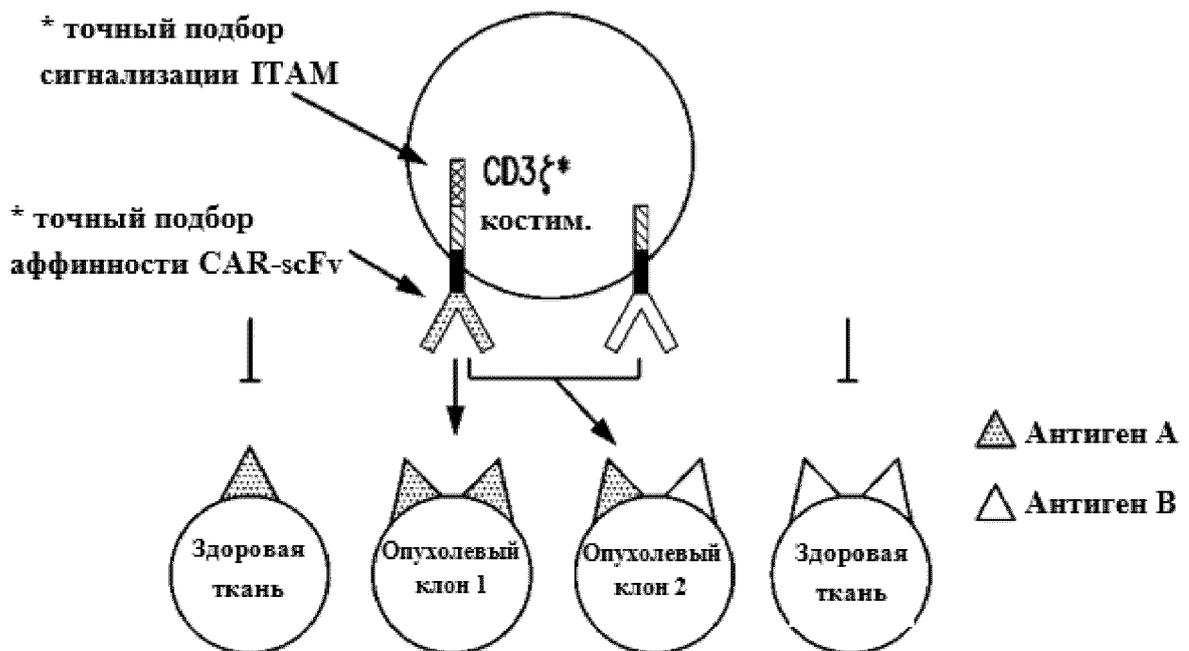
при ОМЛ)

«Необходим (1) только высокий уровень антигена А или

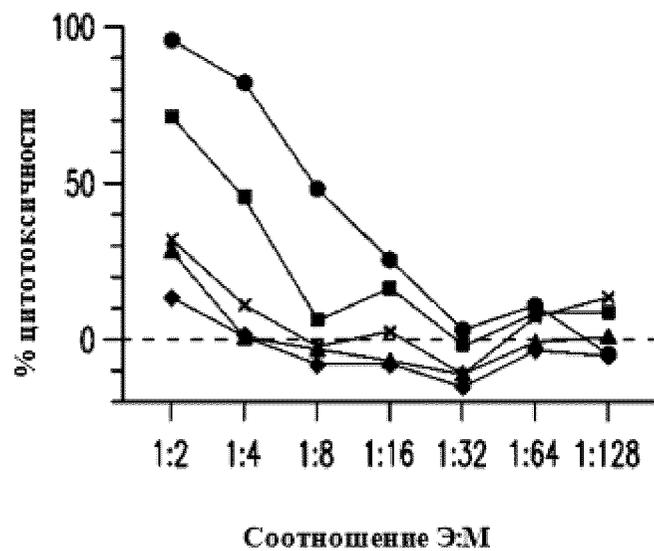
(2) низкий уровень антигена А и антигена В»

