(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202290637 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.31

(22) Дата подачи заявки
2015.09.17

(51) Int. Cl. ***C07K 14/705*** (2006.01)
C07K 14/735 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(54) НАЦЕЛИВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ КЛЕТОК С ХИМЕРНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ ДЛЯ АДОПТИВНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

(31) **PCT/CN2014/086694; PCT/CN2014/090578**
(32) **2014.09.17; 2014.11.07**
(33) **CN**
(62) **201790624; 2015.09.17**

(71) Заявитель:
НОВАРТИС АГ (CH); ДЗЕ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ ПЕНСИЛЬВАНИЯ (US)

(72) Изобретатель:
Битти Грегори, Энгельс Борис, Идамаканти Нееараджа, Джун Карл Х., Лев Андреас, Майлон Майкл С. (US), Сун Хойцзюань (CN), Ван Эньсю, У Цилун (US)

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

(57) Изобретение относится к композициям и способам регуляции специфичности и активности эффекторных клеток иммунной системы для применения в иммунотерапии. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к типу химерного антигенного рецептора (CAR), где CAR называют "NKR-CAR", который представляет собой конструкцию CAR, содержащую компонент рецептора, встречающийся в природе на естественных киллерных (NK) клетках. В одном из вариантов осуществления NK-рецептор включает, но не ограничивается ими, природный активирующий и ингибирующий рецептор NK-клеток, известный как иммуноглобулиноподобный рецептор киллерной клетки (KIR).

202290637 A1

202290637 A1

НАЦЕЛИВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ КЛЕТОК С ХИМЕРНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ ДЛЯ АДОПТИВНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет заявки PCT № PCT/CN2014/086694, зарегистрированной 17 сентября 2014 года, и заявки PCT № PCT/CN2014/090578, зарегистрированной 7 ноября 2014 года. Полные содержания каждой из этих заявок включены в настоящее описание посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ, ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ ИЗОБРЕТЕНИЮ

С использованием технологий переноса генов Т-клетки можно генетически модифицировать для стабильной экспрессии связывающих доменов антитела на их поверхности, которые придают Т-клеткам специфичности, которые не зависят от ограничений, налагаемых главным комплексом гистосовместимости (MHC). Химерные антигенные рецепторы (CAR) представляют собой синтетические белки, экспрессируемые Т-клетками (CART-клетками), в которых антигенраспознающий фрагмент антитела (например, scFv или одноцепочечный фрагмент вариабельной области) является слитым с внутриклеточным доменом CD3-дзета-цепи. При взаимодействии с клеткой-мишенью, экспрессирующей когнатный scFv антиген, CAR, экспрессируемые Т-клетками, могут инициировать активацию Т-клеток, что приводит к цитолизу клетки-мишени (также обозначаемому как лизис клетки-мишени). При объединении с дополнительными костимулирующими сигналами, такими как внутриклеточный домен CD137 или CD28, эти рецепторы также могут приводить к пролиферации. Однако некоторая часть такой пролиферации, по-видимому, является антигеннезависимой, в отличие от ответов нормальных Т-клеточных рецепторов (TCR) (Milone et al., 2009, Mol. Ther., 17(8):1453-64). Искусственные рецепторы не воспроизводят полностью внутриклеточную передачу сигнала, возникающую в результате связывания природных TCR с антигенным пептидом в комплексе с молекулами MHC (Brocker, 2000, Blood, 96(5):1999-2001). Дефекты сигнального каскада могут ограничивать длительную выживаемость CART-клеток при адоптивном

переносе при отсутствии высоких уровней цитокинов, таких как IL-2 (Lo et al., 2010, Clin. Cancer Res., 16(10):2769-80). Они также характеризуют измененной регуляцией, что может являться благоприятным при некоторых применениях против злокачественной опухоли (Loskog et al., 2006, Leukemia, 20(10):1819-28), но такие дефекты регуляции также приводили к возможным проблемам контроля их "побочной" активности против нормальных тканей, которые также экспрессируют антиген, даже на очень низких уровнях. Такие "побочные" эффекты являются серьезным ограничением для терапевтических средств на основе CAR, и приводили к возможной гибели во время оценки ранней фазы I модифицированных CAR Т-клеток (Morgan et al., 2010, Mol. Ther., 18(4):843-51).

Таким образом, в данной области существует необходимость в альтернативных подходах конструкции CAR, которые преодолевают ограничения существующих в настоящее время терапевтических средств на основе CAR. Настоящее изобретение решает эту неудовлетворенную потребность в данной области.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте изобретение относится к очищенному или неприродному полипептиду рецептора иммунной функции естественных киллерных клеток химерного антигенного рецептора (NKR-CAR), содержащего один, два или все из внеклеточного антигенсвязывающего домена, трансмембранного домена, например, трансмембранного домена NKR и цитоплазматического домена, например, цитоплазматического домена NKR. В одном из вариантов осуществления полипептид NKR-CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен и один или оба из: трансмембранного домена, например, трансмембранного домена NKR, или цитоплазматического домена, например, цитоплазматического домена NKR. В одном из вариантов осуществления указанный полипептид NKR-CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен; трансмембранный домен и цитоплазматический домен NKR. В одном из вариантов осуществления полипептид NKR-CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен NKR и цитоплазматический домен. В одном из вариантов осуществления

полипептид NKR-CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен NKR и цитоплазматический домен.

В одном из вариантов осуществления указанный полипептид NKR-CAR содержит KIR-CAR, например, actKIR-CAR или inhKIR-CAR, NCR-CAR, например, actNCR-CAR, SLAMF-CAR, например, inhSLAMF-CAR, FcR-CAR, например, CD16-CAR, например, actCD16-CAR, или CD64-CAR, например, actCD64-CAR, или Ly49-CAR, например, actLy49-CAR или inhLy49-CAR.

В одном из вариантов осуществления полипептид NKR-CAR содержит иммуноглобулиноподобный рецептор клетки-киллера-химерный антигенный рецептор (KIR-CAR), где KIR-CAR содержит один или оба из трансмембранного домена из KIR (трансмембранный домен KIR) или цитоплазматического домена, содержащего функциональный сигнальный домен из KIR (цитоплазматический домен KIR). В одном из вариантов осуществления KIR трансмембранный домен содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из: KIR2DS2, KIR2DL3, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DS1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DP1 и KIR3DP1. В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен KIR содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, состоящей из: KIR2DS2, KIR2DL3, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DS1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DP1 и KIR3DP1. В одном из вариантов осуществления KIR-CAR дополнительно содержит один или более из домена D0 KIR, домена D1 KIR и/или домена D2 KIR.

В одном из вариантов осуществления полипептид NKR-CAR содержит рецептор естественной цитотоксичности-химерный антигенный рецептор (NCR-CAR), где NCR-CAR содержит один или оба из трансмембранного домена из NCR (трансмембранный домен NCR) или цитоплазматического домена, содержащего функциональный сигнальный домен из NCR (цитоплазматический домен NCR). В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен NCR содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из: NKp46, NKp30 и NKp44. В одном из вариантов осуществления, где цитоплазматический домен NCR содержит функциональный сигнальный

домен белка, выбранного из группы, состоящей из: NKp46, NKp30 и NKp44.

В одном из вариантов осуществления полипептид NKR-CAR содержит химерный антигенный рецептор семейства активирующих лимфоциты сигнальных молекул (SLAMF-CAR), где SLAMF-CAR содержит один или оба из трансмембранного домена из SLAMF (трансмембранный домен SLAMF) или цитоплазматический домен, содержащий функциональный сигнальный домен из SLAMF (цитоплазматический домен SLAMF). В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен SLAMF содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из: SLAM, CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME и CD2F-10. В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен SLAMF содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, состоящей из: SLAM, CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME и CD2F-10.

В одном из вариантов осуществления полипептид NKR-CAR содержит Fc-рецептор-химерный антигенный рецептор (FcR-CAR), где FcR-CAR содержит один или оба из трансмембранного домена из FcR, выбранного из CD16 или CD64, или цитоплазматический домен, содержащий функциональный сигнальный домен из FcR, выбранного из CD16 или CD64.

В одном из вариантов осуществления полипептид NKR-CAR содержит рецептор химерный антигенный рецептор Ly49 (Ly49-CAR), где Ly49-CAR содержит один или оба из трансмембранного домена из Ly49 (трансмембранный домен Ly49) или цитоплазматический домен, содержащий функциональный сигнальный домен из Ly49 (цитоплазматический домен Ly49). В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен Ly49 содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из: Ly49A, Ly49C, Ly49H и Ly49D. В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен Ly49 содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, состоящей из: Ly49A, Ly49C, Ly49H и Ly49D.

В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен полипептида NKR-CAR представляет собой трансмембранный домен

NKR, где трансмембранный домен NKR содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL3, NKp46, KIR, NCR, SLAMF, FcR и Ly49. В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен содержит: i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 357, 358 или 359; ii) аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 5 модификаций, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 357, 358 или 359; или iii) аминокислотную последовательность с 95-99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 357, 358 или 359.

В одном из вариантов осуществления кодируемый трансмембранный домен полипептида NKR-CAR представляет собой трансмембранный домен, например, трансмембранный домен TCAR, как описано в настоящем описании, содержащий трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из TCR дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известного как "ICOS"), FcεRI, CD66d, DAP10, DAP12, альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, молекулы MHC I класса, рецепторного белка TNF, иммуноглобулиноподобного белка, цитокинового рецептора, интегрина, активирующего NK-клетки рецептора, BTLA, Toll-подобного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8 (CD8 альфа или CD8 бета), CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL2R бета, IL2R гамма, IL7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR,

LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганда, который специфически связывается с CD83 или любого их сочетания.

В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен полипептида NKR-CAR представляет собой цитоплазматический домен NKR, содержащий один или более функциональных сигнальных доменов белка, выбранного из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL3, NKp46, KIR, NCR, SLAMF, FcR и Ly49. В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен содержит: i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 360, 361 или 362; ii) аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 360, 361 или 362; или iii) аминокислотную последовательность с 95-99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 360, 361.

В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен полипептида NKR-CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен или адапторную молекулу, например, DAP12. В одном из вариантов осуществления кодируемый цитоплазматический домен полипептида NKR-CAR содержит адапторную молекулу, например, DAP12 или FcεRγ. В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен содержит: i) кодируемую адапторную молекулу, содержащую аминокислотную последовательность аминокислот 1-113 SEQ ID NO: 333 или аминокислот 1-86 SEQ ID NO: 335; ii) аминокислотную последовательность содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислот 1-113 SEQ ID NO: 333 или аминокислот 1-86 SEQ ID NO: 335; или iii) аминокислотную последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотами 1-113 SEQ ID NO: 333 или аминокислотами 1-86 SEQ ID NO: 335. В одном из вариантов осуществления NKR-CAR содержит антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, трансмембранный домен CD8 и цитоплазматический домен, содержащий DAP12.

В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен полипептида NKR-CAR представляет собой цитоплазматический домен, например, TCAR, как описано в настоящем описании, содержащий

один или более функциональных сигнальных доменов белка, выбранного из группы, состоящей из TCR дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известного как "ICOS"), FcεRI, CD66d, DAP10, DAP12, альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, молекулы MHC I класса, рецепторного белка TNF, иммуноглобулиноподобного белка, цитокинового рецептора, интегрина, активирующего NK-клетки рецептора, BTLA, Toll-подобного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8 (CD8 альфа или CD8 бета), CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 алфа, CD8 бета, IL2R бета, IL2R гамма, IL7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганда, который специфически связывается с CD83 или любого их сочетания.

В одном из вариантов осуществления полипептид NKR-CAR дополнительно содержит лидерную последовательность или сигнальную последовательность, например, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В одном из вариантов осуществления NKR-CAR содержит трансмембранный домен и внеклеточный антигенсвязывающий домен, и дополнительно содержит шарнирный домен, располагаемый между указанным трансмембранным доменом и указанным внеклеточным антигенсвязывающим доменом. В одном из вариантов осуществления шарнирный домен выбран из группы, состоящей из шарнира GS, шарнира CD8, шарнира IgG4, шарнира IgD, шарнира KIR2DS2, шарнира

KIR, шарнира NCR, шарнира SLAMF, шарнира CD16, шарнира CD64 и шарнира LY49. В одном из вариантов осуществления шарнирный домен содержит: i) аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 5, 2, 3 или 4; ii) аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 5 модификаций, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, 2, 3 или 4; или iii) аминокислотную последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5, 2, 3 или 4.

В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен и цитоплазматический домен совместно содержат: i) аминокислотную последовательность из аминокислот 413-487 SEQ ID NO: 333 или аминокислот 386-454 SEQ ID NO: 335 или SEQ ID NO: 371; ii) аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации но не более 30, 20 или 10 модификаций аминокислот 413-487 SEQ ID NO: 333 или аминокислот 386-454 SEQ ID NO: 335, или SEQ ID NO: 371; или iii) аминокислотную последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотами 413-487 SEQ ID NO: 333 или аминокислотами 386-454 SEQ ID NO: 335 или SEQ ID NO: 371.

В любом из указанных выше вариантов осуществления NKR-CAR представляет собой активирующий NKR-CAR, и внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, в таблице 4. В любом из указанных выше вариантов осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой не принадлежащий мыши антигенсвязывающий домен, который связывается с мезотелином. В одном из вариантов осуществления не принадлежащий мыши внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с мезотелином, содержит принадлежащий человеку или гуманизированный антигенсвязывающий домен, который связывается с мезотелином. В одном из вариантов осуществления принадлежащий человеку или гуманизированный антигенсвязывающий домен, который связывается с мезотелином, предоставлен в таблице 4.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен человека, который связывается с мезотелином, содержит:

определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (CDR3 HC) любой аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела человека против мезотелина, приведенной в таблице 4; и/или определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR1 LC), определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (CDR2 LC) и определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (CDR3 LC) любой аминокислотной последовательности легкой цепи антитела человека против мезотелина, приведенной в таблице 4. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен человека, который связывается с мезотелином, содержит: вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) аминокислотную последовательность любой вариабельной области тяжелой цепи антитела человека против мезотелина, приведенной в таблице 4; ii) аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 30, 20 или 10 модификаций аминокислотной последовательности любой вариабельной области тяжелой цепи антитела человека против мезотелина, приведенной в таблице 4; или iii) аминокислотную последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотной последовательностью любой вариабельной области тяжелой цепи антитела человека против мезотелина, приведенной в таблице 4; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) аминокислотную последовательность любой вариабельной области легкой цепи антитела человека против мезотелина, приведенной в таблице 4; ii) аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 30, 20 или 10 модификаций аминокислотной последовательности любой вариабельной области легкой цепи антитела человека против мезотелина, приведенной в таблице 4; или iii) аминокислотную последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотной последовательностью любой вариабельной области легкой цепи антитела человека против мезотелина, приведенной в таблице 4. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен человека который связывается с мезотелином, содержит: i)

аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 230-253; ii) аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 30, 20 или 10 модификаций любой из SEQ ID NO: 230-253; или iii) аминокислотную последовательность с 95-99% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 230-253. В таких вариантах осуществления NKR-CAR дополнительно содержит, например, трансмембранный и цитоплазматический домен совместно содержащий, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 371, аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 10 или 5 модификаций SEQ ID NO: 371, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95-99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 371.

В первом аспекте изобретение относится к очищенной или неприродной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид рецептора иммунной функции естественной киллерной клетки-химерный антигенный рецептор (NKR-CAR), описываемый в настоящем описании, например, содержащей один, два или все из внеклеточного антигенсвязывающего домена, трансмембранного домена, например, трансмембранного домена NKR, и цитоплазматического домена, например, цитоплазматического домена NKR. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая NKR-CAR, содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен и один или оба из трансмембранного домена, например, трансмембранного домена NKR, или цитоплазматический домен, например, цитоплазматический домен NKR. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая NKR-CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен; трансмембранный домен и цитоплазматический домен NKR. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая NKR-CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен NKR и цитоплазматический домен. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая NKR-CAR, содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен NKR и цитоплазматический домен.

В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует NKR-CAR, содержащий KIR-CAR, например, actKIR-CAR или inhKIR-CAR, NCR-CAR, например, actNCR-CAR, SLAMF-CAR, например, inhSLAMF-CAR, FcR-CAR, например, CD16-CAR, например, actCD16-CAR, или CD64-CAR, например, actCD64-CAR, или Ly49-CAR, например, actLy49-CAR или inhLy49-CAR.

В одном из вариантов осуществления кодируемый KIR-CAR содержит один или оба из трансмембранного домена из KIR (трансмембранный домен KIR) или цитоплазматического домена, содержащего функциональный сигнальный домен из KIR (цитоплазматический домен KIR). В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен KIR содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из: KIR2DS2, KIR2DL3, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DS1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DP1 и KIR3DP1. В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен KIR содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, состоящей из: KIR2DS2, KIR2DL3, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DS1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DP1 и KIR3DP1. В одном из вариантов осуществления KIR-CAR дополнительно содержит один или более из домена D0 KIR, домена D1 KIR и/или домена D2 KIR.

В одном из вариантов осуществления кодируемый NCR-CAR содержит один или оба из трансмембранного домена из NCR (трансмембранный домен NCR) или цитоплазматического домена, содержащего функциональный сигнальный домен из NCR (цитоплазматический домен NCR). В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен NCR содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из: NKp46, NKp30 и NKp44. В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен NCR содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, состоящей из: NKp46, NKp30 и NKp44.

В одном из вариантов осуществления кодируемый SLAMF-CAR содержит один или оба из трансмембранного домена из SLAMF (трансмембранный домен SLAMF) или цитоплазматического домена,

содержащего функциональный сигнальный домен из SLAMF (цитоплазматический домен SLAMF). В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен SLAMF содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из: SLAM, CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME и CD2F-10. В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен SLAMF содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, состоящей из: SLAM, CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME и CD2F-10.

В одном из вариантов осуществления кодируемый FcR-CAR содержит один или оба из трансмембранного домена из FcR, выбранного из CD16 или CD64, или цитоплазматического домена, содержащего функциональный сигнальный домен из FcR, выбранного из CD16 или CD64.

В одном из вариантов осуществления кодируемый Ly49-CAR содержит один или оба из трансмембранного домена из Ly49 (трансмембранный домен Ly49) или цитоплазматического домена, содержащего функциональный сигнальный домен из Ly49 (цитоплазматический домен Ly49). В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен Ly49 содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из: Ly49A, Ly49C, Ly49H и Ly49D. В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен Ly49 содержит функциональный сигнальный домен белка, выбранного из группы, состоящей из: Ly49A, Ly49C, Ly49H и Ly49D.

В одном из вариантов осуществления кодируемый трансмембранный домен NKR-CAR представляет собой трансмембранный домен NKR, где трансмембранный домен NKR содержит трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL3, NKp46, KIR, NCR, SLAMF, FcR и Ly49. В одном из вариантов осуществления кодируемый трансмембранный домен NKR-CAR содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 357, 358 или 359; аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 5 модификаций, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 357, 358 или 359; или аминокислотную последовательность с 95-99%

идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 357, 358 или 359. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая NKR-CAR, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотиды 803-875 SEQ ID NO: 347, или последовательность нуклеиновой кислоты с 95-99% идентичностью последовательности с ней, которая кодирует трансмембранный домен.

В одном из вариантов осуществления кодируемый трансмембранный домен полипептида NKR-CAR представляет собой трансмембранный домен, например, TCAR, как описано в настоящем описании, содержащий трансмембранный домен белка, выбранного из группы, состоящей из TCR дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известного как "ICOS"), FcεRI, CD66d, DAP10, DAP12, альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, молекулы MHC I класса, рецепторного белка TNF, иммуноглобулиноподобного белка, цитокинового рецептора, интегрина, активирующего NK-клетки рецептора, BTLA, Toll-подобного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8 (CD8 альфа или CD8 бета), CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL2R бета, IL2R гамма, IL7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганда, который специфически связывается с CD83 или любого их сочетания.

В одном из вариантов осуществления кодируемый цитоплазматический домен NKR-CAR представляет собой

цитоплазматический домен NKR, где цитоплазматический домен NKR содержит один или более функциональных сигнальных доменов белка, выбранного из группы, состоящей из KIR2DS2, KIR2DL3, NKp46, KIR, NCR, SLAMF, FcR и Ly49. В одном из вариантов осуществления кодируемый цитоплазматический домен содержит: i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 360, 361 или 362; ii) аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 360, 361 или 362; или iii) аминокислотную последовательность с 95-99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 360, 361. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая NKR-CAR, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотиды 831-947 из SEQ ID NO: 343, нуклеотиды 833-1060 из SEQ ID NO: 345, или нуклеотиды 876-949 из SEQ ID NO: 347, или последовательность нуклеиновой кислоты с 95-99% идентичностью последовательности с ней, которая кодирует цитоплазматический домен.

В одном из вариантов осуществления кодируемый цитоплазматический домен полипептида NKR-CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен или адапторную молекулу, например, DAP12. В одном из вариантов осуществления кодируемый цитоплазматический домен полипептида NKR-CAR содержит адапторную молекулу, например, DAP12 или FcεRγ. В одном из вариантов осуществления кодируемый цитоплазматический домен содержит: i) кодируемую адапторную молекулу, содержащую аминокислотную последовательность аминокислот 1-113 SEQ ID NO: 333 или аминокислот 1-86 SEQ ID NO: 335; ii) аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислот 1-113 SEQ ID NO: 333 или аминокислот 1-86 SEQ ID NO: 335; или iii) аминокислотную последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотами 1-113 SEQ ID NO: 333 или аминокислотами 1-86 SEQ ID NO: 335. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая NKR-CAR, содержит

последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотиды, содержит нуклеотиды 1-339 SEQ ID NO: 332 или нуклеотиды 1-258 SEQ ID NO: 334, или последовательность нуклеиновой кислоты, обладающую 95-99% идентичностью с ней, которая кодирует адапторную молекулу. В одном из вариантов осуществления NKR-CAR содержит антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, трансмембранный домен CD8 и цитоплазматический домен, содержащий DAP12.

В одном из вариантов осуществления кодируемый цитоплазматический домен полипептида NKR-CAR представляет собой цитоплазматический домен, например, TCAR, как описано в настоящем описании, содержащий один или более функциональных сигнальных доменов белка, выбранного из группы, состоящей из TCR дзета, FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известного как "ICOS"), FcεRI, CD66d, DAP10, DAP12, альфа-, бета- или дзета-цепи T-клеточного рецептора, молекулы MHC I класса, рецепторного белка TNF, иммуноглобулиноподобного белка, цитокинового рецептора, интегрина, активирующего NK-клетки рецептора, BTLA, Toll-подобного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8 (CD8 альфа или CD8 бета), CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL2R бета, IL2R гамма, IL7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганда, который специфически связывается с CD83 или любого их сочетания.

В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая NKR-CAR, дополнительно содержит лидерную последовательность или сигнальную последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В одном из вариантов осуществления кодируемый NKR-CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, соединенный с трансмембранным доменом шарнирным доменом. В одном из вариантов осуществления шарнирный домен выбран из группы, состоящей из шарнира GS, шарнира CD8, шарнира IgG4, шарнира IgD, шарнира KIR2DS2, шарнира KIR, шарнира NCR, шарнира SLAMF, шарнира CD16, шарнира CD64 и шарнира LY49. В одном из вариантов осуществления кодируемый шарнирный домен сдержит: i) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, 2, 3 или 4; ii) аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 5 модификаций аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, 2, 3 или 4; или iii) аминокислотную последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5, 2, 3 или 4. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая NKR-CAR, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 356, 16, 13, 14 или 15, или последовательность нуклеиновой кислоты с 95-99% идентичностью с ней, которая кодирует шарнирный домен.

В одном из вариантов осуществления кодируемый трансмембранный домен и кодируемый цитоплазматический домен совместно содержат: i) аминокислотную последовательность из аминокислот 413-487 SEQ ID NO: 333 или аминокислот 386-454 SEQ ID NO: 335, или SEQ ID NO: 371; ii) аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации но не более 30, 20 или 10 модификаций аминокислот 413-487 SEQ ID NO: 333 или аминокислот 386-454 SEQ ID NO: 335 или SEQ ID NO: 371; или iii) аминокислотную последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотами 413-487 SEQ ID NO: 333 или аминокислотами 386-454 SEQ ID NO: 335 или SEQ ID NO: 371. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты,

кодирующая NKR-CAR, содержит последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотиды 1237-1464 SEQ ID NO: 332 или нуклеотиды 1156-1365 SEQ ID NO: 334, или последовательность, обладающую 95-99% идентичностью с ней, которая кодирует совместно трансмембранный и цитоплазматический домен.

В другом аспекте изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, например, очищенной или неприродной нуклеиновой кислоте, например, нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность ДНК или РНК, например, иРНК, содержащую последовательность, кодирующую NKR-CAR, описываемый в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую адапторную молекулу или внутриклеточный сигнальный домен, который взаимодействует с указанным NKR-CAR. В одном из вариантов осуществления кодируемая адапторная молекула содержит функциональный сигнальный домен DAP12 или FcεRγ. В одном из вариантов осуществления кодируемая адапторная молекула содержит аминокислотную последовательность из аминокислот 1-113 SEQ ID NO: 333 или аминокислот 1-86 SEQ ID NO: 335; аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 20, 10 или 5 модификаций аминокислот 1-113 SEQ ID NO: 333 или аминокислот 1-86 SEQ ID NO: 335; или аминокислотную последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотами 1-113 SEQ ID NO: 333 или аминокислотами 1-86 SEQ ID NO: 335. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая NKR-CAR содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую нуклеотиды 1-339 SEQ ID NO: 332 или нуклеотиды 1-258 SEQ ID NO: 334, или последовательность нуклеиновой кислоты, обладающую 95-99% идентичностью с ней, которая кодирует адапторную молекулу.

В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую TCAR или второй NKR-CAR. В одном из вариантов осуществления кодируемый TCAR или кодируемый второй

NKR-CAR содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном-мишенью, которые не является мезотелином.

В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая NKR-CAR дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую участок расщепления пептида, выбранный из группы, состоящей из T2A, P2A, E2A и F2A, где нуклеиновая кислота, кодирующая участок расщепления пептида, связывает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую NKR-CAR, со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, например, последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей адапторную молекулу. В одном из вариантов осуществления последовательность нуклеиновой кислоты кодирует участок расщепления пептоида, кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, 58, 59 или 60; или аминокислотную последовательность, обладающую 95-99% идентичностью последовательности с ней.

В одном из вариантов осуществления нуклеиновая кислота кодирует активирующий NKR-CAR, и кодируемый внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, в таблице 4. В любом из указанных выше вариантов осуществления кодируемый внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой не принадлежащий мыши антигенсвязывающий домен, который связывается с мезотелином. В одном из вариантов осуществления кодируемый не принадлежащий мыши внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывается с мезотелином, содержит принадлежащий человеку или гуманизированный антигенсвязывающий домен, который связывается с мезотелином. В одном из вариантов осуществления принадлежащий человеку или гуманизированный антигенсвязывающий домен, который связывается с мезотелином, предоставлен в таблице 4.

В одном из вариантов осуществления кодируемый антигенсвязывающий домен человека, который связывается с мезотелином, содержит: определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR1 HC), определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (CDR2 HC) и определяющую комплементарность область

3 тяжелой цепи (CDR3 HC) любой аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела человека против мезотелина, приведенной в таблице 4; и/или определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (CDR1 LC), определяющую комплементарность область 2 легкой цепи (CDR2 LC) и определяющую комплементарность область 3 легкой цепи (CDR3 LC) любой аминокислотной последовательности легкой цепи антитела человека против мезотелина, приведенной в таблице 4. В одном из вариантов осуществления кодируемый антигенсвязывающий домен человека, который связывается с мезотелином, содержит: вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: i) аминокислотную последовательность любой вариабельной области тяжелой цепи антитела человека против мезотелина, приведенной в таблице 4; ii) аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 30, 20 или 10 модификаций аминокислотной последовательности любой вариабельной области тяжелой цепи антитела человека против мезотелина, приведенной в таблице 4; или iii) аминокислотную последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотной последовательностью любой вариабельной области тяжелой цепи антитела человека против мезотелина, приведенной в таблице 4; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую: i) аминокислотную последовательность любой вариабельной области легкой цепи антитела человека против мезотелина, приведенной в таблице 4; ii) аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 30, 20 или 10 модификаций аминокислотной последовательности любой вариабельной области легкой цепи антитела человека против мезотелина, приведенной в таблице 4; или iii) аминокислотную последовательность с 95-99% идентичностью с аминокислотной последовательностью любой вариабельной области легкой цепи антитела человека против мезотелина, приведенной в таблице 4. В одном из вариантов осуществления кодируемый антигенсвязывающий домен человека, который связывается с мезотелином, содержит: i) аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 230-253; ii) аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере

одну, две или три модификации, но не более 30, 20 или 10 модификаций любой из SEQ ID NO: 230-253; или iii) аминокислотную последовательность с 95-99% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 230-253. В таких вариантах осуществления NKR-CAR дополнительно содержит, например, трансмембранный и цитоплазматический домен, совместно содержащие, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 371, аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну, две или три модификации, но не более 10 или 5 модификаций SEQ ID NO: 371, или аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 95-99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 371.

В другом аспекте изобретение относится к вектору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующему NKR-CAR, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления вектор представляет собой ДНК-вектор или РНК-вектор. В одном из вариантов осуществления вектор выбран из группы, состоящей из плазмиды, лентивирусного вектора, аденовирусного вектора и ретровирусного вектора. В одном из вариантов осуществления вектор дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую адапторную молекулу или внутриклеточный сигнальный домен, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления вектор дополнительно содержит промотор, описываемый в настоящем описании, например, промотор EF-1, например, содержащий последовательность SEQ ID NO: 11.

В другом аспекте изобретение относится к клетке, например, эффекторной клетке иммунной системы, например, цитотоксической клетке, например, природной или неприродной Т-клетке, NK-клетке или линии цитотоксических Т-клеток или NK-клеток, содержащих NKR-CAR, описываемый в настоящем описании, молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей NKR-CAR, описываемый в настоящем описании, вектор, описываемый в настоящем описании, или комплекс NKR-CAR, описываемый в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления цитотоксическая клетка дополнительно содержит адапторную молекулу или внутриклеточный сигнальный домен, который взаимодействует с указанным NKR-CAR.

В другом аспекте изобретение относится к способу получения клетки, описываемой в настоящем описании, например, эффекторной клетки иммунной системы, например, цитотоксической клетки, например, природной или неприродной Т-клетки, NK-клетки или линии цитотоксических Т-клеток или NK-клеток, содержащих NKR-CAR, описываемый в настоящем описании, включающему введение в цитотоксическую клетку нуклеиновая кислота, например, иРНК, содержащей последовательность, кодирующую NKR-CAR, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления способ дополнительно включает получение NKR-CAR, описываемого в настоящем описании, в цитотоксической клетке. В одном из вариантов осуществления способ включает получение популяции клетки, описываемой в настоящем описании, например, популяции эффекторных клеток иммунной системы, содержащих NKR-CAR, описываемый в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения индивидуума, например, способу обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающему введение млекопитающему эффективного количества клетки, описываемой в настоящем описании, или популяции клеток, описываемых в настоящем описании, например, цитотоксической клетки, например, природной или неприродной Т-клетки, NK-клетки или линии цитотоксических Т-клеток или NK-клеток, содержащих NKR-CAR, описываемый в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего заболеванием, связанным с экспрессией опухолевого антигена, например, опухолевого антигена, описываемого в настоящем описании, (например, пролиферативным заболеванием, предраковым состоянием и показанию, не связанному со злокачественной опухолью, ассоциированному с экспрессией опухолевого антигена), включающему введение индивидууму эффективного количества клетки, содержащей NKR-CAR, например, как описано в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления NKR-CAR представляет собой активирующий NKR-CAR, и внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании,

например, в таблице 4. В одном из вариантов осуществления способ дополнительно включает введение клетки, содержащей TCAR, например, как описано в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления заболевание, связанное с экспрессией опухолевого антигена, представляет собой злокачественную опухоль, например, злокачественную опухоль, описываемую в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль, например, солидную опухоль, описываемую в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления заболевание или нарушение связано с экспрессией мезотелина, например, мезотелиома (например, злокачественная мезотелиома плевры), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, плоскоклеточный рак легких или крупноклеточный рак легких), рак поджелудочной железы (например, протоковая аденокарцинома поджелудочной железы), рак яичника, колоректальный рак и рак мочевого пузыря или любое их сочетание. В одном из вариантов осуществления заболевание представляет собой рак поджелудочной железы, например, метастатическую протоковую аденокарциному поджелудочной железы (PDA), например, у индивидуума, у которого наблюдали прогрессирование заболевания по меньшей мере во время одной предшествующей стандартной терапии. В одном из вариантов осуществления заболевание представляет собой мезотелиому (например, злокачественную мезотелиому плевры), например, у индивидуума, у которого наблюдали прогрессирование заболевания по меньшей мере во время одной предшествующей стандартной терапии. В одном из вариантов осуществления заболевание представляет собой рак яичника, например, злокачественную серозную эпителиальную опухоль яичника, например, у индивидуума, у которого наблюдали прогрессирование заболевания по меньшей мере после одной предшествующей схемы лечения стандартной терапии.

Дополнительные признаки и варианты осуществления указанных выше композиций и способов включают один или более из таких, как указано ниже.

В другом аспекте изобретение относится к очищенному или неприродному KIR-CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен, например, трансмембранный домен KIR, или цитоплазматический домен, например, содержащий ITIM цитоплазматический домен, или цитоплазматический домен KIR. В одном из вариантов осуществления KIR-CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и содержащий ITIM цитоплазматический домен, или цитоплазматический домен KIR.

В одном из вариантов осуществления указанный трансмембранный домен может взаимодействовать, например, связываться с трансмембранным доменом DAP12. В одном из вариантов осуществления указанный трансмембранный домен содержит положительно заряженную группу, например, аминокислотный остаток, содержащий положительно заряженную группу, например, боковую цепь. В одном из вариантов осуществления указанный трансмембранный домен содержит трансмембранный домен KIR.

В одном из вариантов осуществления указанный KIR-CAR представляет собой активирующий KIR-CAR. В одном из вариантов осуществления указанный KIR-CAR содержит трансмембранный домен KIR. В одном из вариантов осуществления указанный KIR-CAR представляет собой ингибирующий KIR-CAR. В одном из вариантов осуществления указанный KIR-CAR содержит цитоплазматический домен KIR. В одном из вариантов осуществления указанный KIR-CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен, например, трансмембранный домен, содержащий положительно заряженную группу, например, аминокислотный остаток, содержащий положительно заряженную группу, например, боковую цепь, или трансмембранный домен KIR.

В одном из вариантов осуществления KIR-CAR, описываемый в настоящем описании, содержит антигенсвязывающий домен, содержащий scFv. В одном из вариантов осуществления указанный антигенсвязывающий домен содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса, например, фибронектина,

например, антителоподобной молекулы фибронектина III типа. В одном из вариантов осуществления указанный антигенсвязывающий домен содержит нанотело. В одном из вариантов осуществления указанный антигенсвязывающий домен содержит VHH-домен верблюда.

В одном из вариантов осуществления KIR-CAR представляет собой активирующий KIR-CAR, и внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, в таблице 4.

В одном из вариантов осуществления KIR-CAR, описываемый в настоящем описании, содержит внеклеточный шарнирный домен. В одном из вариантов осуществления внеклеточный шарнирный домен представляет собой отличный от шарнирного домена KIR, например, отличный от шарнирного домена KIR2DS2. В одном из вариантов осуществления внеклеточный шарнирный домен получают из природной молекулы. В одном из вариантов осуществления внеклеточный шарнирный домен получают из природной молекулы, отличной от KIR. В одном из вариантов осуществления внеклеточный шарнирный домен содержит неприродную полипептидную последовательность. В одном из вариантов осуществления внеклеточный шарнирный домен содержит внеклеточный шарнир из CD8-альфа человека. В одном из вариантов осуществления внеклеточный шарнирный домен содержит синтетический внеклеточный шарнир. В одном из вариантов осуществления длина внеклеточного шарнирного домена составляет менее 50, 20 или 10 аминокислот. В одном из вариантов осуществления внеклеточный шарнирный домен содержит меньше аминокислот, чем шарнирный домен KIR2DS2.

В одном из вариантов осуществления KIR-CAR, описываемый в настоящем описании, представляет собой actKIR-CAR. В одном из вариантов осуществления указанный actKIR-CAR содержит трансмембранный домен, содержащий положительно заряженную группу, например, аминокислотный остаток, содержащий положительно заряженную группу, например, положительно заряженную боковую цепь или трансмембранный домен actKIR. В одном из вариантов осуществления указанный actKIR-CAR может взаимодействовать с и способствовать передачи сигнала от содержащего ITAM полипептида или адапторной молекулы. В одном из

вариантов осуществления указанный actKIR-CAR может взаимодействовать с и способствовать передачи сигнала от полипептида DAP12. В одном из вариантов осуществления указанный actKIR-CAR содержит домен D KIR. В одном из вариантов осуществления указанный actKIR-CAR содержит домен D1 KIR. В одном из вариантов осуществления указанный actKIR-CAR содержит домен D2 KIR. В одном из вариантов осуществления указанный actKIR-CAR не содержит домен D KIR. В одном из вариантов осуществления указанный actKIR-CAR содержит трансмембранный домен KIR2DS2. В одном из вариантов осуществления указанный actKIR-CAR дополнительно содержит цитоплазматический домен KIR2DS2. В одном из вариантов осуществления указанный actKIR-CAR не содержит домен D KIR.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен KIR-CAR, описываемого в настоящем описании, связывается с антигеном, предоставленном на клетке-мишени, например, злокачественной клетке. В одном из вариантов осуществления указанный антигенсвязывающий домен связывается с антигеном, который в большей степени экспрессируется на высоком уровне на клетке-мишени, например, злокачественной клетке, чем на не являющейся мишенью клетке, например, незлокачественной клетке, например, незлокачественной клетке того же типа, что и клетка-мишень. В одном из вариантов осуществления указанный антигенсвязывающий домен связывается с антигеном, описываемым в настоящем описании, например, опухолевым антигеном, описываемом в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления опухолевый антиген экспрессируется солидной опухолью, например, солидной опухолью, описываемой в настоящем описании, например, мезотелиомой (например, злокачественной мезотелиомой плевры), раком легких (например, немелкоклеточным раком легких, мелкоклеточным раком легких, плоскоклеточным раком легких или крупноклеточным раком легких), раком поджелудочной железы (например, протоковой аденокарциномой поджелудочной железы), раком яичника, колоректальным раком и раком мочевого пузыря или любым их сочетанием.

В одном из вариантов осуществления KIR-CAR, описываемый в

настоящем описании, представляет собой inhKIR-CAR. В одном из вариантов осуществления inhKIR-CAR содержит трансмембранный домен inhKIR. В одном из вариантов осуществления inhKIR-CAR содержит цитоплазматический домен, содержащий ITIM, например, цитоплазматический домен inhKIR, например, цитоплазматический домен KIR2DL или KIR3DL. В одном из вариантов осуществления inhKIR-CAR содержит трансмембранный домен, отличный от трансмембранного домена KIR, например, трансмембранный домен из рецепторов PD-1, CTLA4 или содержащих ITIM рецепторов из ILT (CD85), Siglec, LMIR (CD300) и/или рецепторов семейства генов SLAM. В одном из вариантов осуществления inhKIR-CAR содержит цитоплазматический домен из ингибирующего рецептора, отличного от рецептора KIR, например, из рецепторов PD-1, CTLA4 или содержащих ITIM рецепторов из ILT (CD85), Siglec, LMIR (CD300) и/или рецепторов семейства генов SLAM. В одном из вариантов осуществления inhKIR-CAR содержит трансмембранный и цитоплазматический домен из ингибирующего рецептора отличного от рецептора KIR, например, трансмембранный и цитоплазматический домен, независимо, например, из рецепторов PD-1, CTLA4 или содержащих ITIM рецепторов из ILT (CD85), Siglec, LMIR (CD300) и/или рецепторов семейства генов SLAM. В одном из вариантов осуществления указанный цитоплазматический домен содержит ITIM. В одном из вариантов осуществления inhKIR-CAR содержит домен D KIR. В одном из вариантов осуществления inhKIR-CAR содержит домен D0 KIR. В одном из вариантов осуществления inhKIR-CAR содержит KIR D1 домен. В одном из вариантов осуществления inhKIR-CAR содержит домен D2 KIR. В одном из вариантов осуществления inhKIR-CAR не содержит домен D KIR.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен inhKIR-CAR, описываемых в настоящем описании, связывается с антигеном, не предоставленном на клетке-мишени, например, злокачественной клетке. В одном из вариантов осуществления указанный антигенсвязывающий домен связывается с антигеном, который в большей степени экспрессируется на не являющейся мишенью клетке, например, незлокачественной клетке, отличной от клетки-мишени, например, злокачественной клетке, например,

злокачественной клетке того же типа, что и клетка-мишень. В одном из вариантов осуществления указанный антигенсвязывающий домен связывается с десмоглеином 1/3 (DSG1/3). В одном из вариантов осуществления предоставлены inhCAR, например, inhTCAR или inhNKR-CAR, например, inhKIR-CAR, и actCAR, например, actTCAR или actNKR-CAR, например, actKIR-CAR, в которых inhCAR содержит антигенсвязывающий домен, который направленно воздействует на десмоглеин 1/3 (DSG1/3), и actCAR содержит антигенсвязывающий домен, который направленно воздействует на антиген, отличный от DSG1/3, например, EGFR. В одном из вариантов осуществления эту пару используют для лечения экспрессирующих EGFR злокачественную опухоль, например, аденокарциномы легкого или толстой кишки. В одном из вариантов осуществления злокачественные клетки экспрессируют меньше DSG1/3, чем незлокачественные клетки. В одном из вариантов осуществления такая комбинация может сводить к минимуму опосредованную CAR атаку клеток кожи или плоских клеток ЖК тракта (т.е. слизистой оболочки ротовой полости). В одном из вариантов осуществления указанный антигенсвязывающий домен связывается с рецептором эфринов или клаудином.

В другом аспекте изобретение относится к нуклеиновой кислоте, например, очищенной или неприродной нуклеиновой кислоте, например, нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность ДНК или РНК, например, иРНК, содержащую (а) последовательность, кодирующую KIR-CAR, например, первый KIR-CAR, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления указанный KIR-CAR, например, указанный первый KIR-CAR, представляет собой actKIR-CAR, например, actKIR-CAR, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления нуклеиновая кислота кодирует actKIR-CAR, и кодируемый внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, в таблице 4. В одном из вариантов осуществления указанный KIR-CAR, например, указанный первый KIR-CAR, представляет собой inhKIR-CAR, например, inhKIR-CAR, описываемый в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления указанная нуклеиновая кислота содержит последовательность ДНК. В одном из вариантов осуществления указанная нуклеиновая кислота содержит последовательность РНК, например, последовательность иРНК.

В одном из вариантов осуществления указанная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующая KIR-CAR, например, actKIR-CAR, и последовательность, кодирующая ингибиторную молекулу, содержащую: цитоплазматический домен inhKIR; трансмембранный домен, например, трансмембранный домен KIR; и ингибирующий цитоплазматический домен, например, домен ITIM, например, домен inhKIR ITIM. В одном из вариантов осуществления ингибирующая молекула представляет собой природный inhKIR или последовательность, обладающую по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с природным inhKIR, или которая отличается не более, чем на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 остатков от природного inhKIR.

В одном из вариантов осуществления указанная нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую KIR-CAR, например, actKIR-CAR, и последовательность, кодирующую ингибирующую молекулу, содержащую: цитоплазматический домен семейства SLAM; трансмембранный домен, например, трансмембранный домен семейства SLAM; и ингибирующий цитоплазматический домен, например, домен семейства SLAM, например, домен ITIM семейства SLAM. В одном из вариантов осуществления ингибирующая молекула представляет собой природный представитель семейства SLAM или последовательность, обладающую по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с природным представителем семейства SLAM, или которая отличается не более чем, на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 остатков от природного представителя семейства SLAM.

В одном из вариантов осуществления указанная нуклеиновая кислота, описываемая в настоящем описании, дополнительно содержит (b) последовательность, кодирующую второй KIR-CAR, описываемый в настоящем описании, например, второй KIR-CAR, который отличается от указанного первого KIR-CAR. В одном из вариантов осуществления (a) и (b) располагаются на одной и той

же молекуле нуклеиновой кислоты, например, том же векторе, например, том же вирусном векторе, например, лентивирусном векторе. В одном из вариантов осуществления один из (a) и (b) располагается на первой молекуле нуклеиновой кислоты, например, первом векторе, например, вирусном векторе, например, лентивирусном векторе, а другой располагается на второй молекуле нуклеиновой кислоты, например, втором векторе, например, вирусном векторе, например, лентивирусном векторе. В одном из вариантов осуществления указанный первый KIR-CAR и указанный второй KIR-CAR представляют собой actKIR-CAR. В одном из вариантов осуществления участие одного actKIR-CAR является недостаточным для индукции значимых уровней активации. В одном из вариантов осуществления участие первого и второго actKIR-CAR обеспечивает аддитивный или синергический уровень активации. В одном из вариантов осуществления указанный первый KIR-CAR и указанный второй KIR-CAR представляют собой inhKIR-CAR. В одном из вариантов осуществления один из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR представляет собой actKIR-CAR, а другой представляет собой inhKIR-CAR. В одном из вариантов осуществления указанный actKIR-CAR представляет собой actKIR-CAR, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления указанный inhKIR-CAR представляет собой inhKIR-CAR, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления нуклеиновая кислота, описываемая в настоящем описании, содержит actKIR-CAR, описываемый в настоящем описании, и inhKIR-CAR, описываемый в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления нуклеиновая последовательность дополнительно содержит (c) последовательность, кодирующую внутриклеточный сигнальный домен, например, адапторную молекулу, которая может продуцировать активирующий сигнал. В одном из вариантов осуществления указанные внутриклеточный сигнальный домен содержит мотив ITAM. В одном из вариантов осуществления указанная последовательность кодирует полипептид DAP 12, содержащий внутриклеточный сигнальный домен DAP 12. В одном из вариантов осуществления указанный полипептид DAP 12 дополнительно содержит

трансмембранный домен. В одном из вариантов осуществления указанный полипептид DAP 12 дополнительно содержит внеклеточный домен. В одном из вариантов осуществления каждый из (a), (b) и (c) содержится в одной и той же молекуле нуклеиновой кислоты, например, векторе, например, вирусном векторе, например, лентивирусном векторе. В одном из вариантов осуществления один из (a), (b) и (c) кодируется в первой молекуле нуклеиновой кислоты, например, векторе, например, вирусном векторе, например, лентивирусном векторе, и второй и третий из (a), (b) и (c) кодируется во второй молекуле нуклеиновой кислоты, например, векторе, например, вирусном векторе, например, лентивирусном векторе. В одном из вариантов осуществления (a) содержится в первой молекуле нуклеиновой кислоты, например, векторе, например, вирусном векторе, например, лентивирусном векторе, и (b) и (c) содержится во второй молекуле нуклеиновой кислоты, например, векторе, например, вирусном векторе, например, лентивирусном векторе. В другом варианте осуществления (b) содержится в первой молекуле нуклеиновой кислоты, например, векторе, например, вирусном векторе, например, лентивирусном векторе, и (a) и (c) содержатся во второй молекуле нуклеиновой кислоты, например, векторе, например, вирусном векторе, например, лентивирусном векторе. В одном из вариантов осуществления (c) содержится в первой молекуле нуклеиновой кислоты, например, векторе, например, вирусном векторе, например, лентивирусном векторе, и (b) и (a) содержатся во второй молекуле нуклеиновой кислоты, например, векторе, например, вирусном векторе, например, лентивирусном векторе. В одном из вариантов осуществления каждый из (a), (b) и (c) содержится в разных молекулах нуклеиновой кислоты, например, разных векторах, например, вирусных векторах, например, лентивирусных векторах.