Предотвращает рецидив при низких уровнях антигена посредством усиления чувствительности за счет гейтинга

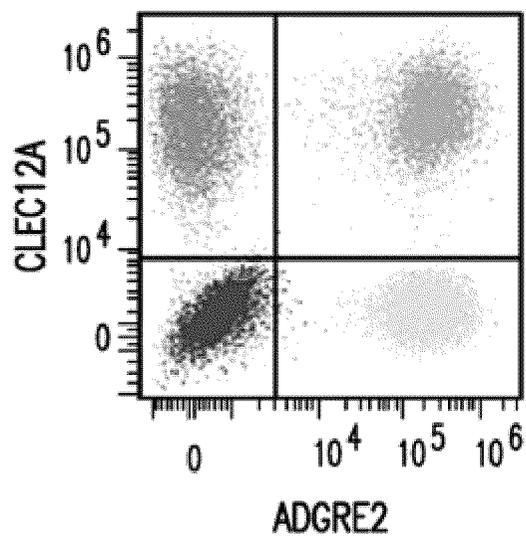
2-е покол. CAR (аффинность/CD3 ζ -точный подбор) + CCR



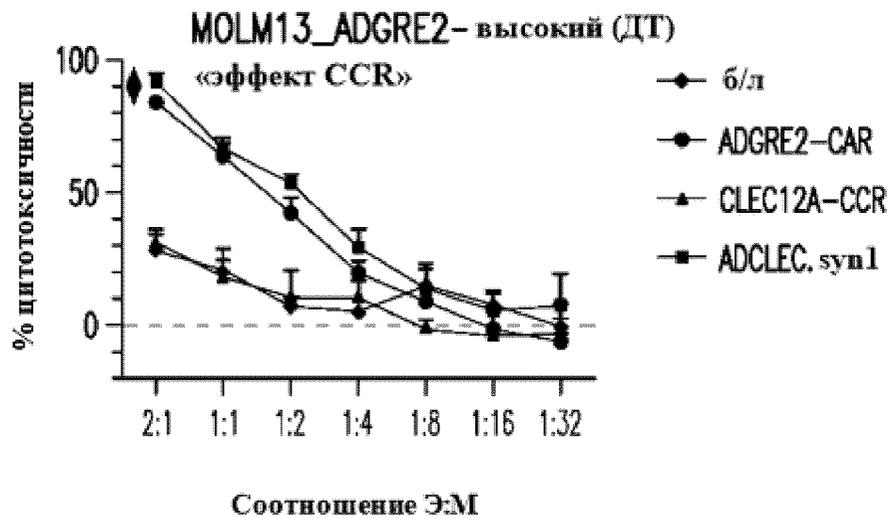
Фиг. 18В



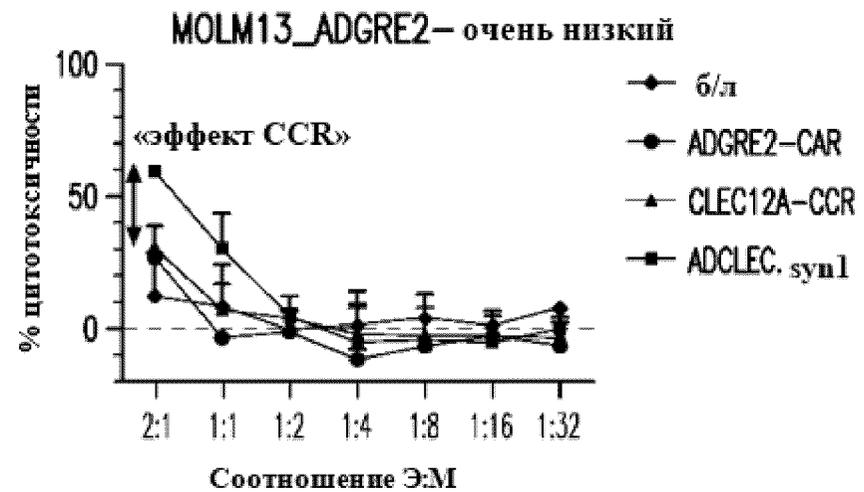
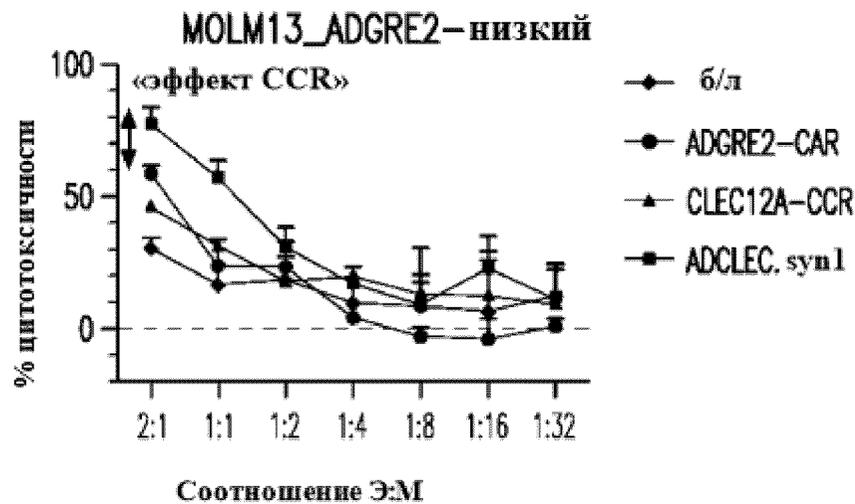