В одном из вариантов осуществления (i) антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR не содержит вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, (ii) антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-

CAR представляет собой scFv, а другой представляет собой антигенсвязывающий домен, отличный от scFv, (iii) при наличии на поверхности клетки антигенсвязывающие домены указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR взаимодействуют друг с другом в меньшей степени, чем, если бы оба являлись антигенсвязывающими доменами scFv, (iv), где при наличии на поверхности клетки связывание антигенсвязывающего домена указанного первого KIR-CAR со своим когнатным антигеном по существу не снижается в результате наличия указанного второго KIR-CAR, (v) антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса, например, фибронектина, например, антителоподобной молекулы фибронектина III типа, (vi) антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR представляет собой scFv, а другой содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса, например, фибронектина, например, антителоподобной молекулы фибронектина III типа, (vii) антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR представляет собой scFv, а другой содержит нанотело, или (viii) антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR представляет собой scFv, а другой содержит VHH-домен верблюда.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR не содержит вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR представляет собой scFv, а другой представляет собой антигенсвязывающий домен, отличный scFv.

В одном из вариантов осуществления при наличии на

поверхности клетки антигенсвязывающие домены указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR взаимодействуют друг с другом в меньшей степени, чем, если бы оба представляли собой антигенсвязывающие домены scFv. В одном из вариантов осуществления при наличии на поверхности клетки связывание антигенсвязывающего домена указанного первого KIR-CAR со своим когнатным антигеном по существу не снижается в результате присутствия указанного второго KIR-CAR. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса, например, фибронектина, например, антителоподобной молекулы фибронектина III типа. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR представляет собой scFv, а другой содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса, например, фибронектина, например, антителоподобной молекулы фибронектина III типа. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR представляет собой scFv, а другой содержит нанотело. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR представляет собой scFv, а другой содержит VHH-домен верблюда.

В одном из вариантов осуществления нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую TCAR. В одном из вариантов осуществления указанный TCAR содержит антигенсвязывающий домен и активирующий цитоплазматический домен из комплекса Т-клеточного рецептора с CD3, например, дзета-цепью CD3, эпсилон-цепью CD3, гамма-цепью CD3, дельта-цепью CD3. В одном из вариантов осуществления указанный TCAR содержит костимулирующий домен из костимулирующего рецептора, например,

CD28, CD137, CD27, ICOS или OX40.

В одном из вариантов осуществления (i) антигенсвязывающий домен одного из указанного KIR-CAR и указанного TCAR не содержит вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, (ii) антигенсвязывающий домен одного из указанного KIR-CAR и указанного TCAR представляет собой scFv, а другой представляет собой антигенсвязывающий домен, отличный от scFv, (iii) при наличии на поверхности клетки антигенсвязывающие домены указанного KIR-CAR и указанного TCAR, взаимодействуют друг с другом в меньшей степени, чем, если бы оба представляли собой антигенсвязывающие домены scFv, (iv) при наличии на поверхности клетки связывание антигенсвязывающего домена указанного KIR-CAR со своим когнатным антигеном по существу не снижается в результате наличия указанного второго TCAR, (v) антигенсвязывающий домен одного из указанного KIR-CAR и указанного TCAR, содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса, например, фибронектина, например, антителоподобной молекулы фибронектина III типа, (vi) антигенсвязывающий домен одного из указанного KIR-CAR и указанного TCAR представляет собой scFv, а другой содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса, например, фибронектин, например, антителоподобной молекулы фибронектина III типа, (vii) антигенсвязывающий домен одного из указанного KIR-CAR и указанного TCAR представляют собой cFv, а другой содержит нанотело, или (viii), где, антигенсвязывающий домен одного из указанного KIR-CAR и указанного TCAR представляет собой scFv, а другой содержит VHH-домен верблюда. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного KIR-CAR и указанного TCAR не содержит вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен

одного из указанного KIR-CAR и указанного TCAR представляет собой scFv, а другой представляет собой антигенсвязывающий домен, отличный от scFv. В одном из вариантов осуществления при наличии на поверхности клетки антигенсвязывающие домены указанного KIR-CAR и указанного TCAR взаимодействуют друг с другом в меньшей степени, чем, если бы оба представляли собой антигенсвязывающие домены scFv. В одном из вариантов осуществления при наличии на поверхности клетки связывание антигенсвязывающего домена указанного KIR-CAR со своим когнатным антигеном по существу не снижается в результате наличия указанного второго TCAR. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного KIR-CAR указанного TCAR содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса, например, фибронектина, например, антителоподобной молекулы фибронектина III типа. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного KIR-CAR и указанного TCAR представляет собой scFv, а другой содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса, например, фибронектина, например, антителоподобной молекулы фибронектина III типа. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного KIR-CAR и указанного TCAR представляет собой scFv, а другой содержит нанотело. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного KIR-CAR и указанного TCAR представляет собой scFv, а другой содержит VHH-домен верблюда.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного KIR-CAR и указанного TCAR связывается с мезотелином, а другой связывается с другим антигенсвязывающим доменом, например, с той же мишенью (мезотелином) или другой мишенью (например, мишенью, отличной от мезотелина на тех же стромальных клетках, например, FAP; мишенью, отличной от

мезотелина на злокачественных клетках предстательной железы, например, андрогенным рецептором, OR51E2, PSMA, PSCA, PDGRF-β, TARP, GloboH, MAD-CT-1 или MAD-CT-2; мишенью, отличной от мезотелина на злокачественных клетках яичника, например, Tn, PRSS21, CD171, Lewis Y, рецептором фолата α, клаудином 6, GloboH или белком спермы 17).

В другом аспекте изобретение относится к цитотоксической клетке, например, природной или неприродной Т-клетке, NK-клетке или цитотоксической Т-клетке или клетке линии NK-клеток, например, NK92, содержащей (a) первый KIR-CAR, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления указанная цитотоксическая клетка представляет собой Т-клетку. В одном из вариантов осуществления указанная цитотоксическая клетка представляет собой NK-клетку. В одном из вариантов осуществления указанная цитотоксическая клетка является из линии NK-клеток, например, клетка NK92. В одном из вариантов осуществления указанный первый KIR-CAR представляет собой actKIR-CAR, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления указанный первый KIR-CAR представляет собой inhKIR-CAR, описываемый в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления указанная цитотоксическая клетка содержит KIR-CAR, например, actKIR-CAR, и ингибирующую молекулу, содержащую: цитоплазматический домен inhKIR; трансмембранный домен, например, трансмембранный домен KIR, и ингибирующий цитоплазматический домен, например, домен ITIM, например, домен inhKIR ITIM. В одном из вариантов осуществления ингибирующая молекула представляет собой природный inhKIR или последовательность, обладающую по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с природным inhKIR, или которая отличается не более чем, на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 остатков от природного inhKIR.

В одном из вариантов осуществления указанная цитотоксическая клетка содержит KIR-CAR, например, actKIR-CAR, и ингибирующую молекулу, содержащую: цитоплазматический домен семейства SLAM; трансмембранный домен, например, трансмембранный

домен семейства SLAM, и ингибирующий цитоплазматический домен, например, домен семейства SLAM, например, домен ITIM семейства SLAM. В одном из вариантов осуществления ингибирующая молекула представляет собой природный представитель семейства SLAM или последовательность, обладающую по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с природным представителем семейства SLAM, или которая отличается не более чем, на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 остатков от природного представителя семейства SLAM.

В одном из вариантов осуществления цитотоксическая клетка дополнительно содержит (b) второй KIR-CAR, описываемый в настоящем описании, например, второй KIR-CAR, который отличается от указанного первого KIR-CAR. В одном из вариантов осуществления один из указанного KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR представляет собой actKIR-CAR, а другой представляет собой inhKIR-CAR. В одном из вариантов осуществления указанный actKIR-CAR представляет собой actKIR-CAR, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления один указанного inhKIR-CAR представляет собой inhKIR-CAR, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления цитотоксическая клетка, описываемая в настоящем описании, содержит actKIR-CAR, описываемый в настоящем описании, и inhKIR-CAR, описываемый в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления цитотоксическая клетка дополнительно содержит внутриклеточный сигнальный домен, например, адапторную молекулу, которая может продуцировать активирующий сигнал, например, который является экзогенным по отношению к указанной клетке, которая может продуцировать активирующий сигнал. В одном из вариантов осуществления указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит мотив ITAM. В одном из вариантов осуществления указанный внутриклеточный сигнальный домен содержит полипептид DAP 12, содержащий внутриклеточный сигнальный домен DAP 12. В одном из вариантов осуществления указанный полипептид DAP 12 дополнительно содержит трансмембранный домен. В одном из вариантов осуществления указанный полипептид DAP 12 дополнительно содержит внеклеточный

домен.

В одном из вариантов осуществления цитотоксическая клетка содержит первый и второй KIR-CAR, описываемый в настоящем описании, где (i) антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR не содержит вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, (ii) антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR представляет собой scFv, а другой представляет собой антигенсвязывающий домен, отличный от scFv, (iii) при наличии на поверхности клетки антигенсвязывающие домены указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR взаимодействуют друг с другом в меньшей степени, чем, если бы оба представляли собой антигенсвязывающие домены scFv, (iv) при наличии на поверхности клетки связывание антигенсвязывающего домена указанного первого KIR-CAR со своим когнатным антигеном по существу не снижается в результате присутствия указанного второго KIR-CAR, (v) антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса, например, фибронектина, например, антителоподобной молекулы фибронектина III типа, (vi) антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR содержит scFv, а другой содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса, например, фибронектина, например, антителоподобной молекулы фибронектина III типа, (vii), где, антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR содержит scFv, а другой содержит нанотело, или (viii) антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR содержит scFv, а другой содержит VHH-домен верблюда.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен

одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR не содержит вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR представляет собой scFv, а другой представляет собой антигенсвязывающий домен, отличный от scFv. В одном из вариантов осуществления при наличии на поверхности клетки антигенсвязывающие домены указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR взаимодействуют друг с другом в меньшей степени, чем, если бы оба представляли собой антигенсвязывающие домены scFv. В одном из вариантов осуществления при наличии на поверхности клетки связывание антигенсвязывающего домена указанного первого KIR-CAR со своим когнатным антигеном по существу не снижается в результате присутствия указанного второго KIR-CAR. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса, например, фибронектина, например, антителоподобной молекулы фибронектина III типа. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR содержит scFv, а другой содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса, например, фибронектина, например, антителоподобной молекулы фибронектина III типа. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR содержит scFv, а другой содержит нанотело. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR содержит scFv, а другой содержит VHH-домен верблюда.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен

одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR связывается с мезотелином, а другой связывается с другим антигенсвязывающим доменом, например, с той же мишенью (мезотелином) или другой мишенью (например, мишенью, отличной от мезотелина, на стромальных клетках, например, FAP; мишенью, отличной от мезотелина на злокачественных клетках предстательной железы, например, андрогенным рецептором, OR51E2, PSMA, PSCA, PDGRF-β, TARP, GloboH, MAD-CT-1 или MAD-CT-2; мишенью, отличной от мезотелина на злокачественных клетках яичника, например, Tn, PRSS21, CD171, Lewis Y, рецептором фолата α, клаудином 6, GloboH или белком спермы 17).

В одном из вариантов осуществления цитотоксическая клетка содержит KIR-CAR, как описано в настоящем описании, и дополнительно содержит TCAR. В одном из вариантов осуществления указанный TCAR содержит антигенсвязывающий домен и первичный стимулирующий домен. В одном из вариантов осуществления указанный TCAR содержит костимулирующий домен.

В одном из вариантов осуществления цитотоксическая клетка, например, природная или неприродная Т-клетка, NK-клетка или линия цитотоксических Т-клеток или NK-клеток, например, клетка NK92, содержит нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем описании, или KIR-CAR, кодируемый нуклеиновой кислотой, описываемой в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления указанная цитотоксическая клетка представляет собой Т-клетку. В одном из вариантов осуществления указанная цитотоксическая клетка представляет собой NK-клетку. В одном из вариантов осуществления указанная цитотоксическая клетка является из линии NK-клеток, например, NK92.

В другом аспекте изобретение относится к способам получения клетки, описываемой в настоящем описании, включающим введение в цитотоксическую клетку нуклеиновой кислоты, описываемой в настоящем описании, в указанную клетку. В одном из вариантов осуществления указанный способ включает формирование в цитотоксической клетке KIR-CAR, описываемого в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к способам лечения индивидуума, например, способу обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающим введение млекопитающему эффективного количества клетки, описываемой в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления указанная клетка является аутологичной. В одном из вариантов осуществления указанная клетка является аллогенной. В одном из вариантов осуществления клетка представляет собой Т-клетку, например, аутологичную Т-клетку. В одном из вариантов осуществления клетка представляет собой аллогенную Т-клетку. В одном из вариантов осуществления клетка представляет собой NK-клетку, например, аутологичную NK-клетку. В одном из вариантов осуществления клетка представляет собой аллогенную NK-клетку. В одном из вариантов осуществления клетка представляет собой клетку из линии NK-клеток, например, NK92. В одном из вариантов осуществления указанное млекопитающее является человеком. В одном из вариантов осуществления способ дополнительно включает оценку указанного млекопитающего, например, человека, в отношении побочных эффектов указанного лечения. В одном из вариантов осуществления указанный побочный эффект включает острый респираторный дистресс-синдром, фебрильную нейтропению, гипотензию, энцефалопатию, печеночный трансаминит, судороги или синдром активации макрофагов. В одном из вариантов осуществления способ дополнительно включает лечение указанного человека, страдающего побочным эффектом, средством, описываемым в настоящем описании, например, противоцитокиновым средством, например, антагонистом фактора некроза опухоли, например, инфузией TNF-Ig, например, этанерцепта, антагонисто IL-6 м, например, антагонистом рецептора IL-6, например, антителом против рецептора IL6, например, тоцилизумабом, или кортикостероидом. В одном из вариантов осуществления лечение включает введение антитела против рецептора IL6 указанному человеку.

В одном из вариантов осуществления заболевание, связанное с экспрессией опухолевого антигена, представляет собой злокачественную опухоль, например, злокачественную опухоль,

описываемую в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль, например, солидную опухоль, описываемую в настоящем описании, например, мезотелиому (например, злокачественную мезотелиому плевры), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, плоскоклеточный рак легких или крупноклеточный рак легких), рак поджелудочной железы (например, протоковую аденокарциному поджелудочной железы), рак яичника, колоректальный рак и рак мочевого пузыря или любое их сочетание. В одном из вариантов осуществления заболевание представляет собой рак поджелудочной железы, например, метастатическую протоковую аденокарциному поджелудочной железы (PDA), например, у индивидуума у которого наблюдали прогрессирование заболевания по меньшей мере во время одной предшествующей стандартной терапии. В одном из вариантов осуществления заболевание представляет собой мезотелиому (например, злокачественную мезотелиому плевры), например, у индивидуума у которого наблюдали прогрессирование заболевания по меньшей мере во время одной предшествующей стандартной терапии. В одном из вариантов осуществления заболевание представляет собой рак яичника, например, злокачественную серозную эпителиальную опухоль яичника, например, у индивидуума, у которого наблюдали прогрессирование по меньшей мере после одной предшествующей схемы лечения стандартной терапии.

В одном из вариантов осуществления способ включает лечение млекопитающего, например, человека, страдающего заболеванием, связанным с экспрессией мезотелина или CD19. В одном из вариантов осуществления способ включает лечение млекопитающего, например, человека, страдающего нарушением, связанным с нежелательной клеточной пролиферацией, например, злокачественной опухолью. В одном из вариантов осуществления указанное нарушение представляет собой карциному поджелудочной железы, мезотелиому, карциному легких, карциному яичника, лейкоз или лимфому.

В другом аспекте изобретение относится к очищенному или неприродному NCR-CAR, например, активирующему NCR-CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен,

трансмембранный домен, например, трансмембранный домен, содержащий положительно заряженную группу, например, аминокислотный остаток, содержащий положительно заряженную группу, например, положительно заряженную боковую цепь или трансмембранный домен NCR, и цитоплазматический домен, например, цитоплазматический домен NCR.

В одном из вариантов осуществления указанный NCR-CAR содержит трансмембранный домен, содержащий положительно заряженную группу, например, аминокислотный остаток, содержащий положительно заряженную группу, например, положительно заряженную боковую цепь, например, Трансмембранный домен NCR, например, цитоплазматический домен NKp30, NKp44 или NKp46. В одном из вариантов осуществления указанный NCR-CAR содержит цитоплазматический домен, который может взаимодействовать с адапторной молекулой или молекулой внутриклеточной сигнализации, содержащей, например, цитоплазматический домен DAP12, FcRγ или CD3ζ. В одном из вариантов осуществления указанный NCR-CAR, например, NKp30-CAR, содержит трансмембранный домен, который может взаимодействовать с адапторной молекулой или молекулой внутриклеточной сигнализации, например, DAP12. В одном из вариантов осуществления указанный NCR-CAR содержит NKp46-CAR. В одном из вариантов осуществления указанный NKp46-CAR содержит трансмембранный домен, содержащий положительно заряженную группу, например, аминокислотный остаток, содержащий положительно заряженную группу, например, положительно заряженную боковую цепь или, например, трансмембранный домен NCR, который может взаимодействовать с адапторной молекулой или молекулой внутриклеточной сигнализации, например, молекулой, содержащей цитоплазматический домен FcRγ или CD3ζ. В одном из вариантов осуществления указанный NCR-CAR, описываемый в настоящем описании, дополнительно содержит шарнирный домен, располагающийся между указанным трансмембранным доменом и указанным внеклеточным антигенсвязывающим доменом.

В одном из вариантов осуществления NCR-CAR представляет собой активирующий NCR-CAR, и внеклеточный антигенсвязывающий

домен представляет собой антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, в таблице 4.

В другом аспекте изобретение относится к нуклеиновой кислоте, например, очищенной или неприродной нуклеиновой кислоте, например, нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность ДНК или РНК, например, иРНК, содержащую последовательность, кодирующую NCR-CAR, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую NKp30-CAR и необязательно адапторную молекула или молекулу внутриклеточной сигнализации, например, DAP12. В одном из вариантов осуществления указанный NCR-CAR, например, NKp46-CAR, содержит трансмембранный домен, содержащий положительно заряженную группу, например, аминокислотный остаток, содержащий положительно заряженную группу, например, положительно заряженную боковую цепь, или трансмембранный домен NCR, который может взаимодействовать с адапторной молекулой или молекулой внутриклеточной сигнализации, например, молекулу FcRγ или CD3ζ. В одном из вариантов осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит последовательность, кодирующую адапторную молекулу или молекулу внутриклеточной сигнализации, которая например, содержит DAP12, FcRγ или CD3ζ.

В одном из вариантов осуществления нуклеиновая кислота кодирует actNCR-CAR, и кодируемый внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, в таблице 4.

В другом аспекте изобретение относится к цитотоксической клетке, например, природной или неприродной Т-клетке, NK-клетке или линии цитотоксических Т-клеток или NK-клеток, содержащих NCR-CAR, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления цитотоксическая клетка дополнительно содержит адапторную молекулу или молекулу внутриклеточной сигнализации, которая, например, содержит DAP12, цитоплазматический домен FcRγ или CD3ζ. В одном из вариантов осуществления цитотоксическая клетка содержит NKp30-CAR и необязательно адапторную молекулу

или молекулу внутриклеточной сигнализации, например, DAP12. В одном из вариантов осуществления указанный NKp46-CAR содержит трансмембранный домен, который может взаимодействовать с адапторной молекулой или молекулой внутриклеточной сигнализации, например, молекулой FcRγ или CD3ζ.

В другом аспекте изобретение относится к способу получения клетки, описываемой в настоящем описании, включающему введение в цитотоксическую клетку, нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую NCR-CAR, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления способ включает формирование в цитотоксической клетке NCR-CAR, описываемого в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения индивидуума, например, способу обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающему введение млекопитающему эффективного количества клетки, описываемой в настоящем описании, например, клетки по пункту, описываемому в настоящем описании, содержащей NCR-CAR, описываемый в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего заболеванием, связанным с экспрессией опухолевого антигена, например, опухолевого антигена, описываемого в настоящем описании (например, пролиферативного заболевания, предракового состояния и не связанного со злокачественной опухолью показания, ассоциированного с экспрессией опухолевого антигена), включающему введение индивидууму эффективного количества клетки, содержащей NCR-CAR, например, как описано в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления NCR-CAR представляет собой активирующий NCR-CAR, и внеклеточный антигенсвязывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, в таблице 4.

В одном из вариантов осуществления заболевание, связанное с экспрессией опухолевого антигена, представляет собой злокачественную опухоль, например, злокачественную опухоль, описываемую в настоящем описании. В одном из вариантов

осуществления злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль, например, солидную опухоль, описываемую в настоящем описании, например, мезотелиому (например, злокачественную мезотелиому плевры), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, плоскоклеточный рак легких или крупноклеточный рак легких), рак поджелудочной железы (например, протоковую аденокарциному поджелудочной железы), рак яичника, колоректальный рак и рак мочевого пузыря или любое их сочетание. В одном из вариантов осуществления заболевание представляет собой рак поджелудочной железы, например, метастатическую протоковую аденокарциному поджелудочной железы (PDA), например, у индивидуума, у которого наблюдали прогрессирование заболевания по меньшей мере во время одной предшествующей стандартной терапии. В одном из вариантов осуществления заболевание представляет собой мезотелиому (например, злокачественную мезотелиому плевры), например, у индивидуума, у которого наблюдали прогрессирование заболевания по меньшей мере во время одной предшествующей стандартной терапии. В одном из вариантов осуществления заболевание представляет собой рак яичника, например, злокачественную серозную эпителиальную опухоль яичника, например, у индивидуума, у которого наблюдали прогрессирование заболевания по меньшей мере после одной предшествующей схемы лечения стандартной терапии.

В другом аспекте изобретение относится к очищенному или неприродному SLAMF-CAR, например, ингибирующему SLAMF-CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен, например, трансмембранный домен, содержащий положительно заряженную группу, например, аминокислотный остаток, содержащий положительно заряженную группу, например, положительно заряженную боковую цепь, например, трансмембранный домен SLAMF, и цитоплазматический домен SLAMF. В одном из вариантов осуществления указанный SLAMF-CAR содержит цитоплазматический домен SLAMF, CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME или CD2F-10. В одном из вариантов осуществления указанный SLAMF-CAR дополнительно содержит

шарнирный домен, расположенный между указанным трансмембранным доменом и указанным внеклеточным антигенсвязывающим доменом.