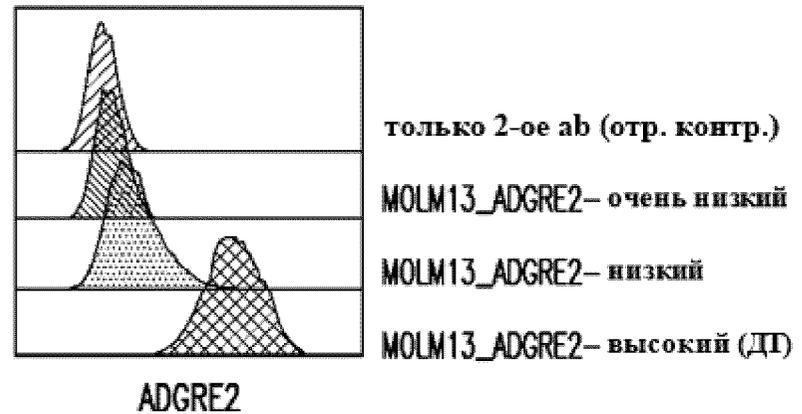
Конструкция CAR	Линия клеток-мишеней	Сценарий
ADCLEC.syn1	ADGRE2-/CLEC12A-	Без антигена-мишени
ADCLEC.syn1	ADGRE2+/CLEC12A-	Только антиген-мишень CAR
ADCLEC.syn1	ADGRE2-/CLEC12A+	Только антиген-мишень CCR
ADCLEC.syn1	ADGRE2+/CLEC12A+	Антигены-мишени CAR и CCR
1928z1XX	CD19-	Без антигена-мишени