В другом аспекте изобретение относится к нуклеиновой кислоте, например, очищенной или неприродной нуклеиновой кислоте, например, нуклеиновая кислота, содержащей последовательность ДНК или РНК, например, иРНК, содержащую последовательность, кодирующую SLAMF-CAR, описываемый в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к цитотоксической клетке, например, природной или неприродной Т-клетке, NK-клетке или линии цитотоксических Т-клеток или NK-клеток, содержащих SLAMF-CAR, описываемый в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к способу получения цитотоксической клетки, содержащей SLAMF-CAR, описываемый в настоящем описании, включающему введение в цитотоксическую клетку нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую SLAMF-CAR, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления способ включает формирование в цитотоксической клетке SLAMF-CAR, описываемый в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения индивидуум, например, способу обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающему введение млекопитающему эффективного количества клетки, содержащей SLAMF-CAR, описываемый в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к очищенному или неприродному FcR-CAR, например, CD16-CAR, например, активирующему CD16-CAR или CD64-CAR, например, активирующему CD64-CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и цитоплазматический домен CD16 или CD64. В одном из вариантов осуществления указанный FcR-CAR представляет собой CD16-CAR. В одном из вариантов осуществления указанный FcR-CAR представляет собой CD64-CAR. В одном из вариантов осуществления указанный FcR-CAR может взаимодействовать с адапторной молекулой или молекулой

внутриклеточной сигнализации, например, доменом FcRγ или CD3ζ, например, через трансмембранный домен, например, трансмембранный домен, содержащий положительно заряженную группу, например, аминокислотный остаток, содержащий положительно заряженную группу, например, положительно заряженную боковую цепь или, например, трансмембранный домен CD16 или CD64. В одном из вариантов осуществления указанный FcR-CAR дополнительно содержит шарнирный домен, расположенный между указанным трансмембранным доменом и указанным внеклеточным антигенсвязывающим доменом.

В другом аспекте изобретение относится к очищенной или неприродной нуклеиновой кислоте, например, нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность ДНК или РНК, например, иРНК, содержащую последовательность, кодирующую FcR-CAR, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит адапторную молекулу или молекулу внутриклеточной сигнализации, содержащую цитоплазматический активирующий домен, например, цитоплазматический домен FcRγ или CD3ζ. В одном из вариантов осуществления указанный FcR-CAR и указанный цитоплазматический активирующий домен располагаются на отдельных молекулах нуклеиновой кислоты, например, отдельных векторах, например, отдельных вирусных векторах, например, отдельных лентивирусных векторах.

В другом аспекте изобретение относится к цитотоксической клетке, например, природной или неприродной Т-клетке, NK-клетке или линии цитотоксических Т-клеток или NK-клеток, содержащих FcR-CAR, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления цитотоксическая клетка дополнительно содержит цитоплазматический активирующий домен, например, цитоплазматический домен FcRγ или CD3ζ.

В другом аспекте изобретение относится к способу получения клетки, содержащей FcR-CAR, описываемый в настоящем описании, включающему введение в цитотоксическую клетку, нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую FcR-CAR, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов

осуществления способ включает формирование в цитотоксической клетке, FcR-CAR, описываемый в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения индивидуум, например, способу обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающему введение млекопитающему эффективного количества клетки, содержащей FcR-CAR, описываемый в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к очищенному или неприродному Ly49-CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен, например, трансмембранный домен Ly49, или цитоплазматический домен, например, содержащий ITIM цитоплазматический домен, например, цитоплазматический домен Ly49. В одном из вариантов осуществления Ly49-CAR содержит трансмембранный домен и цитоплазматический домен Ly49. В одном из вариантов осуществления указанный Ly49-CAR представляет собой активирующий Ly49-CAR, например, Ly49D или Ly49H. В одном из вариантов осуществления указанный Ly49-CAR содержит положительно заряженный трансмембранный домен, например, положительно заряженный трансмембранный домен Ly49. В одном из вариантов осуществления указанный Ly49-CAR может взаимодействовать с содержащим ITAM цитоплазматическим доменом, например, DAP 12. В одном из вариантов осуществления указанный Ly49-CAR содержит трансмембранный домен Ly49. В одном из вариантов осуществления указанный KIR-CAR представляет собой ингибирующий Ly49-CAR, например, Ly49A или Ly49C. В одном из вариантов осуществления указанный Ly49-CAR содержит цитоплазматический домен, содержащий ITIM, например, цитоплазматический домен Ly49. В одном из вариантов осуществления указанный Ly49-CAR содержит трансмембранный домен Ly49 или цитоплазматический домен Ly49, независимо выбранный из Ly49A-Ly49W. В одном из вариантов осуществления указанный Ly49-CAR дополнительно содержит шарнирный домен, расположенный между указанным трансмембранным доменом и указанным внеклеточным антигенсвязывающим доменом.

В другом аспекте изобретение относится к нуклеиновой кислоте, например, очищенной или неприродной нуклеиновой

кислоте, например, нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность ДНК или РНК, например, иРНК, содержащую последовательность, кодирующую Ly49-CAR, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит цитоплазматический активирующий домен, например, цитоплазматический домен DAP12. В одном из вариантов осуществления указанный Ly49-CAR и указанный цитоплазматический активирующий домен располагаются на отдельных молекулах нуклеиновой кислоты, например, отдельных векторах, например, отдельных вирусных векторах, например, отдельных лентивирусных векторах.

В другом аспекте изобретение относится к цитотоксической клетке, например, природной или неприродной Т-клетке, NK-клетке или линии цитотоксических Т-клеток или NK-клеток, содержащих Ly49-CAR, описываем в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления цитотоксическая клетка дополнительно содержит цитоплазматический активирующий домен, например, цитоплазматический домен DAP12.

В другом аспекте изобретение относится к способу получения клетки, содержащей Ly49-CAR, описываемый в настоящем описании, включающему введение в цитотоксическую клетку, нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую Ly49-CAR, описываемый в настоящем описании, в указанную клетку.

В другом аспекте изобретение относится к способу получения клетки, содержащей Ly49-CAR, описываемый в настоящем описании, включающему формирование в цитотоксической клетке Ly49-CAR, описываемого в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения индивидуума, например, способу обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающему введение млекопитающему эффективного количества клетки, описываемой в настоящем описании, например, клетки, содержащей Ly49-CAR, описываемый в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к клетке, содержащей, например, цитотоксическую клетку, содержащую первый неприродный химерный погруженный в мембрану рецептор, содержащий

антигенсвязывающий домен, и второй неприродный химерный погруженный в мембрану рецептор, содержащий антигенсвязывающий домен, где, (i) антигенсвязывающий домен одного из указанного первого и указанного второго неприродного химерного погруженного в мембрану рецептора не содержит вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, (ii) антигенсвязывающий домен одного из указанного первого и указанного второго неприродного химерного погруженного в мембрану рецептора содержит scFv, а другой представляет собой антигенсвязывающий домен, отличный от scFv, (iii) при наличии на поверхности клетки антигенсвязывающие домены указанного первого и указанного второго неприродного химерного погруженного в мембрану рецептора взаимодействуют друг с другом в меньшей степени, чем, если бы оба представляли собой антигенсвязывающие домены scFv, (iv) при наличии на поверхности клетки связывание антигенсвязывающего домена указанного первого неприродного химерного погруженного в мембрану рецептора со своим когнатным антигеном по существу не снижается в результате наличия указанного второго неприродного химерного погруженного в мембрану рецептора, (v) антигенсвязывающий домен одного из указанного первого и указанного второго неприродного химерного погруженного в мембрану рецептора содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса, например, фибронектина, например, антителоподобной молекулы фибронектина III типа, (vi) антигенсвязывающий домен одного из указанного первого и указанного второго неприродного химерного погруженного в мембрану рецептора содержит scFv, а другой содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса, например, фибронектина, например, антителоподобной молекулы фибронектина III типа, (vii) антигенсвязывающий домен одного из указанного первого и указанного второго неприродного химерного погруженного в мембрану рецептора содержит scFv, а другой содержит нанотело, и (viii) антигенсвязывающий домен одного из

указанного первого и указанного второго неприродного химерного погруженного в мембрану рецептора содержит scFv, а другой содержит VHH-домен верблюда. В одном из вариантов осуществления указанная клетка представляет собой Т-клетку. В одном из вариантов осуществления указанная клетка представляет собой NK-клетку. В одном из вариантов осуществления указанная клетка является из линии NK-клеток, например, NK92. В одном из вариантов осуществления один из указанного первого и указанного второго неприродных химерных погруженных в мембрану рецепторов представляет собой TCAR. В одном из вариантов осуществления оба из указанного первого и указанного второго неприродных химерных погруженных в мембрану рецепторов представляют собой CAR. В одном из вариантов осуществления один указанного первого и указанного второго неприродных химерных погруженных в мембрану рецепторов представляют собой NKR-CAR, например, KIR-CAR. В одном из вариантов осуществления оба из указанного первого и указанного второго неприродных химерных погруженных в мембрану рецепторов представляют собой NKR-CAR, например, KIR-CAR. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого и указанного второго неприродного химерного погруженного в мембрану рецептора не содержит вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи. В одном из вариантов осуществления при наличии на поверхности клетки антигенсвязывающие домены указанного первого и указанного второго неприродного химерного погруженного в мембрану рецептора взаимодействуют друг с другом в меньшей степени, чем, если бы оба представляли собой антигенсвязывающие домены scFv. В одном из вариантов осуществления при наличии на поверхности клетки связывание антигенсвязывающего домена указанного первого неприродного химерного погруженного в мембрану рецептора со своим когнатным антигеном по существу не снижается в результате наличия указанного второго неприродного химерного погруженного в мембрану рецептора. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого и указанного второго неприродного химерного погруженного в мембрану рецептора содержит одиночный VH-домен,

например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса, например, фибронектина, например, антителоподобной молекулы фибронектина III типа. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого и указанного второго неприродного химерного погруженного в мембрану рецептора содержит scFv, а другой содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса, например, фибронектина, например, антителоподобной молекулы фибронектина III типа. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого и указанного второго неприродного химерного погруженного в мембрану рецептора, содержит scFv, а другой содержит нанотело. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого и указанного второго неприродного химерного погруженного в мембрану рецептора содержит scFv, а другой содержит VHH-домен верблюда. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к нуклеиновой кислоте, например, очищенной или неприродной нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность, кодирующую первый и второй неприродный химерный погруженный в мембрану рецептор, содержащий антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения клетки, описываемой в настоящем описании, включающему введение в клетку нуклеиновой кислоты, описываемой в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения клетки, описываемой в настоящем описании, включающему формирование в цитотоксической клетке первого и указанного второго неприродного химерного погруженного в мембрану рецептора, описываемого в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения индивидуума, например, способу обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, включающему введение млекопитающему

эффективного количества клетки, описываемой в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к набору, содержащему клетку или нуклеиновую кислоту, описываемые в настоящем описании.

В другом аспекте изобретение относится к выделенной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей KIR-CAR (иммуноглобулиноподобный рецептор клетки-киллера-химерный антигенный рецептор), где выделенная последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты антигенсвязывающего домена и KIR или его фрагмент. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела мыши, гуманизированного антитела, антитела человека, химерного антитела и его фрагмента. В одном из вариантов осуществления фрагмент представляет собой Fab или scFv. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, в таблице 4. В одном из вариантов осуществления KIR выбран из группы, состоящей из активирующего KIR, ингибирующего KIR и любого их сочетания. В одном из вариантов осуществления из активирующего KIR удаляли по меньшей мере одну шарнирную область.

В другом аспекте изобретение относится к выделенному KIR-CAR (иммуноглобулиноподобный рецептор клетки-киллера-химерный антигенный рецептор), содержащему антигенсвязывающий домен и KIR или его фрагмент. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен выбран из группы, состоящей из антитела мыши, гуманизированного антитела, антитела человека, химерного антитела и его фрагмента. В одном из вариантов осуществления фрагмент представляет собой Fab или scFv. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, в таблице 4. В одном из вариантов осуществления KIR выбран из группы, состоящей из активирующего KIR, ингибирующего KIR и любого их сочетания. В одном из вариантов осуществления из активирующего KIR удаляли по меньшей мере одну шарнирную

область.

В другом аспекте изобретение относится к композиции, содержащей по меньшей мере два KIR-CAR, где первый KIR-CAR содержит антигенсвязывающий домен и активирующий KIR или его фрагмент, а второй KIR-CAR содержит антигенсвязывающий домен и ингибирующий KIR или его фрагмент. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен в первом KIR-CAR является специфическим к антигену, предоставленному на опухоли, например, антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, в таблице 4, и антигенсвязывающий домен во втором KIR-CAR является специфическим к антигену, предоставленному на нормальной клетке.

В другом аспекте изобретение относится к генетически модифицированной Т-клетке, содержащей по меньшей мере два KIR-CAR, где первый KIR-CAR содержит антигенсвязывающий домен и активирующий KIR или его фрагмент, а второй KIR-CAR содержит антигенсвязывающий домен и ингибирующий KIR или его фрагмент. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен в первом KIR-CAR является специфическим к антигену, предоставленному на опухоли, например, антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, в таблице 4, и антигенсвязывающий домен во втором KIR-CAR является специфическим к антигену, предоставленному на нормальной клетке. В одном из вариантов осуществления клетка представляет собой Т-клетку.

В другом аспекте изобретение относится к способу обеспечения противоопухолевого иммунитета у млекопитающего, где способ включает введение млекопитающему эффективного количества клетки, содержащей по меньшей мере два KIR-CAR, где первый KIR-CAR содержит антигенсвязывающий домен и активирующий KIR или его фрагмент, а второй KIR-CAR содержит антигенсвязывающий домен и ингибирующий KIR или его фрагмент. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен в первом KIR-CAR является специфическим к антигену, предоставленному на опухоли, например, антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, в таблице 4, а антигенсвязывающий домен во втором KIR-

CAR является специфическим к антигену, предоставленному на нормальной клетке, таким образом, регулируя побочную активность клетки. В одном из вариантов осуществления клетка представляет собой Т-клетку.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения индивидуума, страдающего заболеванием, связанным с экспрессией опухолевого антигена, например, опухолевого антигена, описываемого в настоящем описании (например, пролиферативным заболеванием, предраковым состоянием и не связанным со злокачественной опухолью показанием, ассоциированным с экспрессией опухолевого антигена), включающему введение млекопитающему эффективного количества клетки, содержащей по меньшей мере два KIR-CAR, где первый KIR-CAR содержит антигенсвязывающий домен и активирующий KIR или его фрагмент, а второй KIR-CAR содержит антигенсвязывающий домен и ингибирующий KIR или его фрагмент. В одном из вариантов осуществления первый KIR-CAR содержит антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, в таблице 4.

В одном из вариантов осуществления заболевание, связанное с экспрессией опухолевого антигена, представляет собой злокачественную опухоль, например, злокачественную опухоль, описываемую в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль, например, солидную опухоль, описываемую в настоящем описании, например, мезотелиому (например, злокачественную мезотелиому плевры), рак легких (например, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, плоскоклеточный рак легких или крупноклеточный рак легких), рак поджелудочной железы (например, протоковую аденокарциному поджелудочной железы), рак яичника, колоректальный рак и рак мочевого пузыря или любое их сочетание. В одном из вариантов осуществления заболевание представляет собой рак поджелудочной железы, например, метастатическую протоковую аденокарциному поджелудочной железы (PDA), например, у индивидуума у которого наблюдали прогрессирование заболевания по меньшей мере во время одной предшествующей стандартной терапии. В одном из вариантов

осуществления заболевание представляет собой мезотелиому (например, злокачественную мезотелиому плевры), например, у индивидуума у которого наблюдали прогрессирование заболевания по меньшей мере во время одной предшествующей стандартной терапии. В одном из вариантов осуществления заболевание представляет собой рак яичника, например, злокачественную серозную эпителиальную опухоль яичника, например, у индивидуума, у которого наблюдали прогрессирование заболевания по меньшей мере после одной предшествующей схемы лечения стандартной терапии.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, как общепринято понимает специалист в данной области, к которой принадлежит данное изобретение. Несмотря на то, что в практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно использовать способы и вещества, аналогичные или эквивалентные тем, которые описывают в настоящем описании, подходящие способы и вещества описаны ниже. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, указываемые в настоящем описании, полностью включены посредством ссылки. Кроме того, вещества, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены являться ограничивающими. Заголовки, подзаголовки или пронумерованные или обозначаемые буквами элементы, например, (a), (b), (i) и т.д., приведены только для простоты чтения. Использование заголовков или пронумерованных или обозначаемых буквами элементов в этом документе не накладывает обязательств того, чтобы этапы или элементы проводили в алфавитном порядке, или чтобы этапы или элементы обязательно следовали один за другим.

Другие признаки, объекты и преимущества изобретения будут понятны из описания и чертежей, и из формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Следующее ниже подробное описание предпочтительных вариантов осуществления изобретения будет лучше понятно при прочтении в сочетании с прилагаемыми чертежами. С целью иллюстрации изобретения на чертежах продемонстрированы варианты осуществления, которые являются в настоящее время

предпочтительными. Однако следует понимать, что изобретение не ограничено точными расположениями и техническими средствами вариантов осуществления, приведенных на чертежах.

Фигура 1, содержащая фигуры 1A и 1B, представляет собой серию схем, демонстрирующих структуру природных ингибирующих и активирующих KIR (фигура 1A) и активирующих KIR-CAR на основе scFv (фигура 1B).

Фигура 2 представляет собой схематическое представление лентивирусного вектора, используемого для доставки активирующего CAR на основе KIR в комбинации с сигнальной молекулой DAP12.

Фигура 3 представляет собой изображение, демонстрирующее, что специфические к мезотелину actKIR-CAR можно эффективно экспрессировать на поверхности первичных Т-клеток человека. Т-клетки человека стимулировали микрогарнулами с антителами против CD3/CD28 и трансдуцировали указанным CAR или имитировали трансдукцию и размножали *ex vivo*. Экспрессию детектировали с использованием биотинилированного поликлонального IgG козы специфического к F(ab)2 мыши (Jackson Immunologics) с последующим окрашиванием стрептавидином-PE.

На фигуре 4 продемонстрировано, что Т-клетки, экспрессирующие SS1 actKIR-CAR, обладали цитотоксической активностью по отношению к клеткам-мишеням K562, сконструированным так, чтобы экспрессировать лиганд мезотелин (KT-meso). Т-клетки человека стимулировали микрогранулами с антителами против CD3/CD28, трансдуцировали указанным CAR или имитировали трансдукцию и размножали *ex vivo*. 10^5 меченных CFSE клеток K562, экспрессирующих мезотелин (KT-meso), или контроль K562 дикого типа инкубировали с экспрессирующими CAR Т-клетками в различных отношениях в течение 16 часов при 37°C, 5% CO_2. Затем определяли количество клеток-мишеней K562 проточной цитометрией с использованием гранул CountBright и окрашивания жизнеспособных клеток (7AAD). Процентное содержание лизированных клеток K562 (процент лизиса) рассчитывали путем вычитания числа жизнеспособных клеток-мишеней, остающихся после инкубации с эффекторными Т-клетками, из числа жизнеспособных K562,

остающихся после культивирования в течение ночи без эффекторных Т-клеток, а затем делили на число жизнеспособных K562. остающихся после культивирования в течение ночи без эффекторных Т-клеток.

Фигура 5, содержащая фигуру 5A и 5B, представляет собой серию схем, демонстрирующих активирующий KIR-CAR, в котором удаляли шарнир KIR2DS2 (KIR2S CAR). На основании кинетической модели сегрегации активации TCR, представленной на диаграммах на фигуре 5A, полагают, что специфический к мезотелину KIR-CAR SS1 содержит шарнир, который является слишком длинным для обеспечения подходящей сегрегации. Таким образом, полагают, что делая шарнир специфического к мезотелину KIR-CAR более коротким, можно улучшать функцию. Фигура 5B представляет собой схему, демонстрирующую, что scFv SS1 сливали с трансмембранным доменом KIR без двух Ig-подобных доменов из KIR2DS2 в качестве шарнира.

Фигура 6, содержащая фигуры 6A и 6B, представляет собой серию изображений, демонстрирующих, что KIRS2-CAR на основе scFv SS1 обладает повышенной цитолитической активностью по отношению к экспрессирующим мезотелин клеткам-мишеням по сравнению с CAR, образуемых слиянием scFv SS1 в полноразмерный KIR2DS2 дикого типа. Первичные Т-клетки человека стимулировали микрогранулами CD3/28 с последующей трансдукцией лентивирусом активирующим KIR-CAR SS1-KIR2DS2, активирующим KIR CAR SS1-KIRS2, CAR SS1-дзета. В качестве контроля использовали модельные нетрансдуцированные Т-клетки (NTD). Т-клетки размножали до конца фазы логарифмического роста. Экспрессию на поверхности специфических к SS1 CAR определяли проточной цитометрией с использованием биотинилированного поликлонального антитела коза, специфического к F(ab)2 мыши, с последующей детекцией с использованием стрептавидина-PE, как приведено на фигуре 6A. На фигуре 6B продемонстрировано, что клетки-мишени K562 с мезотелином или без него и окрашенные CFSE, смешивали с эффекторными Т-клетками, охарактеризованными на фигуре 6A, как указано с использованием различных отношений эффекторная Т-клетка к мишени в диапазоне от 10:1 до 1:1. Лизис клеток-мишеней K562 оценивали с использованием проточной цитометрии для определения %

жизнеспособных CFSE+ клеток, как описано для фигуры 4. Представленные данные представляют собой рассчитываемый % лизиса клеток-мишеней по сравнению с клетками-мишенями без эффекторных клеток.

Фигура 7, содержащая фигуры 7A и 7B, представляет собой серию изображений, демонстрирующих коэкспрессию actKIR-CAR CD19 и inhKIR-CAR SS1. Клетки Jurkat с репортерным геном NFAT-GFP трансдуцировали указанным KIR CAR или не трансдуцировали (NDT) и смешивали 1:1 с клетками-мишенями с антигенами CD19 и мезотелин или без них, как. Результаты демонстрируют экспрессию GFP через 24 часа после смешивания клеток Jurkat и клеток-мишеней (фигура 7A). На фигуре 7B продемонстрирована экспрессия на поверхности идиотипов мезотелина и CD19, как определяют посредством окрашивания слитым белком мезотелин-Fc и моноклональным антителом, специфическим к идиотипу scFv FMC63 против CD19.

Фигура 8, содержащая фигуры 8A, 8B и 8C, представляет собой серию изображений, демонстрирующих коэкспрессия PD-1 дикого типа с активирующими CAR на основе KIR или CAR на основе TCR-дзета, направленных на мезотелин. Первичные Т-клетки человека стимулировали микрогранулами CD3/28 с последующей трансдукцией лентивирусом активирующим KIR-CAR SS1-KIRS2 или CAR SS1-дзета. В качестве отрицательного контроля использовали модельные нетрансдуцированные клетки (NTD). Т-клетки размножали в течение 9 суток и определяли экспрессию на поверхности CAR окрашиванием мезотелином-Fc с последующим окрашиванием специфическим к Fc человека антителом козы, конъюгированным с PE (фигура 8A). Линии клеток K562 (дикого типа [wt], экспрессирующих мезотелин [meso] или коэкпрессирующих мезотелин и PD-L1 [meso-PDL1]) окрашивали с использованием специфического к CAK1 мезотелину моноклонального антитела для подтверждения экспрессии мезотелина на мишенях (фигура 8B). Первичные Т-клетки человека, трансдуцированные, как продемонстрировано на фигуре 8A, электропорировали 10 мкг транскрибируемой *in vitro* РНК, кодирующей PD1 дикого типа, с использованием устройства для электропорации BTX ECM830 (PD1+) или имитировали трансфекцию (PD1-). Экспрессию на поверхности PD-1 выявляли с использованием моноклонального антитела против

PD1, конъюгированного с APC (фигура 8C).

Фигура 9 представляет собой изображение, демонстрирующее, что сочетание коэкспрессии PD-1 дикого типа с активирующим CAR на основе KIR и CAR на основе TCR-дзета, направленными на мезотелин, приводила к зависимому от лиганда 1 PD-1 (PDL-1) ингибированию цитотоксичности специфических к мезотелину активирующих KIR-CAR. Первичные Т-клетки человека стимулировали микрогранулами CD3/28 с последующей трансдукцией лентивирусом активирующим KIR-CAR SS1-KIRS2, CAR SS1-дзета или имитировали трансдукцию (NTD). Т-клетки размножали в течение 9 суток с последующей электропорацией 5×10^6 Т-клеток 10 мкг транскрибируемой *in vitro* РНК, кодирующей PD1 дикого типа с использованием устройства для электропорации BTX ECM830 (PD1+) или имитировали трансфекцию (PD1-). Экспрессию на поверхности специфического к SS1 CAR и PD-1 определяли, как продемонстрировано на фигуре 8. Клетки-мишени K562, не экспрессирующие мезотелин или экспрессирующие мезотелин с PDL-1 или без него, смешивали в различных условиях с Т-клетками, как указано, с использованием различных отношений эффекторная Т-клетка к мишени от 30:1 до 1:1, как продемонстрировано. Лизис клеток-мишеней K562 оценивали способом окрашивания кальцеином AM для количественного определения оставшихся жизнеспособных клеток после 4 часов инкубации. Представленные данные представляет собой рассчитываемый % лизиса клеток-мишеней в сравнении с клетккми-мишенями без эффекторных клеток.