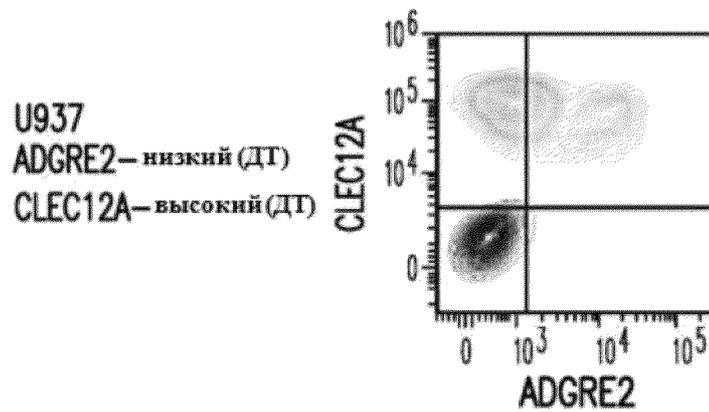
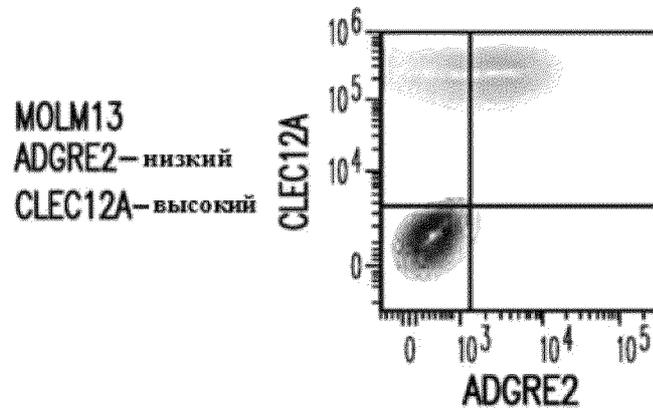
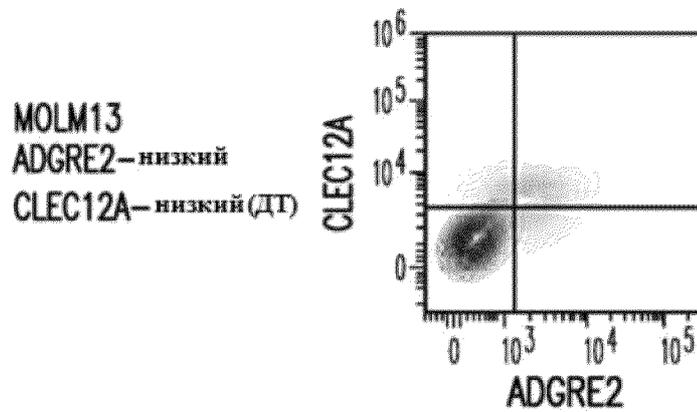
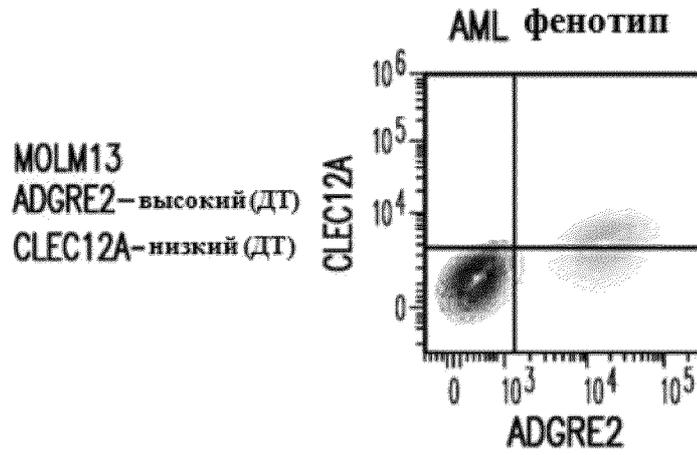
Фиг. 19А



Варианты линии клеток MOLM13 со сниженными уровнями ADGRE2 и эндогенно низким уровнем CLEC12A