Фигура 10 представляет собой изображение, демонстрирующее продукцию интерферона-гамма (IFN-γ) и интерлейкина 2 Т-клетками от донора, экспрессирующими специфический к мезотелину активирующий CAR на основе KIR (SS1-KIRS2) или CAR на основе TCR-дзета с костимулирующим доменом (SS1-z, SS1-28z или SS1-BBz) или без него. Первичные Т-клетки человека стимулировали с последующей трансдукцией лентивирусом указанным активирующим KIR-CAR или CAR на основе TCR-дзета. После размножения трансдуцированные Т-клетки смешивали с K562 (Kwt) или K562-мезотелин клетками (Kmeso) в отношении 2:1. Определяли

концентрации цитокина в супернатантах после 24 часов стимуляции посредством ELISA для указанных цитокинов у многих независимых доноров. Повторное измерение ANOVA демонстрировало достоверный эффект CAR на IFN-γ (p=0,002) и IL-2 (p=0,0156). SS1-KIRS2/DAP12 (SS1KIR) в сравнении с имитацией для IFN-γ (апостериорный парный t-критерий, p=0,0162). SS1-KIR в сравнении с SS1-28z для IL-2 (апостериорный парный t-критерий, p=0,0408).

Фигура 11 представляет собой карту интенсивности концентраций цитокинов в супернатантах, как оценивают мультиплексным иммунологическим анализом на основе Luminex (Cytokine Human 10-Plex Panel, Life Technologies). Получали карта интенсивности относительной концентрации после нормализации донора и условий на наименьшую концентрацию для каждого цитокина с использованием реализации пакета программ heatmap в программном обеспечении R для статистического анализа.

На фигуре 12, содержащей фигуры 12A-12B, проиллюстрирована конструкция сконструированной Т-клетки со специфическим к мезотелину химерным антигенным рецептором на основе KIR (KIR-CAR) с устойчивой цитотоксической активностью. Первичные Т-клетки человека стимулировали микрогранулами CD3/28 с последующей трансдукцией лентивирусным вектором, экспрессирующим GFP и dsRed (контроль) или DAP12 и dsRed (DAP12). Клетки размножали *ex vivo* до конца фазы логарифмического роста. 5×10^6 Т-клеток из каждой трансдуцированной популяции электропорировали 10 мкг транскрибируемой *in vitro* РНК, кодирующей SS1-KIRS2, с использованием устройства для электропорации BTX ECM830 (PD1+). Экспрессию dsRed и SS1-KIRS2 оценивали проточной цитометрией, где SS1-KIRS2 детектировали с использованием биотинилированного поликлонального антитела коза специфического к F(ab)2 мыши с последующим стрептавидином-PE. На верхней панели фигуры 12A продемонстрирована стратегия установки дискриминационного окна для идентификации Т-клеток, экспрессирующих dsRed, которые затем анализировали на экспрессию SS1-KIRS2, как продемонстрировано на нижней части панели. На фигуре 12B продемонстрирована способность клеток, охарактеризованных на фигуре 12A,

опосредовать цитотоксичность против клеток K562 дикого типа (K562-wt) или клеток K562, которые экспрессируют мезотелин (K562-мезотелин), как оценивают с использованием анализа высвобождения ^{51}Cr в течение 4 часов.

На фигуре 13 представлено, что на экспрессию эндогенного TCR не оказывала влияния экспрессия SS1-KIRS2 и DAP12. 5×10^6 первичных Т-клеток человека электропорировали 10 мкг транскрибируемой *in vitro* РНК, кодирующей SS1-KIRS2, или имитировали трансфекцию с использованием устройства для электропорации BTX ECM830 (PD1+). После инкубации в течение ночи трансфицированные Т-клетки окрашивали на экспрессию SS1-KIRS2 с использованием биотинилированного поликлонального антитела козы, специфического к F(ab)2 мыши, с последующим окрашиванием стрептавидином-PE. Экспрессию Vβ13.1 оценивали с использованием конъюгированного с PE моноклонального антитела, специфического к такой Vβ-цепи TCR.

На фигуре 14 проиллюстрирована способность специфического к мезотелину CAR на основе KIR (SS1-KIRS2) стимулировать пролиферацию Т клеток, которая является антигензависимой, но не зависит от дополнительной костимуляции CD28. Первичные Т-клетки человека стимулировали микрогранулами CD3/28 с последующей трансдукцией лентивирусом SS1-KIRS2 и DAP12 или специфическим к мезотелину CAR TCR-дзета (SS1-дзета). В качестве отрицательного контроля использовали нетрансдуцированные клетки в условиях имитации (NTD). Клетки-мишени K562 без мезотелина (K562 wt), или экспрессирующие мезотелин (K562-мезотелин), смешивали в различных состояниях с Т-клетками, как указано, в отношении эффекторные Т-клетки к клеткам-мишеням 2:1. Т-клетки, стимулированные K562-мезотелином, дополнительно разделяли в зависимости от состояния моноклональным антителом-агонистом против CD28 или без него (клон 9.3) при 1 мкг/мл. Для подсчета числа удвоений популяции после стимуляции антигеном определяли число жизнеспособных Т-клеток проточной цитометрией с использованием подсчета на основе гранул в указанные моменты времени.

На фигуре 15, содержащей фигуры 15A, 15B, 15C, 15D и 15E, продемонстрировано, что модифицированные специфическим к мезотелину KIR-CAR Т-клетки обладают повышенной противоопухолевой активностью *in vivo* по сравнению со вторым поколением CAR на основе TCR-ζ, несущими CD28 или CD137 (4-1BB) костимулирующие домены. На фигуре 15A представлен эксперимент, в котором мышам NOD-SCID-$\gamma_c^{-/-}$ (NSG) подкожно имплантировали 2×10^6 получаемых из мезотелиомы клеток, экспрессирующих мезотелин (клетки EM-meso). Через 20 суток после имплантации опухоли каждому животному инъецировали внутривенно 5×10^6 Т-клеток, которые стимулировали стимулирующими гранулами с антителами против CD3/CD28 после лентивирусной трансдукции серией CAR на основе CD3z с костимулирующий доменом (SS1-z, SS1-BBz и SS1-28z) или без него или специфическими к мезотелину CAR на основе KIR, SS1-KIRS2 с DAP12. В качестве контроля использовали трансдуцированные в условиях имитации Т-клетки (NTD). Объем опухоли измеряли посредством циркуля в указанные моменты времени (n=7 мышей в группе). На фигуре 15B продемонстрировано, что активность *in vivo* KIR-CAR не зависит от приживления Т-клеток в крови, селезенке или опухоли. Частоту CD45+ Т-клеток человека оценивали в конце эксперимента посредством проточной цитометрии, и данные выражают в процентах от общего числа жизнеспособных клеток в крови, селезенке и продукте расщепления опухоли. На фигуре 15C продемонстрировано, что сопоставимые частоты CD3+ TIL наблюдали в группах, обрабатываемых CAR Т-клетками SS1-28z и SS1-KIRS2/DAP12. Использовали такую же модель, как представлена на фигуре 15A. Частоту CD3+ лимфоцитов человека в опухолях на сутки 30 (через 10 суток после инфузии CART) оценивали проточной цитометрией. На фигуре 15D продемонстрировано, что для эрадакации опухоли модифицированными DAP12 Т-клетками необходимым является специфический к мезотелину CAR на основе KIR. Использовали такую же модель, как представлена на фигуре 15A. 4 миллиона Т-клеток, экспрессирующих DAP12 и dsRed (DAP12), SS1-28z или SS1-KIRS2 и DAP12 (SS1-KIRS2), инъецировали внутривенно на сутки 20, и оценивали объем опухоли в течение

длительного времени посредством измерения циркулем. Стрелка указывает на время выделения TIL, используемого для функционального и фенотипического анализа. На фигуре 15E продемонстрирована антигенспецифическая цитотоксическая активность TIL, выделяемых у мышей, описанных в фигура 15D. Антигенспецифическую цитотоксичность оценивали посредством совместного культивирования с экспрессирующими люциферазу светляков клетками EM-meso или клетками EMp (исходными клетками EM без экспрессии мезотелина) в указанных отношениях E:T в течение 18 часов.

На фигуре 16, содержащей фигуры 16A и 16B, продемонстрирован CAR на основе KIR, где специфичность CD19 может индуцировать антигенспецифическую цитотоксичность по отношению к клетке-мишени. После активации гранулами с антителами против CD3/CD28 T-клетки трансдуцировали бицистронным лентивирусным вектором, экспрессирующим DAP12 на ряду со специфическим к CD19 CAR на основе KIR, в котором получаемый из FMC63 scFv является слитым с полноразмерным KIR2DS2 (CD19-KIR2DS2), или CAR на основе KIR, получаемым слиянием scFv FMC63 с трансмембранным и цитоплазматическим доменом KIR2DS2 через короткий линкер $[Gly]_4$-Ser (CD19-KIRS2). Трансдуцированные T-клетки культивировали до конца фазы логарифмического роста и оценивали экспрессию специфических к CD19 CAR на основе KIR проточной цитометрией с использованием биотинилированного поликлонального антитела козы против $F(ab)_2$ мыши с последующим SA-PE. Меченные ^{51}Cr клетки-мишени K562 с экспрессией CD19 (K562-CD19) или без нее (K562-wt) смешивали в различных отношениях T-клеток к клеткам-мишеням (отношение E:T). Цитотоксичность определяли измерением фракции высвобождаемого ^{51}Cr в супернатант в течение 4 часов. Контрольные T-клетки, которые трансдуцировали в условиях имитации (NTD) или трансдуцировали специфическим к CD19 (CD19-z) CAR на основе CD3z, также включали в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно.

На фигуре 17, содержащей фигуры 17A и 17B, продемонстрирована активность CD19-KIRS2 *in vivo*. Мышам NOD-

SCID-$\gamma_c^{-/-}$(NSG) трансплантировали внутривенно посредством инъекции в хвостовую вену на сутки 0 1 миллион опухолевых клеток Nalm-6 CBG, линии лейкозных клеток, экспрессирующих CD19. Т-клетки стимулировали стимулирующими гранулами с антителам против CD3/CD28 с последующей трансдукцией лентивирусом на сутки 1 с серий специфических к CD19 CAR на основе CD3z с костимулирующим доменом (CD19z, 19BBz) или без него или специфическими к CD19 CAR на основе KIR, CD19-KIRS2 с DAP12 (19KIRS2). В качестве контроля использовали нетрансдуцированные в условиях имитации Т-клетки (NTD). Т-клетки размножали до конца фазы логарифмического роста *ex vivo* и инъецировали внутривенно на сутки 5 после инъекции линии лейкозных клеток 2 миллиона CAR Т-клеток на мышь. Опухолевую нагрузку оценивали посредством биолюминесцентной визуализации. Для каждого условия Т-клеток анализировали 5 животных. На фигуре 17A представлен индивидуальный биолюминесцентный фотонный поток для отдельных животных на сутки 5 (исходный уровень до инъекции Т-клеток) и на сутки 15 после трансплантации лейкозных клеток. На фигуре 17B представлен средний общий поток для каждой группы обработки в течение времени.

На фигуре 18 продемонстрировано, что NCR-CAR на основе NKp46 со специфичностью к мезотелину индуцирует антигенспецифическую цитотоксичность. После активации гранулами с антителами против CD3/CD28 Т-клетки трансдуцировали бицистронным лентивирусным вектором, экспрессирующим DAP12 и SS1-KIRS2 (контроль), или FcεRγ и специфический к мезотелину CAR на основе NKp46 (SS1-NKp46) или FcεRγ, и специфический к мезотелину CAR NKp46, в котором природный внеклеточный домен NKp46 являлся усеченным (SS1-TNKp46). Экспрессию специфических к мезотелину CAR оценивали проточной цитометрией с использованием биотинилированного поликлонального антитела козы против F(ab)2 мыши с последующим SA-PE, как продемонстрировано на фигуре 18A. Т-клетки смешивали с меченными ^{51}Cr клетками-мишенями K562, экспрессирующими мезотелин в различных отношениях эффекторных Т-клеток к клеткам-мишеням K562 (отношение E:T). Цитотоксичность

определяли измерением фракции ^{51}Cr. высвобождающегося в супернатант в течение 4 часов по сравнению со спонтанным высвобождением, как продемонстрировано на фигуре 18B.

На фигуре 19 приведено схематическое представление рецепторов, используемых в экспериментах, продемонстрированных на фигурах 21-23.

На фигуре 20 продемонстрировано получение и характеризация линии клеток K562-meso, которые экспрессируют KIR2DL3 лиганд HLA-Cw. Клетки K562 (K562) или клетки K562, экспрессирующие мезотелин (K562-meso), трансдуцировали аллелем HLA-Cw3 с последующей активируемой флуоресценцией сортировкой клеток с получением клеток K562, экспрессирующих HLA-Cw с экспрессией мезотелина (K562-meso-HLACw) или без нее (K562-HLACw). Экспрессию HLA-Cw3 оценивали проточной цитометрией с использованием конъюгированного с APC моноклонального антитела, которое распознает аллели HLA-A, B и C (клон W6/32).

На фигуре 21 продемонстрирована коэкспрессия SS1-KIRS2 и KIR2DL3 первичными T-клетками человека. Первичные T-клетки человека стимулировали микрогранулами CD3/28 с последующей трансдукцией лентивирусом с SS1-KIRS2 и DAP12 (SS1-KIRS2) или трансдукцией в условиях имитации (NTD) в комбинации с KIR2DL3 дикого типа. T-клетки размножали до конца фазы логарифмического роста. Экспрессию на поверхности специфического к мезотелину CAR и KIR2DL3 определяли посредством окрашивания мезотелином-Fc с последующими конъюгированным с PE антителом козы против Fc человека Fc и моноклональным антителом к эктодомену KIR2DL3.

На фигуре 22 продемонстрировано, что KIR2DL3, экспрессируемый совместно с KIR-CAR, может подавлять антигенспецифическую цитотоксичность в присутствии HLA-Cw на клетках-мишенях. T-клетка, которую получали и характеризовали, как описано на фигуре 21, смешивали с меченными ^{51}Cr клетками-мишенями K562, которые получали и характеризовали, как описано на фигуре 22. Цитотоксичность определяли измерением фракции ^{51}Cr, высвобождаемой в супернатант в течение 4 часов, по сравнению с клетками-мишенями без эффекторных клеток.

На фигуре 23 приведено схематическое представление

рецепторов, используемых в экспериментах, продемонстрированных на фигуре 24.

На фигуре 24 продемонстрирована невозможность коэкспрессировать два химерных рецептора на основе scFv на поверхности Т-клетки при сохранении соответствующей специфичности связывания каждого рецептора. Т-клетки Jurkat трансдуцировали с использованием лентивирусного вектора, кодирующего SS1-KIR2DL3. Затем эти клетки трансдуцировали вторым лентивирусным вектором, кодирующим CD19-KIR2DS2, при различных разведениях вектора. Экспрессию специфического к SS1 scFv оценивали с использованием мезотелина-Fc с последующим конъюгированным с PE антителом козы против Fc человека. Экспрессию специфического к CD19 scFv оценивали с использованием конъюгированного с PE моноклонального антитела, специфического к идиотипу FMC63.

Фигура 25 представляет собой изображения, демонстрирующие, что экспрессия специфического к CD19 CAR также снижала экспрессию участков связывания мезотелина на поверхности клеток, коэкспрессирующих слияние SS1-дзета-mCherry CAR. Первичные Т-клетки человека стимулировали микрогранулами CD3/28 с последующей трансдукцией лентивирусом с CAR scFv SS1-дзета, несущим слияние mCherry на С-конце, (SS1z-mCh) или CAR специфическим к CD19, получаемому из FMC63, 41BB-дзета (19bbz) отдельно или в комбинации. Трансдуцированные в режиме имитации клетки использовали в качестве контроля. Т-клетки размножали до конца фазы логарифмического роста, и определяли экспрессию dsRed а также CAR на поверхности проточной цитометрией после окрашивания мезотелином-Fc с последующим окрашиванием специфическим к Fc человека поликлональным антителом коза, конъюгированным с FITC.

Фигура 26 представляет собой изображения, демонстрирующие, что взаимоисключающая экспрессия участков связывания scFv SS1 не является уникальной для FMC63 scFv. Первичные Т-клетки человека стимулировали микрогранулами CD3/28 с последующей трансдукцией лентивирусом с CAR scFv SS1-дзета или различными специфическими к CD19 с CAR 41BB-дзета (19BBz [CARFMC63 scFv, 214d scFv или

BL22 scFv с переменными ориентациями VH и VL [H2 л и L2H]). NTD представляют собой трансдуцированные в условиях имитации клетки, используемые в качестве контроля окрашивания. Кроме того, отдельную группу Т-клеток трансдуцировали совместно CAR scFv SS1-дзета и различными специфическими к CD19 CAR, как указано выше. Т-клетки размножали до конца фазы логарифмического роста и определяли экспрессию CAR на поверхности посредством окрашивания биотинилированным белком L (распознающим легкую каппу-цепь) с последующим окрашиванием стрептавидином APC одновременно с мезотелином-Fc с последующим специфическим к Fc человека поликлональным антителом козы, конъюгированным с PE. Для совместно трансдуцированных клеток демонстрировали, что взаимоисключающую экспрессию, наблюдаемую для CAR на основе FMC63, также наблюдают с другими scFv-CAR.

На фигуре 27, содержащей фигуры 27A и 27B, проиллюстрирован возможный механизм утраты связывания scFv, когда две молекулы scFv коэкспрессируются на клеточной поверхности (фигура 27A) и возможное недопущение такого взаимодействия, когда CAR на основе одиночного домена VHH верблюда экспрессируют на поверхности Т-клеток в комбинации с CAR на основе scFv.

На фигуре 28 продемонстрировано, что CAR на основе одиночного домена VHH верблюда можно экспрессировать на поверхности Т-клеток в комбинации с CAR на основе scFv без заметного взаимодействия рецепторов. Т-клетки Jurkat, экспрессирующие GFP под контролем NFAT-зависимого промотора (NF-GFP), трансдуцировали специфическим к мезотелину активирующим CAR (SS1-CAR), специфическим к CD19 активирующим (19-CAR) или CAR, получаемым с использованием VHH-домена верблюда, специфического к EGFR (VHH-CAR). Затем после трансдукции активирующим CAR клетки трансдуцировали дополнительным ингибирующим CAR, распознающим CD19 (19-PD1), с получением клеток, экспрессирующих совместно активирующий и ингибирующий CAR (SS1+19PD1, 19+19PD1 или VHH+19PD1). Трансдуцированные Т-клетки Jurkat культивировали в течение 24 часов совместно с различными линиями клеток, которые 1) не содержат какие-либо антигены-мишени (K562), 2) экспрессируют мезотелин (K-meso),

CD19 (K-19) или только EGFR (A431), 3) экспрессируют комбинацию EGFR и мезотелина (A431-мезотелин) или CD19 (A431-CD19) или 4) экспрессируют комбинацию CD19 и мезотелина (K-19/meso). Дополнительные условия, которые включают отсутствие стимулирующих клеток (no stim) или K562 с 1 мкг/мл OKT3 (OKT3), также включали в качестве отрицательных и положительных контролей для активации NFAT, соответственно. Экспрессию GFP в качестве маркера активации NFAT оценивали проточной цитометрией.

На фигуре 29 представлена KIR2DS2 аннотация последовательности. Нуклеотидную последовательность, предоставленную на фигуре 29, обозначают SEQ ID NO: 342. Аминокислотную последовательность, предоставленную на на фигуре 29, обозначают SEQ ID NO: 343.

На фигуре 30 представлена аннотация последовательности KIR2DL3. Нуклеотидную последовательность, предоставленную на фигуре 30, обозначают SEQ ID NO: 344. Аминокислотную последовательность, предоставленную на фигуре 30, обозначают SEQ ID NO: 345.

На фигуре 31 представлен а NKp46 аннотация последовательности. Нуклеотидную последовательность, предоставленную на фигуре 31 обозначают SEQ ID NO: 346. Аминокислотную последовательность, предоставленную на фигуре 31 обозначают SEQ ID NO: 347.

На фигуре 32 представлена аннотация последовательности SS1-KIRS2. Нуклеотидную последовательность, предоставленную на фигуре 32, обозначают SEQ ID NO: 348. Аминокислотную последовательность, предоставленную на фигуре 32, обозначают SEQ ID NO: 349.

На фигуре 33 представлена аннотация последовательности SS1-KIR2DS2. Нуклеотидную последовательность, предоставленную на фигуре 33, обозначают SEQ ID NO: 350. Аминокислотную последовательность, предоставленную на фигуре 33, обозначают SEQ ID NO: 351.

На фигуре 34 представлена аннотация последовательности SS1-tNKp46. Нуклеотидную последовательность, предоставленную на фигуре 34, обозначают SEQ ID NO: 352. Аминокислотную

последовательность, предоставленную на фигуре 34, обозначают SEQ ID NO: 353.

На фигуре 35 представлена аннотация последовательности SS1-KIRL3. Нуклеотидную последовательность, предоставленную на фигуре 35, обозначают SEQ ID NO: 354. Аминокислотную последовательность, предоставленную на фигуре 35, обозначают SEQ ID NO: 355.

На фигуре 36 продемонстрировано, что специфический к мезотелину CAR на основе CD3ζ и CAR на основе KIR обладают аналогичной антигенспецифической цитотоксичностью *in vitro* по отношению к получаемым из мезотелиомы клеткам, экспрессирующим мезотелин (клетки EM-meso). Первичные Т-клетки человека стимулировали стимулирующими гранулами с антителами против CD3/CD28 и трансдуцировали лентивирусным вектором, экспрессирующим специфические к мезотелину CAR SS1-KIRS2. После размножения Т-клетки смешивали с меченными ^{51}Cr клетками K562, экспрессирующими EM-meso в указанно отношении эффектора к мишени (E:T). Определяли % лизиса.

На фигуре 37 продемонстрировано, что TIL от мышей, которых обрабатывали CART 28ζ, теряли секрецию IFNγ, при стимуляции получаемыми из мезотелиомы клетками, экспрессирующими мезотелин (клетками EM-meso). Мышам NOD-SCID-γc-/- (NSG) инъецировали подкожно 2×10^6 клеток EM-meso. 5×10^6 первичных Т-клеток человека, трансдуцированных указанными CAR, инъецировали в/в на сутки 16. Через 18 суток после инфузии CAR Т-клеток выделяли TIL с магнитными гранулами CD45 и смешивали с EM-meso в указанном отношении эффектора к мишени (E:T). В супернатантах определяли концентрации цитокинов посредством ELISA.

На фигуре 38 продемонстрировано, что Т-клетки SS1-KIRS2/DAP12 опосредуют устойчивую противоопухолевую активность *in vivo*. Мышам NOD-SCID-γc-/- (NSG) инъецировали подкожно 2×10^6 получаемых из мезотелиомы клеток, экспрессирующих мезотелин (клетки EM-meso). 5×10^6 первичных Т-клеток человека, трансдуцированных указанным CAR, инъецировали в/в на сутки 20. Объем опухоли измеряли посредством циркуля в указанные моменты

времени.

Фигура 39, содержащая фигуры 39A, 39B и 39C, представляет собой схему, демонстрирующую структуру специфических к мезотелину CAR. На фигуре 39A представлен специфический к мезотелину многоцепочечный KIR-CAR. НА фигуре 39B представлен специфический к мезотелину одноцепочечный KIR-CAR, содержащий DAP12. На фигуре 39C представлен специфический к мезотелину CAR, содержащий сигнальные домены CD28 и CD3-дзета.

На фигуре 40 представлена противоопухолевая активность *in vivo* конструкций CAR на основе мезотелина, включая конструкции многоцепочечного KIRS/DAP12 и одноцепочечного DAP12.

На фигурах 41A-41F представлена экспрессия на поверхности KIR-CAR на основе мезотелина на первичных Т-клетках человека, как детектируют анализом проточной цитометрии.

На фигуре 42, содержащая фигуры 42A и 42B, продемонстрирована антигенспецифическая цитотоксическая активность KIR-CAR на основе мезотелина по отношению к клеткам-мишеням, которые не экспрессируют мезотелин (K562) (фиг. 42A) или клеткам-мишеням, сконструированным так, чтобы экспрессировать мезотелин (K562-meso) (фиг. 42B).

На фигуре 43, содержащей фигуры 43A и 43B, продемонстрирована продукция цитокинов KIR-CAR на основе мезотелина при культивировании в присутствии экспрессирующих мезотелин клеток-мишеней (K562-meso, черные столбики) или контрольных клеток-мишеней, которые не экспрессируют мезотелин (K562, прозрачные столбики). На фигуре 43A продемонстрирована продукция IFN-гамма; на фигуре 43B продемонстрирована продукция цитокина IL-2.

На фигуре 44, содержащей фигуры 44A, 44B, 44C, 44D и 44E, представлены различные конфигурации единичного вектора, например, где кшРНК под контролем U6 находится выше или ниже кодирующие CAR элементы под контролем EF1-альфа. В иллюстративных структурах, представленных на фиг. 44A и 44B, транскрипция опосредована промоторами U6 и EF1-альфа в одном и том же направлении. В иллюстративных структурах, представленных на фиг. 51C и 51D, транскрипция опосредована промоторами U6 и

EF1-альфа в различных направлениях. На фигуре 44E кшРНК (и соответствующий промотор U6) находится в первом векторе и CAR (и соответствующий промотор EF1-альфа) находится во втором векторе.

На фигуре 45 проиллюстрированы структуры двух иллюстративных конфигураций RCAR. Антигенсвязывающие элементы включают антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и переключающий домен. Внутриклеточные связывающие элементы включают переключающий домен, костимулирующий сигнальный домен и первичный сигнальный домен. Две конфигурации демонстрируют, что первый и второй переключающие домены, описываемые в настоящем описании, могут находиться в различных ориентациях по отношению к антигенсвязывающему элементу и внутриклеточному связывающему элементу. Другие конфигурации RCAR дополнительно описаны в настоящем описании.

На фигуре 46 продемонстрировано, что пролиферацию экспрессирующих CAR трансдуцированных Т-клеток повышают низкие дозы RAD001 в системе клеточных культур. CART культивируют совместно с клетками Nalm-6 в присутствии различных концентраций RAD001. Число CAR-положительных, CD3-положительных Т-клеток (черные) и общих Т-клеток (серые) оценивали через 4 суток совместного культивирования.

На фигуре 47 проиллюстрированы измерения роста опухоли клеток NALM6-luc при ежесуточном дозировании RAD001 при 0,3, 1, 3 и 10 мг/кг (мг на кг массы) или дозировании носителя. Кружки означают носитель; квадраты означают дозу 10 мг/кг RAD001; треугольники означают дозу 3 мг/кг RAD001, перевернутые треугольники означают дозу 1 мг/кг RAD001, и ромбы означают дозу 0,3 мг/кг RAD001.

На фигуре 48, содержащей фигуры 48A и 48B, представлены фармакокинетические кривые, демонстрирующие количество RAD001 в крови мышей NSG с опухолями NALM6. На фиг. 55A представлены PK на сутки 0 после первой дозы RAD001. На фиг. 48B представлены PK на сутки 14 после последней дозы RAD001. Ромбы означают дозу 10 мг/кг RAD001; квадраты означают дозу 1 мг/кг RAD001; треугольники означают дозу 3 мг/кг RAD001, и x означают дозу 10 мг/кг RAD001.

На фигуре 49, содержащей фигуры 49A и 49B, представлена пролиферация *in vivo* гуманизированных клеток CD19 CART при дозировании RAD001 и без него. Низкие дозы RAD001 (0,003 мг/кг) каждые сутки приводят к повышению пролиферации Т-клеток с CAR, выше нормального уровня пролиферации huCAR19. На фиг. 49A представлены CD4+CAR Т-клетки; на фиг. 49B представлены CD8+CAR Т-клетки. Кружки означают PBS; квадраты означают huCTL019; треугольники означают huCTL019 с 3 мг/кг RAD001; перевернутые треугольники означают huCTL019 с 0,3 мг/кг RAD001; ромбы означают huCTL019 с 0,03 мг/кг RAD001, и кружки означают huCTL019 с 0,003 мг/кг RAD001.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к композициям и способам регуляции специфичности и активности Т-клеток или других цитотоксических клеток, например, NK-клеток. Один из вариантов осуществления относится к химерному антигенному рецептору (CAR), например, CAR рецептору NK-клетки (NKR-CAR) на основании рецептора NK-клетки (NKR), например, KIR-CAR, NCR-CAR, SLAMF-CAR, FcR-CAR или Ly49-CAR. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к типу химерного антигенного рецептора (CAR), где CAR называется NKR, например, "KIR-CAR", который представляет собой модель CAR, содержащую компонент рецептора, встречающегося в естественных клетках-киллерах (NK). В одном из вариантов осуществления NK-рецептор включает, но не ограничивается ими, иммуноглобулиноподобный рецептор клетки-киллера (KIR). KIR могут функционировать как активирующий KIR или ингибирующий KIR.

Одним из преимуществ NKR-CAR, например, KIR-CAR по изобретению, является то, что NKR-CAR, например, KIR-CAR, предоставляют способ регуляции специфичности цитотоксической клетки, например, Т-клетки, для регуляции побочной активности конструируемой Т-клетки. В некоторых случаях для KIR-CAR по изобретению не требуется костимуляция для пролиферации.

NKR-CAR могут доставлять сигнал через адапторный белок, например, содержащий ITAM адапторный белок. В одном из вариантов осуществления KIR-CAR по изобретению содержат активирующий KIR,

который доставляет свой сигнал посредством взаимодействия с иммунорецепторным тирозиновым активирующим мотивом (ITAM), содержащим мембранный белок DAP12, которое опосредовано остатками в трансмембранных доменах таких белков.

В одном из вариантов осуществления NKR-CAR может доставлять ингибирующий сигнал посредством ингибирующего мотива. В одном из вариантов осуществления KIR-CAR по изобретению содержат ингибирующий KIR, который доставляет сигнал посредством взаимодействия с иммунорецепторными тирозиновыми ингибирующими мотивами (ITIM). KIR, несущие цитоплазматические домены, которые содержат ITIM, отменяют активирующий сигнал, что приводит к ингибированию NK цитолитической активности и активности продукции цитокинов. Однако изобретение не следует отграничивать ингибирующими KIR. Наоборот, в конструкции CAR по изобретению можно использовать любой ингибирующий белок, содержащий цитоплазматический домен, который ассоциирован с ингибирующими сигналом.

Таким образом, изобретение относится к композиции, содержащей NKR-CAR, например, KIR-CAR, векторам, содержащим NKR-CAR, композициям, содержащим NKR-CAR, например, KIR-CAR, векторам, упакованным в вирусные частицы, и рекомбинантным Т-клеткам или другим цитотоксическим клеткам, содержащим NKR-CAR, например, KIR-CAR. Изобретение также включает способы получения генетически модифицированной Т-клетки или другой цитотоксической клетки, например, NK-клетки, или культивируемой NK-клетки, например, клетки NK92, экспрессирующей NKR-CAR, например, KIR-CAR (KIR-CART), где экспрессируемый NKR-CAR, например, KIR-CAR, содержит антигенраспознающий домен специфического антитела с молекулой внутриклеточной сигнализации из NKR, например, KIR. Например, в некоторых вариантах осуществления молекула внутриклеточной сигнализации включает, но не ограничивается ими, KIR ITAM, KIR ITIM и т.п.

Таким образом, изобретение относится к композициям и способам регуляции специфичности и активности Т-клеток или других цитотоксических клеток, модифицированных для экспрессии NKR-CAR, например, KIR-CAR. Настоящее изобретение также

относится к клеткам, содержащим совокупность типов NKR-CAR, например, KIR-CAR (например, активирующих NKR-CAR, например, KIR-CAR, и ингибирующего NKR-CAR, например, KIR-CAR), где совокупность типов NKR-CAR, например, KIR-CAR, участвует в передаче сигнала для регуляции активации Т-клеток. В этом аспекте предпочтительным является эффективный контроль и регуляция цитотоксических клеток с NKR-CAR, например, Т-клеток с KIR-CAR, таким образом, что они уничтожают опухолевые клетки, при этом, не поражая нормальные не вовлеченные в процесс клетки. Таким образом, в одном из вариантов осуществления настоящее изобретение также относится к способам цитолиза злокачественных клеток, при сведении к минимуму истощения нормальных незлокачественных клеток, таким образом, улучшая специфичность терапии NKR-CAR, например, KIR-CAR.

В одном из вариантов осуществления подход NKR-CAR, например, KIR-CAR включает физическое разделение совокупности типов CAR, экспрессируемых клеткой, где связывание совокупности типов NKR-CAR, например, KIR-CAR, со своим антигеном-мишенью является необходимым для активации цитотоксической клетки NKR-CAR, например, Т-клетки KIR-CAR. Например, в подходе KIR-CAR каждый KIR-CAR из совокупности типов KIR-CARs содержит отличный внутриклеточный сигнальный домен. Например, когда совокупность типов KIR-CAR используют для индукции активации Т-клетки KIR-CAR, первый тип KIR-CAR может содержать только внутриклеточный домен из активирующего KIR, а второй тип CAR может содержать только внутриклеточный домен из ингибирующего KIR. Таким образом, получают условную активацию Т-клеток в результате взаимодействия активирующего KIR-CAR (actKIR-CAR) с антигеном на представляющей интерес злокачественной клетке. Ингибирующий KIR-CAR (inhKIR-CAR), несущий антигенсвязывающий домен, направленный против антигена, который присутствует на нормальной, но не злокачественной клетке, обеспечивает подавление активирующих эффектов от actKIR-CAR, когда Т-клетка встречается с нормальными клетками.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к Т-клетке или другой цитотоксической клетке,

сконструированной так, чтобы экспрессировать по меньшей мере два NKR-CAR, например, по меньшей мере два KIR-CAR, где первый NKR-CAR, например, KIR-CAR, представляет собой actNKR-CAR, например, actKIR-CAR, а второй NKR-CAR, например, KIR-CAR, представляет собой inhNKR-CAR, например, inhKIR-CAR. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к inhNKR-CAR, например, inhKIR-CAR, где связывание inhNKR-CAR, например, inhKIR-CAR, с нормальной клеткой приводит к ингибированию цитотоксической клетки, например, ингибированию активности Т-клетки KIR-CAR. В одном из вариантов осуществления связывание inhNKR-CAR, например, inhKIR-CAR, с антигеном, ассоциированным с незлокачественной клеткой, приводит к гибели цитотоксической клетки NKR-CAR, например, Т-клетки KIR-CAR.

В одном из вариантов осуществления inhNKR-CAR, например, actKIR-CAR, по изобретению можно использовать в комбинации с существующими CAR для регуляции активности CAR. Иллюстративные CAR описаны в PCT/US11/64191, которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

Было открыто что, в клеткам, содержащих совокупность химерных погруженных в мембрану рецепторов, содержащих антигенсвязывающий домен (CMER), взаимодействия между антигенсвязывающим доменом CMER могут являться нежелательными, например, вследствие того, что взаимодействие ингибирует способность одного или более антигенсвязывающих доменов связываться со своим когнатным антигеном или может приводить к образованию новых участков связывания с неизвестным когнатным антигеном. Таким образом, в настоящем описании описаны клетки, содержащие первый и второй неприродный CMER, где антигенсвязывающие домены сводят к минимуму такие взаимодействия. В настоящем описании также описаны нуклеиновые кислоты, кодирующие первый и второй неприродные такие CMER, а также способы получения и использования таких клеток и нуклеиновых кислот. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого и указанного второго неприродного CMER, содержит scFv, а другой содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен

верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса.

Определения

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, как общепринято понимает специалист в данной области, к которой принадлежит изобретение. Хотя в практическом осуществлении и/или тестировании настоящего изобретения можно использовать любые способы и вещества, аналогичные или эквивалентные тем, которые описывают в настоящем описании, предпочтительные вещества и способы описывают в настоящем описании. При описании и раскрытии настоящего изобретения используют следующую ниже терминологию в соответствии с тем, как ее определяют, где предоставлено определение.

Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем описании, предназначена только для описания конкретные варианты осуществления и не предназначена быть ограничивающей.

Формы единственного числа применяют в настоящем описании для обозначения одного или более одного (например, по меньшей мере одного) грамматического объекта. В качестве примера, "элемент" означает один элемент или более одного элемента.

"Приблизительно" как используют в настоящем описании случае ссылки к измеряемой величине, такой как количество, продолжительность времени и т.п., предназначено включать варианты±20% или±10%, в некоторых случаях±5%, в некоторых случаях±1% и в некотором случае±0,1% от указанной величины, т.к. такие варианты являются подходящими для проведения описываемых способов.

Термин "адапторная молекула как этот термин используют в настоящем описании, относится к полипептиду с последовательностью, которая обеспечивает взаимодействие с двумя или более молекулами и в вариантах осуществления способствует активации или инактивации цитотоксической клетки. Например, в случае DAP12 это включает взаимодействия с активирующим KIR

посредством взаимодействия зарядов в трансмембранном домене и взаимодействий с сигнальными молекулами, таким как ZAP70 или Syk через фосфорилированную ITAM последовательность в цитоплазматическом домене.

Как используют в настоящем описании, термин "антиген" или "Ag" определяют как молекулу, которая вызывает иммунный ответ. Такой иммунный ответ может включать образование антител или активацию специфических иммунокомпетентных клеток или то и другое. Специалисту в данной области будет понятно, что в качестве антигена может служить любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды. Кроме того, антигены можно получать из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалисту в данной области будет понятно, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидные последовательности или неполную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, таким образом, кодирует "антиген", как этот термин используют в настоящем описании. Кроме того, специалисту в данной области будет понятно, что антиген необязательно кодируется только полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Легко понять, что настоящее изобретение относится, но не ограничивается этим, к использованию неполных нуклеотидных последовательностей более чем одного гена, и что такие нуклеотидные последовательности располагаются в различных комбинациях, кодируя полипептиды, которые вызывают желаемый иммунный ответ. Кроме того, специалисту в данной области будет понятно, что антиген необязательно кодируется "геном" полностью. Легко понять, что антиген можно синтезировать или можно выделять из биологического образца. Такой биологический образец может включать, но не ограничивается ими, образец ткани, образец опухоли, клетку или биологическую жидкость.

Как используют в настоящем описании, термин "противоопухолевый эффект" относится к биологическому действию, которое может проявляться в уменьшении объема опухоли, снижении числа опухолевых клеток, снижении метастазов, увеличении продолжительность жизни или улучшении состояния различных

физиологических симптомов, связанных с раковым состоянием. "Противоопухолевый эффект" также может проявляться в способности пептидов, полинуклеотидов, клеток и антител по изобретению оказывать профилактическое действие на частоту возникновения опухоли в первом месте.

Как используют в настоящем описании, термин "аферез" относится к принятому в данной области экстракорпоральному способу, которым кровь донора или пациента удаляют у донора или пациента и пропускают через устройство, которое отделяет выбранный конкретный компонент(ы) и возвращает оставшуюся часть в кровообращение донора или пациента, например, посредством ретрансфузии. Таким образом, в отношении "образца афереза" относится к образцу, получаемому с использованием афереза.

В соответствии с настоящим изобретением термин "аутоантиген" означает любой собственный антиген, который распознает иммунная система как, если он являлся чужеродным. Аутоантигены включают, но не ограничиваются ими, клеточные белки, фосфопротеины, белки клеточной поверхности, клеточные липиды, нуклеиновые кислоты, гликопротеины, включая рецепторы клеточной поверхности.

Как используют в настоящем описании, термин "аутоиммунное заболевание" определяют как нарушение, которое возникает в результате аутоиммунного ответа. Аутоиммунное заболевание является результатом неадекватного и избыточного ответа на собственный антиген. Примеры аутоиммунных заболеваний включают наряду с другими, но не ограничиваются ими, Болезнь Аддисона, очаговую алопецию, анкилозирующий спондилит, аутоиммунный гепатит, аутоиммунный паротит, болезнь Крона, диабет (I типа), дистрофический буллезный эпидермолиз, эпидидимит, гломерулонефрит, болезнь Грейвса, Синдром Гийена-Барре, болезнь Хашимото, гемолитическую анемию, системную красную волчанку, рассеянный склероз, тяжелую миастению, обыкновенную пузырчатку, псориаз, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию, синдром Шегрена, спондилоартропатии, тиреоидит, васкулит, витилиго, микседему, пернициозную анемию, язвенный колит.

Как используют в настоящем описании, термин "аутологичный" предназначен для обозначения любого вещества, получаемого от определенного индивидуума, где его затем повторно вводят индивидууму.

Как используют в настоящем описании, термин "аллогенный" относится к любому веществу, получаемому от другого животного того же вида как и индивидуум, которому вводят вещество. Считают, что два или более индивидуумов являются аллогенными один по отношению к другому, когда гены в одном или более локусов не являются идентичными. В некоторых аспектах аллогенное вещество от индивидуумов того же вида может являться достаточно генетически различным, чтобы взаимодействовать антигенно. В одном из вариантов осуществления аллогенный относится к трансплантату, получаемому от другого животного того же вида.

"Химерный антигенный рецептор": или "CAR", как этот термин используют в настоящем описании, относится к химерному полипептиду, который обладает структурными и функциональными свойствами с рецептором иммунной функции клетки или адапторной молекулой, например, из Т-клетки или NK-клетки. CAR включают TCAR и NKR-CAR. В вариантах осуществления CAR содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с когнатным антигеном, например, опухолевым антигеном, описываемым в настоящем описании. После связывания с когнатным антигеном CAR может активировать или инактивировать цитотоксическую клетку, в которой он располагается, или модулировать противоопухолевую активность клетки или иным образом модулировать иммунный ответ клетки.

В некоторых вариантах осуществления домены в конструкции полипептида CAR находятся в одной и той же полипептидной цепи, например, содержат химерный слитый белок. В некоторых вариантах осуществления домены в конструкции полипептида CAR не являются смежными друг с другом, например, находятся на разных полипептидных цепях, например, как предоставлено в RCAR, как описано в настоящем описании.

"Рецептор иммунной функции естественной киллерной клетки-химерный антигенный рецептор" или "NKR-CAR", как этот термин

используют в настоящем описании, относится к CAR, который обладает общими функциональными и структурными свойствами с рецептором иммунной функции естественной киллерной клетки (NKR) или адапторной молекулы из NK-клетки. В вариантах осуществления NKR-CAR содержит два или все из антигенсвязывающего домена, трансмембранного домена, например, трансмембранного домена NKR, и/или цитоплазматического домена, например, цитоплазматического домена NKR.

"Fc-рецептор-химерный антигенный рецептор" или "FcR-CAR", как этот термин используют в настоящем описании, относится к CAR, который обладает общими функциональными и структурными свойствами с Fc-рецептором (FcR). "Иммуноглобулиноподобный рецептор киллерной клетки-химерный антигенный рецептор" или "KIR-CAR", как этот термин используют в настоящем описании, относится к CAR, который обладает общими функциональными и структурными свойствами с иммуноглобулиноподобным рецептором киллерной клетки (KIR).

"Рецептор Ly49-химерный антигенный рецептор" или "Ly49-CAR", как этот термин используют в настоящем описании, относится к CAR, который обладает общими функциональными и структурными свойствами с рецептором Ly49 (Ly49).

"Рецептор естественной цитотоксичности-химерный антигенный рецептор" или "NCR-CAR", как этот термин используют в настоящем описании, относится к CAR, который обладает общими функциональными и структурными свойствами с рецептором естественной цитотоксичности (NCR).

"Семейство активирующих лимфоциты сигнальных молекул-химерный антигенный рецептор" или "SLAM-CAR", или "SLAMF-CAR", как этот термин используют в настоящем описании, относится к CAR, который обладает общими функциональными и структурными свойствами с SLAM или SLAMF.

"Химерный антигенный рецептор на основе Т-клетки" или "TCAR", как этот термин используют в настоящем описании, относится к CAR. который обладает общими функциональными и структурными свойствами с рецептор иммунной функции клетки или адапторной молекулы из Т-клетки. В вариантах осуществления TCAR

содержит антигенный домен, первичный внутриклеточный сигнальный домен и необязательно один или более костимулирующих сигнальных доменов.

Как используют в настоящем описании, термин "антитело" относится к белку или полипептидной последовательности, получаемой из молекулы иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном-мишенью. Антитело может представлять собой интактный иммуноглобулин, получаемый из природных источников или из рекомбинантных источников, и может представлять собой иммунореактивный участок интактного иммуноглобулина. Антитела могут представлять собой поликлональные или моноклональные, многоцепочечные или одноцепочечные, или интактные иммуноглобулины, и их можно получать из природных источников или из рекомбинантных источников. Антитела, как правило, представляют собой тетрамеры молекул иммуноглобулинов. Молекула антитела, описываемая в настоящем описании, может существовать в различных формах, где антигенсвязывающий участок антитела экспрессируется в виде части непрерывной полипептидной цепи, включая, например, однодоменный фрагмент антитела (sdAb), одноцепочечное антитело (scFv) и гуманизированное антитело или антитело человека, например, как описано в настоящем описании.

Термин "фрагмент антитела" относится по меньшей мере к одному участку интактного антитела или его рекомбинантных вариантов и относится к антиген-определяющим вариабельным областям интактного антитела, который является достаточным для обеспечения распознавания и специфического связывания фрагмента антитела с мишенью, такой как антиген. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, одноцепочечное доменное антитело (sdAb), фрагменты Fab, Fab', F(ab')2 и Fv, линейные антитела, антитела scFv, фрагменты scFv антител, линейное антитело, однодоменное антитело, такое как sdAb (VL или VH), VHH-домен верблюда, и полиспецифические антитела, образуемые из фрагментов антител, таких как бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области, и выделенный CDR или другие эпитоп

связывающие фрагменты антитела. Антигенсвязывающие фрагмент также можно вводить в однодоменные антитела, максиантитела, миниантитела, нанотела, интраантитела, диатела, триотела, тетратела, v-NAR и bis-scFv (см., например, Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology, 23:1126-1136, 2005). Антигенсвязывающие фрагменты также можно трансплантировать в каркасы на основе полипептидов, таких как фибронектин III типа (Fn3) (см. патент США № 6703199, в котором описаны миниантитела на основе полипептида фибронектина).

Термин "scFv" относится к слитому белку, содержащему по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариабельную область легкой цепи и по меньшей мере один фрагмент антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, где вариабельные области легкой и тяжелой цепи являются смежно связанными посредством короткого гибкого полипептидного линкера, и способному экспрессироваться в виде одноцепочечного полипептида, и где scFv сохраняет специфичность интактного антитела, из которого его получают. Если не казано иное, как используют в настоящем описании, scFv может содержать вариабельные области VL и VH в любом порядке, например, по отношению к N-концам и C-концам полипептида, scFv может содержать VL-линкер-VH или может содержать VH-линкер-VL.