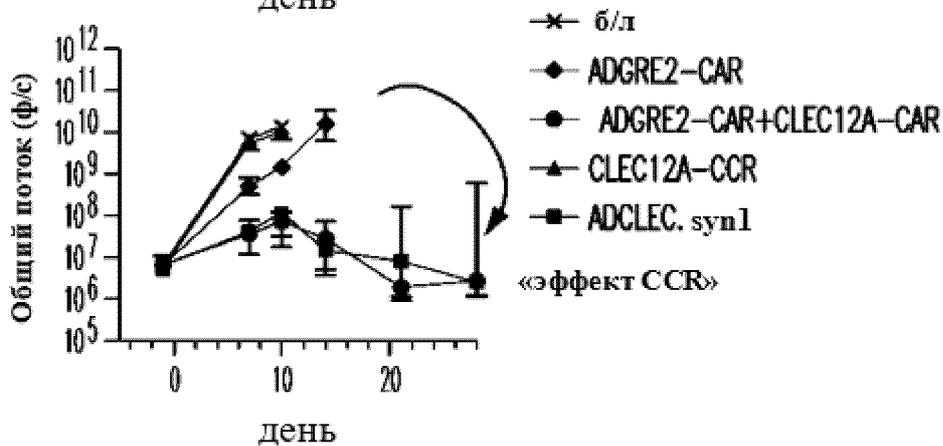
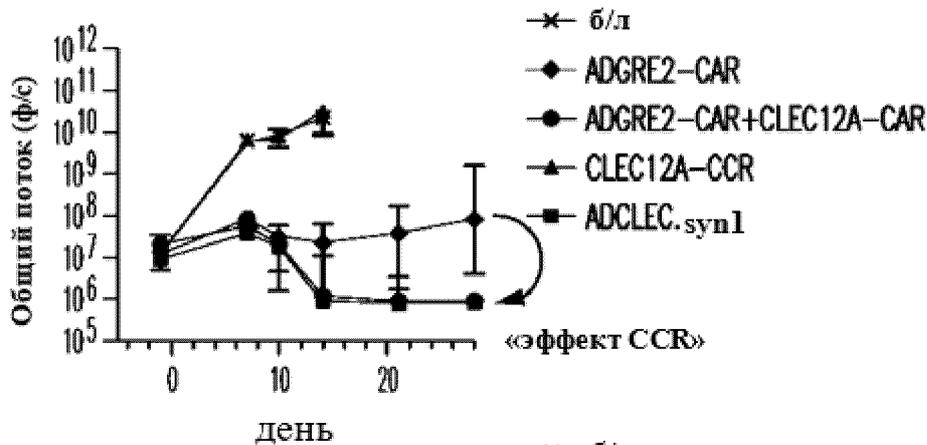
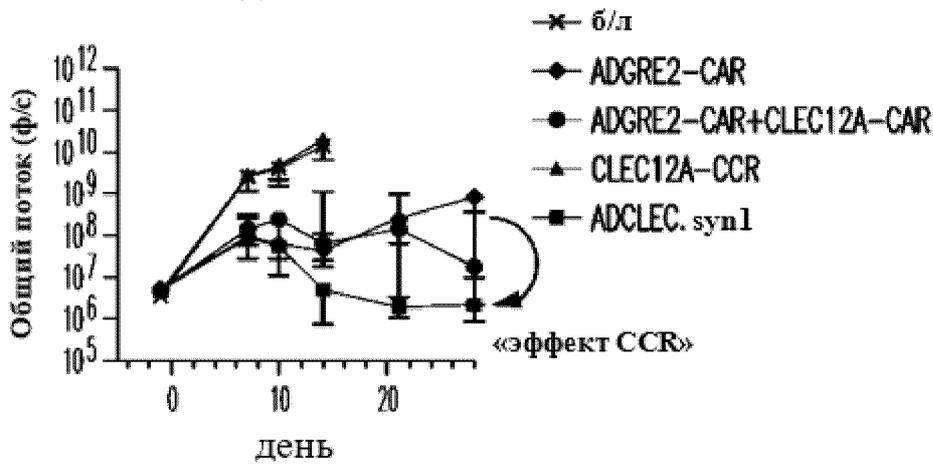
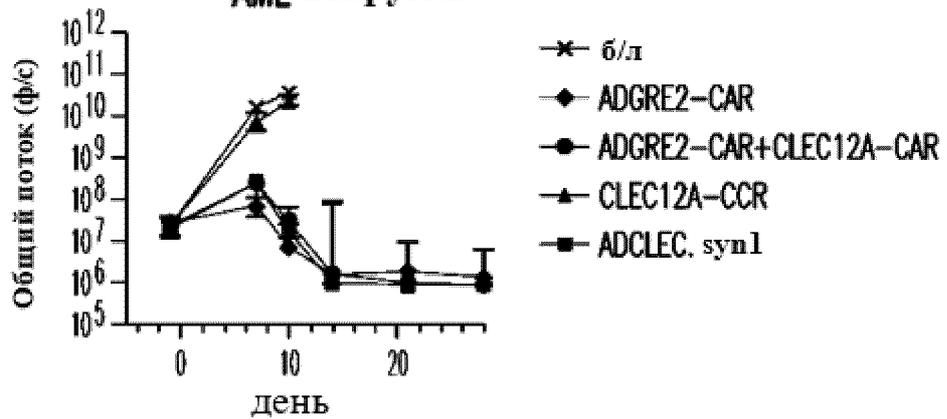