Термин "определяющую комплементарность область" или "CDR", как используют в настоящем описании, относится к последовательностям аминокислот в вариабельных областях антитела, которые обеспечивают антигенную специфичность и аффинность связывания. Например, в основном существует три CDR в каждой вариабельной области тяжелой цепи (например, HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR в каждой вариабельной области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3). Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR можно определять с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включая схемы, описанные Kabat et al., (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (система нумерации по "Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (система нумерации по "Chothia")

или их сочетания. Под системой нумерации по Kabat в некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки CDR в вариабельном домене тяжелой цепи (VH) пронумерованы 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) и аминокислотные остатки CDR в вариабельном домене легкой цепи (VL) нумеруют 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). Под системой нумерации по Chothia в некоторых вариантах осуществления аминокислоты CDR в VH пронумерованы 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) и Аминокислотные остатки CDR в VL пронумерованы 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3). В комбинированной системе нумерации по Kabat и Chothia в некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют аминокислотным остаткам, которые являются частью CDR по Kabat, CDR по Chothia или обеих. Например, в некоторых вариантах осуществления CDR соответствуют аминокислотным остаткам 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в VH, например, VH млекопитающего, например, VH человека, и аминокислотные остатки 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в VL, например, VL млекопитающего, например, VL человека.

Участки композиции CAR по изобретению, содержащие антитело или фрагмент антитела могут находиться в различных формах, где антигенсвязывающий домен экспрессируется в виде части непрерывной полипептидной цепи, включая, например, фрагмент однодоменного антитела (sdAb), одноцепочечное антитело (scFv) и гуманизированное антитело или антитело человека (Harlow et al., 1999, In: Using Антитела: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, в Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, в Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science, 242:423-426). В одном из аспектов антигенсвязывающий домен композиции CAR по изобретению содержит фрагмент антитела. В дополнительном аспекте CAR содержит фрагмент антитела, который содержит scFv.

Как используют в настоящем описании, термин "связывающий домен" или "молекула антитела" (также обозначаемая в настоящем описании как "связывающий домен к мишени (например, мезотелину)") относится к белку, например, цепи иммуноглобулина или ее фрагменту, содержащему по меньшей мере одну последовательность вариабельного домена иммуноглобулина. Термин "связывающий домен" или "молекула антитела" включает антитела и фрагменты антител. В одном из вариантов осуществления молекула антитела представляет собой молекулу полиспецифического антитела, например, она содержит совокупность последовательностей вариабельных доменов иммуноглобулинов, где первая последовательность вариабельного домена иммуноглобулина совокупности обладает специфичностью связывания к первому эпитопу, а вторая последовательность вариабельного домена иммуноглобулина совокупности обладает специфичностью связывания ко второму эпитопу. В одном из вариантов осуществления молекула полиспецифического антитела представляет собой биспецифическую молекулу антитела. Биспецифическое антитело обладает специфичностью не более чем к двум антигенам. Биспецифическая молекула антитела характеризуется первой последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания к первому эпитопу, и второй последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания ко второму эпитопу.

Как используют в настоящем описании, "тяжелая цепь антитела" относится к большей из двух типов полипептидных цепей, содержащихся во всех молекулах антител в их природных конформациях.

Как используют в настоящем описании, "легкая цепь антитела" относится к меньшей из двух типов полипептидных цепей, содержащихся во всех молекулах антител в их природных конформациях. Легкие κ- и λ-цепи относятся к двум основным изотипам легких цепей антитела.

Как используют в настоящем описании, под термином "синтетическое антитело" или "рекомбинант антитело"

подразумевают молекулу антитела, которую получают с использованием технологии рекомбинантных ДНК, такую как, например, молекулу антитела, экспрессируемую бактериофагом, как описано в настоящем описании. Термин также следует интерпретировать, как означающий молекулу антитела, которую получали синтезом молекулы ДНК, кодирующей молекулу антитела, и где молекула ДНК экспрессирует белок антитела или аминокислотную последовательность, определяющую антитело, где ДНК или аминокислотную последовательность получали с использованием технологии синтеза ДНК или аминокислотной последовательности, которая является доступной и хорошо известной в данной области.

Как используют в настоящем описании термин "злокачественная опухоль" определяют как заболевание, характеризующееся быстрым и неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Злокачественные клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части организма. Примеры различных злокачественных опухолей включают, но не ограничиваются ими, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, злокачественную опухоль почки, рак печени, злокачественную опухоль головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легких, глиому и т.п. Термины "опухоль" и "злокачественная опухоль" в настоящем описании используют взаимозаменяемо, например, оба термина включают солидные и жидкие, например, диффузные или циркулирующие опухоли. Как используют в настоящем описании, термин "злокачественная опухоль" или "опухоль" включает предраковые, а также злокачественные опухоли и опухоли.

Термин "комбинация" относится к установленной комбинации в одной стандартной лекарственной форме или к комбинированному введению, где соединение по настоящему изобретению и партнер по комбинации (например, другое лекарственное средство, как объясняют ниже, также обозначаемое как "терапевтическое средство" или "средство для совместного введения") можно вводить независимо одновременно или раздельно в течение определенных интервалов времени, особенно когда такие интервалы времени

обеспечивают возможность того, что партнеры по комбинации суммарное, например, синергическое действие. Отдельные компоненты можно упаковывать в набор или раздельно. Один или оба компонента (например, порошки или жидкости) можно восстанавливать или разбавлять до желаемой дозы перед введением. Термины "совместное введение" или "комбинированное введение", или т.п., как используют в настоящем описании, предназначен включать введение выбранного партнера по комбинации с одному нуждающемуся в этом индивидууму (например, пациенту) и предназначены включать схемы лечения, в которых средства необязательно вводят одним и тем же путем введения или одновременно. Как используют в настоящем описании, термин "фармацевтическая комбинация" означает продукт, который является результатом смешивания или объединения более одного активного ингредиента, и включает установленные и неустановленные комбинации активных ингредиентов. Термин "установленная комбинация" означает, что активные ингредиенты, например, соединение по настоящему изобретению и партнер по комбинации вводят пациенту одномоментно в форме единого целого или дозы. Термин "неустановленная комбинация" означает, что активные ингредиенты, например, соединение по настоящему изобретению и партнер по комбинации вводят пациенту в виде отдельных единиц одномоментно, одновременно или последовательно без каких-либо конкретных ограничений по времени, где такое введение обеспечивает терапевтически эффективные уровни двух соединений в организме пациента. Последнее также применяют для "коктейльной" терапии, например, введение трех или более активных ингредиентов.

Как используют в настоящем описании, термин "консервативные модификации последовательности" предназначен для обозначения модификации аминокислот, которые не оказывают значительного влияния или не изменяют характеристик связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают замены, добавления и делеции аминокислот. Модификации можно вводить в антитело по изобретению стандартными способами, известными в данной области, такими как

сайт-специфический мутагенез и опосредованный ПЦР мутагенез. Консервативные замены аминокислот представляют собой замены, в которых аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком с аналогичной боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков с аналогичными боковыми цепями определены в данной области. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, например, один или более аминокислотных остатков в областях CDR антитела по изобретению можно заменять другими аминокислотными остатками из того же семейства боковых цепей и измененное антитело можно тестировать на способность связываться с FRβ использованием функциональных анализов, описываемых в настоящем описании.

"Конститутивный" промотор представляет собой нуклеотидную последовательность, которая, когда является функционально связанной с полинуклеотидом, который кодирует или определяет продукт гена, вызывает продукцию продукта гена в клетке при большей части или при любых физиологических условиях клетки.

Цитоплазматические и внутриклеточные, как применяют к адапторным молекулам и сигнальным доменам, в настоящем описании используют взаимозаменяемо.

"Получаемый из", как этот термин используют в настоящем описании, указывает на отношение между первой и второй молекулой. Как правило, относится к структурному сходству между первой молекулой и второй молекулой и не накладывает или не включает ограничение способа или источника для первой молекулы, которую получают из второй молекулы. Например, в случае внутриклеточного сигнального домена, который получают из

молекулы CD3-дзета, внутриклеточный сигнальный домен сохраняет в достаточной степени структуру CD3-дзета, таким образом, что он обладает необходимой функцией, а именно, способностью генерировать сигнал в подходящих условиях. Это не накладывает или не включает ограничение в отношении конкретного способа получения внутриклеточного сигнального домена, например, это не означает, что для предоставления внутриклеточного сигнального домена необходимо начинать с последовательности CD3-дзета и удалять нежелательную последовательность или вводить мутации для получения внутриклеточного сигнального домена.

Термин "стимуляция" относится к первичному ответу, индуцируемому связыванием стимулирующей молекулы (например, комплекса TCR/CD3) со своим когнатным лигандом, таким образом, опосредуя событие передачи сигнала, такое как, но, не ограничиваясь ими, передачу сигнала через комплекс TCR/CD3. Стимуляция может опосредовать измененную экспрессию определенных молекул, такую как снижение экспрессии TGF-β, и/или распознавание цитоскелетных структур и т.п.

Термин "стимулирующая молекула" относится к молекуле, экспрессируемой Т-клеткой, которая предоставляет первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность(и), которая регулирует первичную активацию комплекса TCR по стимулирующему пути, по меньшей мере некоторый аспект передачи сигнала Т-клеточного пути. В одном из аспектов первичный сигнал инициирует, например, связывание комплекса TCR/CD3 с молекулой MHC, нагруженной пептидом, и которое приводит к опосредованию Т-клеточного ответа, включая, но, не ограничиваясь ими, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п. Первичная цитоплазматическая сигнальная последовательность (также обозначаемая как "первичный сигнальный домен"), которая действует стимулирующим образом, может содержать сигнальный мотив, который является известным как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. Примеры ITAM, содержащего первичную цитоплазматическую сигнальную последовательность, которая находит конкретное применение в

изобретение, включает, но не ограничивается ими, ITAM, получаемые из TCR-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известного как "ICOS"), FcεRI, CD66d, DAP10 и DAP12. В конкретном CAR по изобретению, внутриклеточный сигнальный домен в любом одном или более CAR по изобретению, содержит внутриклеточную сигнальную последовательность, например, первичную сигнальную последовательность CD3-дзета. В конкретном CAR по изобретению первичная сигнальная последовательность CD3-дзета представляет собой последовательность, предоставленную как SEQ ID NO: 9, или эквивалентные остатки от не являющихся человеком виды, например, мыши, грызуна, обезьяны, примата и т.п. В конкретном CAR по изобретению первичная сигнальная последовательность CD3-дзета представляют собой последовательность, как предоставлено в SEQ ID NO: 10, или эквивалентные остатки от не являющихся человеком видов, например, мыши, грызуна, обезьяны, примата и т.п.

Термин "антигенпрезентирующая клетка" или "APC" относится к клетке иммунной системы, такой как вспомогательная клетка (например, B-клетка, дендритная клетка и т.п.), которая предоставляет чужеродный антиген, образовавший комплекс с молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC), на своей поверхности. T-клетки могут распознавать эти комплексы с использованием своих T-клеточных рецепторов (TCR). APC процессируют антигены и предоставляют их T-клеткам.

"Внутриклеточный сигнальный домен", как термин используют в настоящем описании, относится к внутриклеточной части молекулы. Внутриклеточный сигнальный домен может генерировать сигнал, который обеспечивает иммунной функции эффектора, содержащей CAR клетки, например, CART-клетка или экспрессирующей CAR NK-клетки. Примеры иммунной функции эффектора, например, в CART-клетке или экспрессирующей CAR NK-клетке включают цитолитическую активность и активность хелперов, включая секрецию цитокинов. В вариантах осуществления внутриклеточный сигнальный домен преобразует сигнал эффекторной функции и направляет клетку для выполнения специализированной функции. Несмотря на то, что можно применять

полный внутриклеточный сигнальный домен, во многих случаях использование полной цепи не является необходимым. В тех случаях, когда используют такой усеченный участок внутриклеточного сигнального домена, такой усеченный участок можно использовать вместо интактной цепи при условии, что он преобразует сигнал эффекторной функции. Таким образом, термин внутриклеточный сигнальный домен предназначен включать любой усеченный участок внутриклеточного сигнального домена, достаточный для преобразования сигнала эффекторной функции.

В одном из вариантов осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен. Иллюстративные первичные внутриклеточные сигнальные домены включают первичные внутриклеточные сигнальные домены, получаемые из молекул, обеспечивающих первичную стимуляцию или антигензависимую стимуляцию. В одном из вариантов осуществления внутриклеточный сигнальный домен может содержать костимулирующий внутриклеточный домен. Иллюстративные костимулирующие внутриклеточные сигнальные домены включают костимулирующие внутриклеточные сигнальные домены, получаемые из молекул, обеспечивающих костимулирующие сигналы или антигензависимую стимуляцию. Например, в случае экспрессирующей CAR эффекторной клетки иммунной системы, например, Т-клетки с CAR или экспрессирующей CAR NK-клетки первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность Т-клеточного рецептора, и костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен может содержать цитоплазматическую последовательность из корецептора или костимулирующей молекулы.

Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать сигнальный мотив, который известен как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. Примеры ITAM, содержащих первичные цитоплазматические сигнальные последовательности включают, но не ограничиваются ими, ITAM, получаемые из CD3-дзета, FcR-гамма, FcR-бета, CD3-гамма, CD3-

дельта, CD3-эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 ("ICOS"), FcεRI, CD66d, DAP10 и DAP12.

Термин "дзета" или альтернативно "дзета-цепь", "CD3-дзета" или "TCR-дзета" определяют как белок, предоставляемый как белок с номером доступа GenBan BAG36664.1 или эквивалентные остатки от не являющихся человеком видов, например, мыши, грызуна, обезьяны, примата и т.п., и "стимулирующий домен дзета" или альтернативно "стимулирующий домен CD3-дзета", или "стимулирующий домен TCR-дзета" определяют как аминокислотные остатки из цитоплазматического домена дзета-цепи, которые являются достаточными для функциональной передачи начального сигнала, необходимого для активации Т-клеток. В одном из аспектов цитоплазматический домен дзета содержит остатки от 52 до 164 номера доступа GenBank BAG36664.1 или эквивалентные остатки от не являющихся человеком видов, например, мыши, грызуна, обезьяны, примата и т.п., которые являются их функциональными ортологами. В одном из аспектов "стимулирующий домен дзета" или "стимулирующий домен CD3-дзета" представляет собой последовательность, предоставленную как SEQ ID NO: 9. В одном из аспектов "стимулирующий домен дзета" или "стимулирующий домен CD3-дзета" представляет собой последовательность, предоставленную как SEQ ID NO: 10.

Термин "костимулирующая молекула" относится к когнатному партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимулирующим лигандом, таким образом, опосредуя костимулирующий ответ Т-клеткой, такой как, но, не ограничиваясь ими, пролиферация. Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от антигенных рецепторов или их лигандов, которые являются необходимыми для эффективного иммунного ответа. Костимулирующие молекулы включают, но не ограничиваются ими, молекулу MHC I класса, TNF-рецепторные белки, иммуноглобулиноподобные белки, цитокиновые рецепторы, интегрины, сигнальные молекулы, активирующие лимфоциты (белки SLAM), активирующие NK-клетки рецепторы, BTLA, Toll-подобный рецептор, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40,

CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL2R бета, IL2R гамма, IL7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганд, который специфически связывается с CD83.

Костимулирующий внутриклеточный сигнальный домен относится к внутриклеточному участку костимулирующей молекулы. Внутриклеточный сигнальный домен может содержать полный внутриклеточный участок или полный нативный внутриклеточный сигнальный домен молекулы, из которой его получают, или его функциональный фрагмент.

Термин "4-1BB" относится к представителю суперсемейства TNFR с аминокислотной последовательностью, предоставленной как номер доступа GenBank AAA62478.2, или эквивалентные остатки от не являющихся человеком видов, например, мыши, грызуна, обезьяны, примата и т.п.; и "костимулирующий домен 4-1BB" определяют как аминокислотные остатки 214-255 номера доступа GenBank AAA62478.2 или эквивалентные остатки от не являющихся человеком видов, например, мыши, грызуна, обезьяны, примата и т.п. В одном из аспектов "костимулирующий домен 4-1BB" представляет собой последовательность, предоставленную как SEQ ID NO: 7, или эквивалентные остатки от не являющихся человеком видов, например, мыши, грызуна, обезьяны, примата и т.п.

"Эффекторная клетка иммунной системы", как этот термин используют в настоящем описании, относится к клетке, которая участвует в иммунном ответе, например, в активации ответа иммунного эффектора. Примеры эффекторных клеток иммунной системы включают Т-клетки, например, альфа/бета-Т-клетки и гамма/дельта-

Т-клетки, В-клетки, естественные киллеры (NK)-клетки, естественные киллеры Т-(NKT) клетки, тучные клетки и миелоидные фагоциты.

"Функция иммунного эффектора или ответ иммунного эффектора", как этот термин используют в настоящем описании, относится к функции или ответу, например, эффекторной клетки иммунной системы, который усиливает или активирует иммунную атаку клетки-мишени. Например, функция или ответ иммунного эффектора относится к свойству Т- или NK-клетки, которая способствует цитолизу или ингибированию роста или пролиферации клетки-мишени. В случае Т-клетки примерами функции или ответа иммунного эффектора являются первичная стимуляция и костимуляция.

Термин "эффекторная функция" относится к специализированной функции клетки. Эффекторная функция Т-клетки, например, может представлять собой цитолитическую активность или активность хелперов, включая секрецию цитокинов.

Термин "кодирующий" относится к природному свойству конкретных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или иРНК, служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах с определенной последовательностью нуклеотидов (например, рРНК, тРНК и иРНК) или определенной последовательностью аминокислот и биологическими свойствами, обусловленными ими. Таким образом, ген кодирует белок, если транскрипция и трансляция иРНК, соответствующей такому гену, приводит к продукции белка в клетке или другой биологической системе. Кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность, которой является идентичной последовательности иРНК и, как правило, предоставлена в списках последовательностей, и некодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, могут быть обозначены как кодирующие белок или другой продукт этого гена или кДНК.

Если не указано иное, "нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность", включает все нуклеотидные последовательности, которые представляют собой

вырожденные варианты друг друга и которые кодируют ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности, которые кодируют белки и РНК могут содержать интроны.

Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" в настоящем описании используют взаимозаменяемо, и он относится к количеству соединения, состава, вещества или композиции, как описано в настоящем описании, эффективному для достижения конкретного биологического результата. Такие результаты могут включать, но не ограничиваются ими, ингибирование инфекции вируса, как определяют любыми средствами, подходящими в данной области.

Как используют в настоящем описании "эндогенное" относится к любому веществу из организма, клетки, ткани или системы или веществу, продуцируемому в организме, клетке, ткани или системе.

Как используют в настоящем описании, термин "экзогенное" относится к любому веществу, вводимому в организм, клетку, ткань или систему или продуцируемому вне организма, клетки, ткани или системы.

Термин "экспрессия", как используют в настоящем описании, определяют как транскрипцию и/или трансляцию конкретной нуклеотидной последовательности, управляемой своим промотором.

Термин "вектор для переноса" относится к композиции вещества, которое содержит выделенную нуклеиновую кислоту и которую можно использовать для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Различные векторы известны в данной области, включая, но, не ограничиваясь ими, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмидами и вирусами. Таким образом, термин "вектор для переноса" включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Также следует толковать, что термин дополнительно включает не относящиеся к плазмидам и вирусам соединения, которые облегчают перенос нуклеиновой кислоты в клетки, таким как, например, соединение полилизина, липосома и т.п. Примеры вирусных векторов для переноса включают, но не ограничиваются ими, аденовирусные векторы, векторы на основе

аденоассоциированного вируса, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и т.п.

"Экспрессирующий вектор" относится к вектору, содержащему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий регулирующие экспрессию последовательности, функционально связанные с экспрессируемой нуклеотидной последовательностью. Экспрессирующий вектор содержит достаточные действующие в *цис*-положении элементы для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут поставляться клеткой-хозяином или в экспрессирующей системе *in vitro*. Экспрессирующие векторы включают все экспрессирующие векторы, известные в данной области, такие как космиды, плазмиды (например, голые или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые вводят рекомбинантный полинуклеотид.

Как используют в настоящем описании, термин "вектор" относится к любому носителю, который можно использовать для доставки и/или экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты. Он может представлять собой вектор для переноса или экспрессирующий вектор, как описано в настоящем описании.

Как используют в настоящем описании, термин "гомологичный" или "идентичность" относится к идентичности последовательности субъединицы двух полимерных молекул, например, двух молекул нуклеиновой кислоты, таких как, две молекулы ДНК или две молекулы РНК, или двух полипептидных молекул. Когда положение субъединицы в обеих из двух молекул занимает одна и та же мономерная субъединица; например, если положение, в каждой из двух молекул ДНК занимает аденин, то они являются гомологичными в этом положении. Гомология двух последовательностей непосредственно зависит от числа совпадающих или гомологичных положений; например, если половина (например, пять положений в полимере длиной десять субъединиц) положений в двух последовательностях являются гомологичными, две последовательности являются на 50% гомологичными; если 90% последовательностей (например, 9 из 10) совпадают или являются

гомологичными, две последовательности являются на 90% гомологичными.

"Гуманизированные" формы не принадлежащих человеку антител (например, мыши) представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')2 или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, получаемую из не принадлежащего человеку иммуноглобулина. Преимущественно гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки из определяющей комплементарность области (CDR) реципиента заменяют остатками из CDR, принадлежащей не являющимся человеком видам (донорное антитело), таким как мыши, крысы или кролика, с желаемой специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменяют соответствующими не принадлежащими человеку остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не встречаются ни в реципиентном антителе, ни в импортируемых CDR или каркасных последовательностях. Такие модификации подводят для дополнительного улучшения и оптимизации характеристики антитела. Как правило, гуманизированное антитело содержит по существу все из по меньшей мере одного и, как правило двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все области CDR соответствуют областям CDR не принадлежащего человеку иммуноглобулина, и все или по существу все области FR представляют собой области FR последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело в оптимальном варианте также содержит по меньшей мере участок константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, участок константной области иммуноглобулина человека. Для более подробной информации см. Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992.

"Полностью принадлежащий человеку" относится к иммуноглобулину, такому как антитело или фрагмент антитела, где целая молекула принадлежит человеку или состоит из аминокислотной последовательности, идентичной форме человека антитела или иммуноглобулина.

Как используют в настоящем описании, "учебный материал" включает публикацию, запись, диаграмму или любую другую среду выражения, которую можно использовать для сообщения полезности композиций и способов по изобретению. Учебный материал набора по изобретению можно, например, прикреплять к контейнеру, который содержит нуклеиновую кислоту, пептид и/или композицию по изобретению, или поставлять совместно с контейнером, который содержит нуклеиновую кислоту, пептид и/или композицию. Альтернативно, учебный материал можно поставлять отдельно от контейнера с тем намерением, что учебный материал и соединение используется совместно реципиентом.

Термин "выделенный" означает измененный или удаленный из природного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, естественных образом присутствующий у живого животного, не является "выделенным", но та же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенный от сопутствующих веществ из своего природного состояния, является "выделенной". Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать в по существу очищенной форме или могут существовать в неприродном окружении, таком как, например, клетка-хозяин.

В контексте настоящего изобретения используют следующие ниже сокращенные обозначения для часто встречающихся оснований нуклеиновых кислот. "A" относится к аденозину, "C" относится к цитозину, "G" относится к гуанозину, "T" относится к тимидину, и "U" относится к уридину.

Если не указано иное, "нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность" включает все нуклеотидные последовательности, которые представляют собой вырожденные варианты друг друга, и которые кодируют ту же аминокислотную последовательность. Фраза нуклеотидная последовательность, кодирующая белок или РНК, также может

включать интроны в тех случаях, когда такая нуклеотидная последовательность, кодирующая белок, может в определенном варианте содержать интрон(ы).

Как используют в настоящем описании, "лентивирус" относится к роду из семейства *Retroviridae*. Лентивирусы являются уникальными are среди ретровирусов, что заключается в том, что они способны инфицировать неделящиеся клетки; они могут доставлять значительное количество генетической информации в ДНК клетки-хозяина, таким образом, они представляют собой один из наиболее эффективных способов вектора для доставки генов. HIV, SIV и FIV являются примерами лентивирусов. Векторы, получаемые из лентивирусов, обеспечивают средства получения значительных уровней переноса гена *in vivo*.