Фиг. 19В

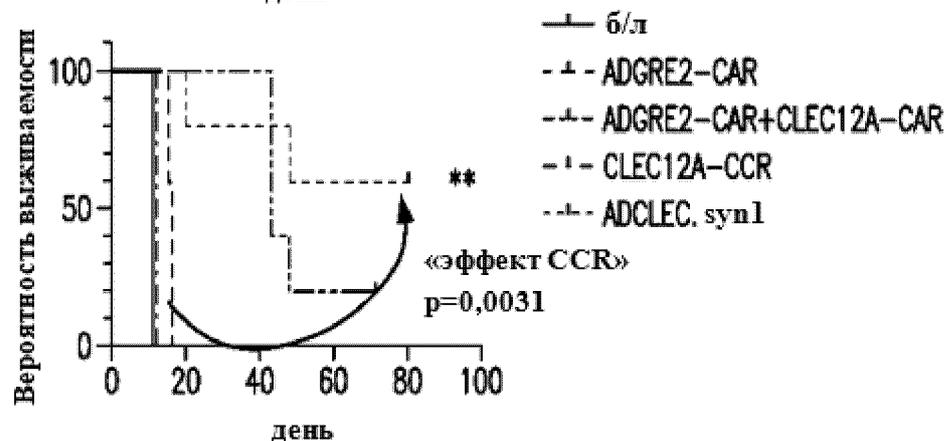
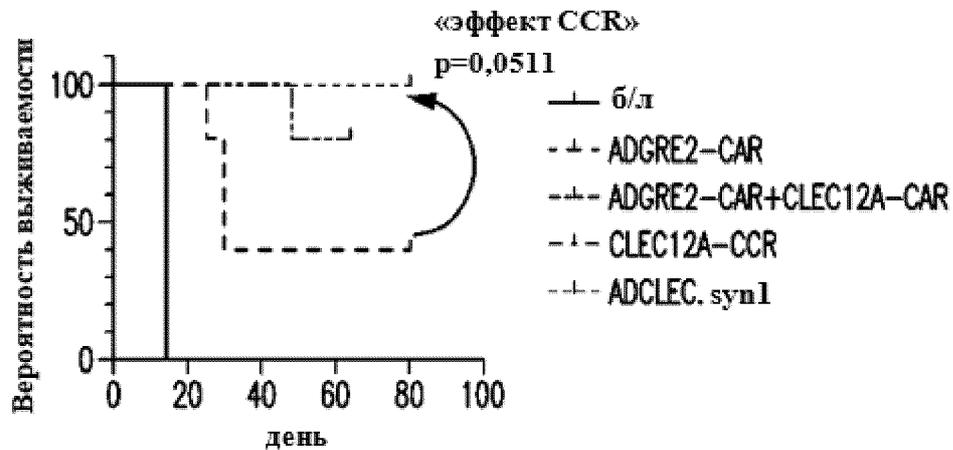
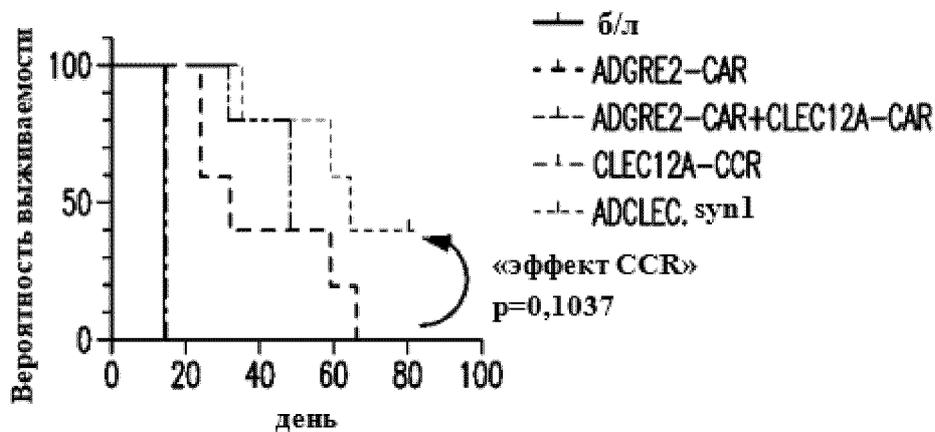
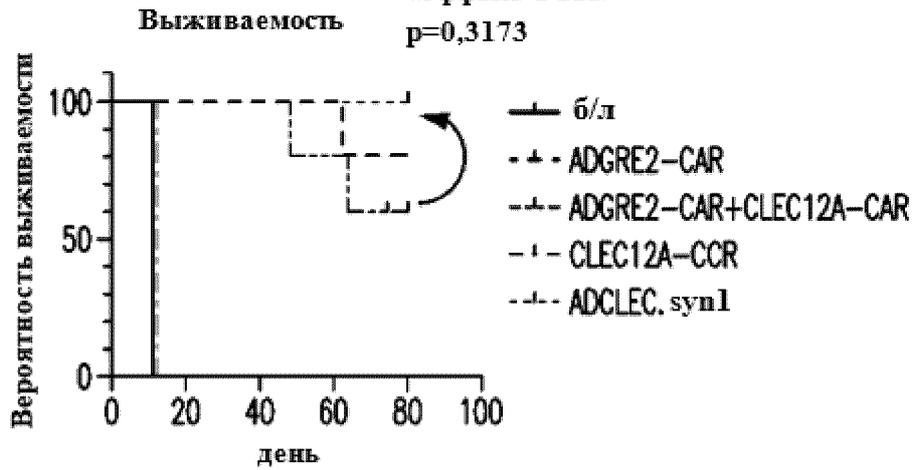


Фиг. 20

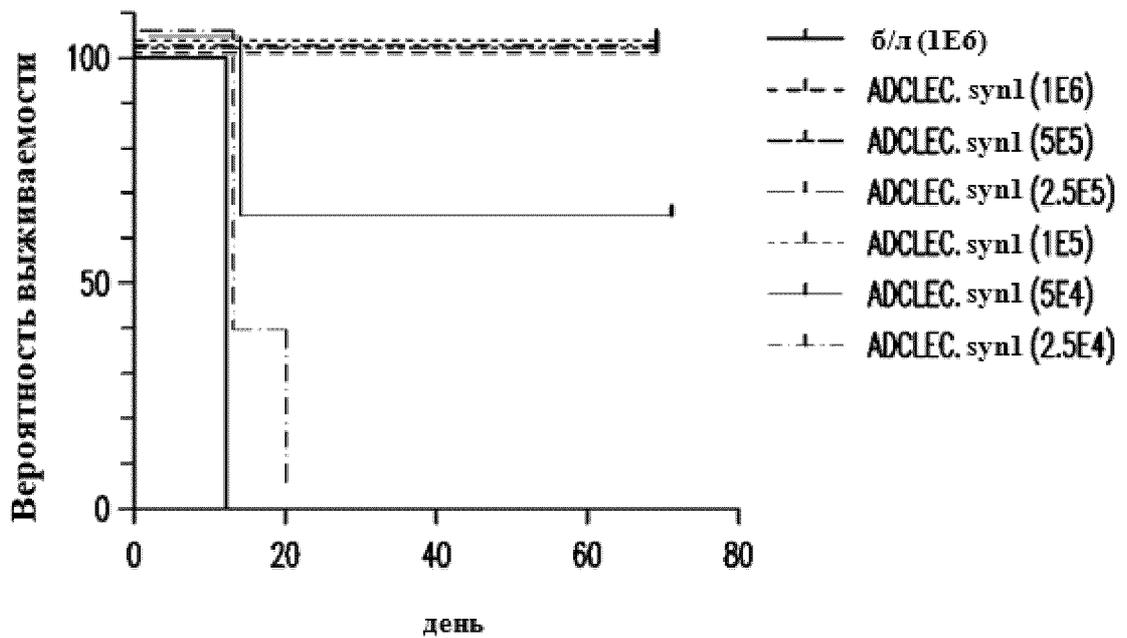
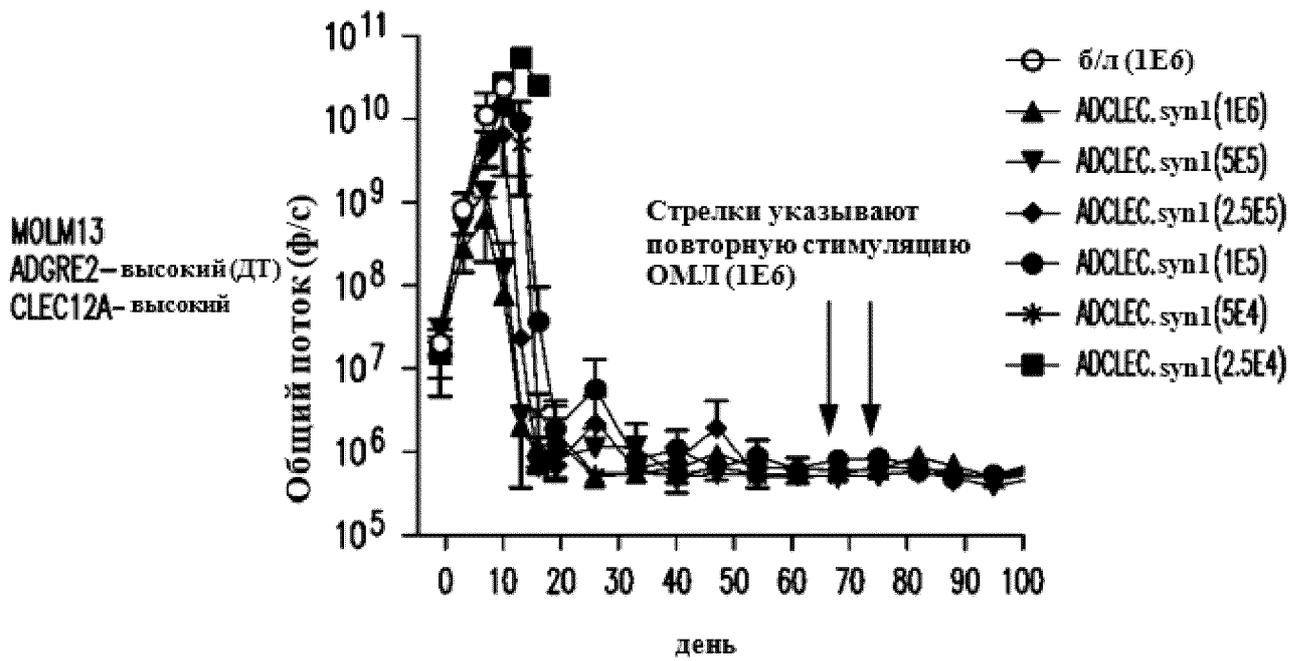
AML нагрузка



Фиг. 20, продолжение



Фиг. 20, продолжение



Фиг. 21