Термин "лентивирусный вектор" относится к вектору, получаемому по меньшей мере из части геном лентивируса, в частности включая самоинактивирующийся лентивирусный вектор, как предоставлено у Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009). Другие примеры лентивирусных векторов, которые можно использовать в клинике, включают, но не ограничиваются ими, например, технологию доставки генов LENTIVECTOR® от Oxford BioMedica, векторную систему LENTIMAX™ от Lentigen и т.п. Типы лентивирусных векторов для неклинического использования также доступные и известны специалисту в данной области.

Термин "гибкий полипептидный линкер" или "линкер", как используют в отношении scFv, относится к пептидному линкеру, который состоит из аминокислот, таких как остатки глицина и/или серина, используемые отдельно или в комбинации для связывания вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи друг с другом. В одном из вариантов осуществления гибкий полипептидный линкер представляет собой линкер Gly/Ser и содержит аминокислотную последовательность (Gly-Gly-Gly-Ser)n (SEQ ID NO: 38), где n представляет собой положительное целое число, равное 1 или более. Например, n=1, n=2, n=3. n=4, n=5 и n=6, n=7, n=8, n=9 и n=10. В одном из вариантов осуществления гибкие полипептидные линкеры содержат, но не ограничиваются ими,

(Gly4 Ser)4 (SEQ ID NO: 27) или (Gly4 Ser)3 (SEQ ID NO: 28). В другом варианте осуществления линкеры содержат многие повторы (Gly2Ser), (GlySer) или (Gly3Ser) (SEQ ID NO: 29). Также в объем изобретения входят линкеры, описанные в WO2012/138475, включенной в настоящее описание посредством ссылки.

"Рецептор иммунной функции NK-клетки" или "NKR", как этот термин используют в настоящем описании, относится к эндогенному природному трансмембранному белку, экспрессируемому в NK-клетках, который может взаимодействовать с лигандом на антигенпрезентирующей клетке и модулировать иммунный ответ NK-клетки, например, он может модулировать цитолитическую активность или секрецию цитокинов NK-клетки. NKR может способствовать активации (активирующий NKR или actNKR) или ингибированию (ингибирующий NKR или inhNKR). Как правило, NKR содержит внеклеточный лиганд-связывающий домен (ECD), трансмембранный домен (TM) и внутриклеточный цитоплазматический домен (МКБ). NKR включает семейство рецепторов иммуноглобулиноподобного рецептора киллерных клеток (KIR), таких как KIR2DS2, семейство рецепторов рецептора NK-клетки (NCR), таких как NKp46 (NCR1), семейство рецепторов (SLAMF) сигнальных активирующих лимфоциты рецепторов(SLAM), таких как 2B4, и Fc-связывающие рецепторы, такие как IgG-связывающий рецептор, CD16 (FcγRIII). Примеры иммунных ответов NK-клетки, модулируемых NKR, включают уничтожение клетки-мишени (часто обозначаемое как цитотоксичность или цитолиз), секрецию цитокинов и/или пролиферация. Как правило, NKR, пригодный для использования в способах и композициях, описываемых в настоящем описании, представляет собой NKR человека (или hNKR). В одном из вариантов осуществления также включено семейство рецепторов Ly49 у *Mus musculus*, которые возникли в результате конвергентной эволюции, чтобы обеспечивать такую же функцию как KIR в NK- и T-клетках мышей.

Термин "функционально связанный" относится к функциональной связи между регуляторной последовательностью и гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, возникающей в

результате экспрессии последней. Например, первая последовательность нуклеиновой кислоты является функционально связанной со второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первую последовательность нуклеиновой кислоты помещают в функциональную взаимосвязь со второй последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если промотор влияет на транскрипцию или экспрессию кодирующей последовательности. Как правило, функционально связанные последовательности ДНК являются смежными и обязательно соединяют две кодирующие области белка в одной и той же рамке считывания.

"Парентеральное" введение иммуногенной композиции включает, например, подкожную (п/к), внутривенную (в/в), внутримышечную (в/м) или внутригрудинную инъекцию или техники инфузии.

Термин "нуклеиновая кислота", молекула нуклеиновой кислоты" или "полинуклеотид", как взаимозаменяемо используют в настоящем описании, определяют как цепь нуклеотидов. Кроме того, нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры нуклеотидов. Таким образом, нуклеиновые кислоты и полинуклеотиды, как используют в настоящем описании, являются взаимозаменяемыми. Специалист в данной области имеет общие знания о том, что нуклеиновые кислоты представляют собой полинуклеотиды, которые можно подвергать гидролизу до мономерных "нуклеотидов". Мономерные нуклеотиды можно подвергать гидролизу до нуклеотидов. Как используют в настоящем описании, полинуклеотиды включают, но не ограничиваются ими, все последовательности нуклеиновой кислоты, которые получают любыми способами, доступными в данной области, включая без ограничения, рекомбинантные способы, т.е. клонирование последовательностей нуклеиновой кислоты из рекомбинантной библиотеки или генома клетки с использованием общепринятой технологии клонирования и ПЦР™, и т.п., и способами синтеза. В вариантах осуществления нуклеиновые кислоты в настоящем описании представляют собой дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или рибонуклеиновую кислоту (РНК), или комбинацию ДНК или РНК, и их полимеры в одноцепочечной или двухцепочечной

форме. Термин "нуклеиновая кислота" включает ген, кДНК или иРНК. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты является синтетической (например, химически синтезированной) или рекомбинантной. Если нет конкретных ограничений, термин включает нуклеиновые кислоты, содержащие аналоги или производные природных нуклеотидов, которые обладают аналогичными свойствами связывания как эталонная нуклеиновая кислота и метаболизируются аналогичным образом с природными нуклеотидами. Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также в неявной форме включает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов), аллели, ортологи, SNP и комплементарные последовательности, а также последовательность, явным образом указанную. В частности, замены вырожденных кодонов можно получать посредством получения последовательностей, в которых третье положение одного или более выбранных (или всех) кодонов заменяют остатками смешанных оснований и/или дезоксиинозина (Batzer et al., Nucleic Acid Res., 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem., 260:2605-2608 (1985), и Rossolini et al., Mol. Cell. Probes, 8:91-98 (1994)).

Как используют в настоящем описании, термины "пептид", "полипептид" и "белок" используют взаимозаменяемо, и он относится к соединению, состоящему из аминокислотных остатков, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, и не накладывают какого-либо ограничения на максимальное число аминокислот, которое может содержать белковая или пептидная последовательность. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислоты, соединенных друг с другом пептидными связями. Как используют в настоящем описании, термин относится как к более коротким цепям, которые также общепринято обозначают в данной области, например, как пептиды, олигопептиды и олигомеры, так и к более длинным цепям, которые, как правило, обозначают в данной области как белки, для которых существует много типов. "Полипептиды" включают, например, наряду с другими биологически активные фрагменты, по существу гомологичные

полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, слитые белки. Полипептиды включают природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или их сочетание.

Как используют в настоящем описании, термин "промотор" определяют как последовательность ДНК, которую распознает распознаваемой аппаратом синтеза клетки или вводимым аппаратом синтеза, необходимой для инициализации специфической транскрипции полинуклеотидной последовательности.

Как используют в настоящем описании, термин "промоторная/регуляторная последовательность" означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая является необходимой для экспрессии продукта гена, функционально связанного с промоторной/регуляторной последовательностью. В некоторых случаях такая последовательность может представлять собой коровую промоторную последовательность, а в других случаях такая последовательность также может содержать энхансерную последовательность и другие регуляторные элементы, которые являются необходимыми для экспрессии продукта гена. Промоторная/регуляторная последовательность может, например, представлять собой последовательность, которая экспрессирует продукт гена тканеспецифическим образом.

"Индуцибельный" промотор представляет собой нуклеотидную последовательность, которая, когда является функционально связанной с полинуклеотидом, который кодирует или устанавливает продукт гена, вызывает образование продукта гена в клетке по существу только, когда промотор присутствует в клетке.

"Тканеспецифический" промотор представляет собой нуклеотидную последовательность, которая, когда является функционально связанной с полинуклеотидом, который кодирует или устанавливает продукт гена, вызывает образование продукта гена в клетке по существу только, если клетка представляет собой клетку типа ткани.

Термин "путь передачи сигнала" относится к биохимическому взаимоотношению между различным молекулами передачи сигнала, которые играют роль в передаче сигнала из одной части клетки в

другую часть клетки. Фраза "рецептор клеточной поверхности" включает молекулы и комплексы молекул, способных получать сигнал и передавать сигнал через мембрану клетки.

Термин "индивидуум" предназначен включать живые организмы, у которых можно вызывать иммунный ответ (например, млекопитающие).

Как используют в настоящем описании, "по существу очищенная" клетка относится к клетке, которая по существу не содержит другие типы клеток. По существу очищенная клетка также относится к клетке, которую отделили от других типов клеток, с которыми она обычно связана в своем природном состоянии. В некоторых случаях популяция по существу очищенных клеток относится к гомогенной популяции клеток. В других случаях этот термин просто относится к клетке, которую отделили от клеток, с которыми она естественным образом связана в своем естественном состоянии. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют *in vitro*. В других вариантах осуществления клетки не культивируют *in vitro*.

Как используют в настоящем описании, 5'-кэп (также называемый кэп РНК, кэп 7-метилгуанозин РНК или m^7G-кэп РНК) представляет собой модифицированный нуклеотид гуанина, который добавили к "передней стороне" или 5'-концу эукариотической информационной РНК сразу же после начала транскрипции. 5'-кэп состоит из концевой группы, которая является связанной с первым транскрибируемым нуклеотидом. Его присутствие является критическим для распознавания рибосомой и защиты от РНКаз. Добавление кэп сопряжено с транскрипцией и происходит котранскрипционно, таким образом, что одно влияет на другое. Непосредственно после начала транскрипции 5'-конец синтезируемой иРНК связывается синтезирующим кэп комплексом, связанным с РНК-полимеразой. Этот ферментативный комплекс катализирует химические реакции, которые являются необходимыми для кэппирования иРНК. Синтез проходит в виде многоэтапных биохимических реакций. Кэппирующую группу можно модифицировать для модулирования функциональности иРНК, такой как ее стабильность или эффективность трансляции.

Как используют в настоящем описании, "транскрибируемая *in vitro* РНК" относится к РНК, предпочтительно иРНК, которую синтезировали *in vitro*. Как правило, транскрибируемую *in vitro* РНК получают на основе транскрипционного вектора *in vitro*. Транскрипционный вектор *in vitro* содержит матрицу, которую используют для получения транскрибируемой *in vitro* РНК.

Как используют в настоящем описании, "поли(А)" представляет собой серию аденозинов, присоединяемых посредством полиаденилирования к иРНК. В предпочтительном варианте осуществления конструкции для транзиторной экспрессии полиА составляет от 50 до 5000 (SEQ ID NO: 30), предпочтительно более 64, более предпочтительно более 100, наиболее предпочтительно более 300 или 400. Последовательности поли(А) можно модифицировать химически или ферментативно для модуляции функциональности иРНК, такой как локализация, стабильность или эффективность трансляции.

Как используют в настоящем описании, "полиаденилирование" относится к ковалентному связыванию полиаденильной группы или ее модифицированного варианта с молекулой информационной РНК. В эукариотических организмах большая часть молекул информационной РНК (иРНК) является полиаденилированной на 3'-конце. 3'-поли(А) хвост представляет собой длинную последовательность нуклеотидов аденина (как правило, несколько сотен), добавляемых к пре-иРНК под действием фермента полиаденилатполимеразы. У высших эукариотов хвост поли(А) добавляется к транскрипту, который содержит конкретную последовательность, сигнал полиаденилирования. Хвост поли(А) и белковая связь с ним помогают защищать иРНК от разрушения экзонуклеазами. Полиаденилирование также является важным для терминации транскрипции, экспорта иРНК из ядра и трансляции. Полиаденилирование происходит в ядре сразу же после транскрипции ДНК в РНК, но дополнительно также может происходить позже в цитоплазме. После того, как происходит терминация транскрипции, цепь иРНК расщепляется под действием эндонуклеазного комплекса, связанного с РНК-полимеразой. Участок расщепления, как правило, характеризуется наличием последовательности оснований AAUAAA

около участка расщепления. После расщепления иРНК, остатки аденозина добавляются к свободному 3'-концу на участке расщепления.

Как используют в настоящем описании, "транзиторная" относится к экспрессии неинтегрированного трансгена в течение часов, суток или недель, где период времени экспрессии является меньше чем период времени экспрессии гена, в случае интеграции в геном или содержащегося в стабильном плазмидном репликоне в клетке-хозяине.

Как используют в настоящем описании термин "терапевтическое" означает лечение и/или профилактику. Терапевтический эффект получают путем подавления, ремиссии или эрадикации состояния болезни.

Как используют в настоящем описании, термин "трансфицированный" или "траснформированный" или "трансдуцированный" относится к способу, посредством которого экзогенную нуклеиновую кислоту переносят или вводят в клетку-хозяина. "Трансфицированная" или "трансформированная" или "трансдуцированная" клетка представляет собой клетку, которую трансфицировали, трансформировали или трансдуцировали экзогенной нуклеиновой кислотой. Клетка включает первичную клетку индивидуума и ее потомство.

Как используют в настоящем описании, термины "лечить", "лечение" и "лечащий" относятся к снижению или улучшению состояния прогрессирования, тяжести и/или продолжительности пролиферативного нарушения, или улучшению состояния одного или более симптомов (предпочтительно одного или более выраженных симптомов) пролиферативного нарушения, что является результатом проведения одного или более видов терапии (например, одного или более терапевтических средств, таких как CAR по изобретению). В конкретных вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" и "лечащий" относятся к улучшению состояния по меньшей мере одного измеряемого физического параметра пролиферативного нарушения, такого как рост опухоли, не обязательно выраженного у пациента. В других вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" и "лечащий" относятся к ингибированию прогрессирования

пролиферативного нарушения физически, например, путем стабилизации выраженного симптома, физиологически, например, путем стабилизации физического параметра или того и другого. В других вариантах осуществления термины "лечить", "лечение" и "лечащий" относятся к уменьшению или стабилизации размера опухоли или числа злокачественных клеток.

Как используют в настоящем описании термин "профилактика" означает предотвращение или защитное лечение в отношении заболевания или состояния болезни.

Как используют в настоящем описании, термин "опухолевый антиген" относится к молекуле (как правило, белку, углеводу или липиду), которая экспрессируется на поверхности злокачественной клетки или опухолевой клетки полностью или в виде фрагмента (например, MHC/пептида), и которая является пригодной для предпочтительного нацеливания фармакологического средства на злокачественную клетку или опухолевую клетку. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой маркер, экспрессируемый нормальными клетками и злокачественными клетками, например, маркер дифференцировки, например, CD19 или CD123 на B-клетках. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой молекулу клеточной поверхности, которая экспрессируется на повышенном уровне в злокачественной клетке по сравнению с нормальной клеткой, например, сверхэкспрессия в 1 раз, сверхэкспрессия в 2 раза, сверхэкспрессия в 3 раза или более по сравнению с нормальной клеткой. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой молекулу клеточной поверхности, которая несоответствующим образом синтезируется в злокачественной клетке, например, молекулу, которая содержит делеции, добавления или мутации по сравнению с молекулой, экспрессируемой нормальной клеткой. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген экспрессируется только на клеточной поверхности злокачественной клетки полностью или в виде фрагмента (например, MHC/пептида) и не синтезируется или не экспрессируется на поверхности нормальной клетки.

В некоторых вариантах осуществления CAR по настоящему изобретению относятся к CAR, содержащим антигенсвязывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела), который связывается с предоставленным MHC пептидом. Как правило, пептиды, получаемые из эндогенных белков, заполняют "карманы" молекулы главного комплекса гистосовместимости (MHC) I класса и распознаются Т-клеточными рецепторами (TCR) на CD8+ Т-лимфоцитах. Комплексы MHC I класса конститутивно экспрессируются всеми ядросодержащими клетками. В злокачественной опухоли комплексы вирусоспецифичный и/или опухолеспецифичный пептид/MHC представляют собой уникальный класс мишеней на клеточной поверхности для иммунотерапии. Были описаны TCR-подобные антитела, направленно воздействующие на пептиды, получаемые из антигенов вирусов или опухолевых антигенов, по отношению к лейкоцитарную антигену человека (HLA)-A1 или HLA-A2 (см., например, Sastry et al., J Virol., 2011 85(5):1935-1942; Sergeeva et al., Blood, 2011 117(16):4262-4272; Verma et al., J. Immunol., 2010 184(4):2156-2165; Willemsen et al., Gene Ther., 2001 8(21):1601-1608; Dao et al., Sci. Transl. Med., 2013 5(176):176ra33; Tassev et al., Cancer Gene Ther., 2012 19(2):84-100). Например, TCR-подобное антитело можно идентифицировать на основании скрининга библиотеки, такой как библиотека фагового дисплея scFv человека.

Как используют в настоящем описании, фраза "под транскрипционным контролем" или "функционально связанный" означает, что промотор находится в правильном положении и ориентации по отношению к полинуклеотиду для контроля инициации транскрипции РНК-полимеразой и экспрессии полинуклеотида.

"Вектор" представляет собой композицию вещества, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту, и которую можно использовать для доставки выделенной нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Различные векторы известны в данной области, включая, но, не ограничиваясь ими, линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмидами и вирусами. Таким образом, термин "вектор для переноса" включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Также следует толковать, что термин

дополнительно включает не относящиеся к плазмидам и вирусам соединения, которые облегчают перенос нуклеиновой кислоты в клетки, таким как, например, соединение полилизина, липосома и т.п. Примеры вирусных векторов для переноса включают, но не ограничиваются ими, аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы и т.п.

Как используют в настоящем описании, под термином "специфически связывается" подразумевают антитело или лиганд, который распознает и связывается с когнатным белком-партнером по связыванию, содержащемся в образце, но где антитело или лиганд по существу не распознает или не связывается с другими молекулами в образце.

Под термином "стимуляция" подразумевают первичный ответ, индуцируемый связыванием стимулирующей молекулы со своим когнатным лигандом, таким образом, опосредуя событие передачи сигнала, такое как, но, не ограничиваясь ими, передачу сигнала через соответствующий NK-рецептор.

"Ксеногенный" относится к трансплантату, получаемому от животного другого вида.

Термин "специфически связывается" относится к антителу или лиганду, который распознает и связывается с когнатным белком-партнером по связыванию (например, стимулирующей и/или костимулирующей молекулой, предоставленной на Т-клетке), содержащемся в образце, но где антитело или лиганд по существу не распознает или не связывается с другими молекулами в образце.

Как используют в настоящем описании, "регулируемый химерный антигенный рецептор (RCAR)" относится к группе полипептидов, как правило, двум в наиболее простых вариантах осуществления, которые, находясь в эффекторной клетке иммунной системы, обеспечивают клетку специфичностью к клетке-мишени, как правило, злокачественной клетке и регулируемой генерацией внутриклеточного сигнала. В некоторых вариантах осуществления RCAR содержит по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный и цитоплазматический сигнальный домен (также обозначаемый в настоящем описании как "внутриклеточный

сигнальный домен"), содержащий функциональный сигнальный домен, получаемый из стимулирующей молекулы и/или костимулирующей молекулы, как определено в настоящем описании в отношении молекулы CAR. В некоторых вариантах осуществления группы полипептидов в RCAR не являются смежными друг с другом, например, находятся в разных полипептидных цепях. В некоторых вариантах осуществления RCAR содержат переключатель димеризации, который в присутствии индуцирующей димеризацию молекулы может приводить к спариванию полипептидов друг с другом, например, может приводить к спариванию антигенсвязывающего домена с внутриклеточным сигнальным доменом. В некоторых вариантах осуществления RCAR экспрессируется в клетке (например, эффекторной клетке иммунной системы), как описано в настоящем описании, например, экспрессирующей RCAR клетке (также обозначаемой в настоящем описании как "RCARX-клетка"). В одном из вариантов осуществления RCARX-клетка представляет собой Т-клетку и обозначается как RCART-клетка. В одном из вариантов осуществления RCARX-клетка представляет собой NK-клетку и обозначается как RCARN-клетка. RCAR может обеспечивать экспрессирующую RCAR клетку со специфичностью к клетке-мишени, как правило, злокачественной клетке и с регулируемой генерацией внутриклеточных сигналов или пролиферацией, которая может оптимизировать свойства иммунного эффектора экспрессирующей RCAR клетки. В вариантах осуществления RCAR-клетка основана по меньшей мере частично на антигенсвязывающем домене, что обеспечивает специфичность к клетке-мишени, которая содержит антиген, связанный антигенсвязывающим доменом.

"Мембранный якорь" или "мембранный якорный домен", как этот термин используют в настоящем описании, относится к полипептиду или группе, например, миристоиловой группе, достаточной для заякоривания внеклеточного или внутриклеточного домена в плазматической мембране.

"Переключающий домен", как этот термин используют в настоящем описании, например, когда относится к RCAR, относится к структурной единице, как правило, на основе полипептида, которая в присутствии индуцирующей димеризацию молекулы,

связанной с другим переключающим доменом. Ассоциация приводит к функциональному связыванию первой структурной единицы, связанной, например, слитой с первым переключающим доменом, и второй структурной единицы, связанной, например, слитой со вторым переключающим доменом. Первый и второй переключающие домены совместно обозначают как переключатель димеризации. В вариантах осуществления первый и второй переключающие домены являются аналогичными, например, они могут представлять собой полипептиды, содержащие одну и ту же первичную аминокислотную последовательность, и их совместно обозначают как переключатель гомодимеризации. В вариантах осуществления первые и второй переключающие домены являются отличными друг от друга, например, они представляют собой полипептиды, содержащие различные первичные аминокислотные последовательности, и их совместно обозначают как переключатель гетеродимеризации. В вариантах осуществления переключатель является внутриклеточным. В вариантах осуществления переключатель является внеклеточным. В вариантах осуществления переключающий домен представляет собой структурную единицу на основе полипептида, например, FKBP или на основе FRB, и индуцирующая димеризацию молекула представляет собой низкомолекулярное соединение, например, рапалог. В вариантах осуществления переключающий домен представляет собой структурную единицу на основе полипептида, например, scFv, который связывается с пептидом myc, и индуцирующая димеризацию молекула представляет собой полипептид, его фрагмент или мультимер полипептида, например, лиганд myc или мультимеры лиганда myc, которые связываются с одним или более scFv myc. В вариантах осуществления переключающий домен представляет собой структурную единицу на основе полипептида, например, рецептор myc, и индуцирующая димеризацию молекула представляет собой антитело или его фрагменты, например, антитело myc.

"Индуцирующая димеризацию молекула", как этот термин используют в настоящем описании, например, по отношению к RCAR, относится к молекуле, которая способствует образованию связи первого переключающего домена со вторым переключающим доменом. В вариантах осуществления индуцирующая димеризацию молекула

естественным образом не встречается у индивидуума или не встречается в концентрациях, которые приводят к димеризации в значительной степени. В вариантах осуществления индуцирующая димеризацию молекула представляет собой низкомолекулярное соединение, например, рапамицин или рапалог, например, RAD001.

Термин "биоэквивалентный" относится к количеству средства, отличного от эталонного соединения (например, RAD001), необходимому для оказания эффекта, эквивалентного эффекту, оказываемого эталонной дозы или эталонным количеством эталонного соединения (например, RAD001). В одном из вариантов осуществления эффект представляет собой уровень ингибирования mTOR, например, как измеряют по ингибированию киназы P70S6, например, как оценивают в анализе *in vivo* или *in vitro*, например, как измеряют анализом, описываемым в настоящем описании, например, анализом Boulay, или измерением уровней фосфорилированного S6 вестерн-блоттингом. В одном из вариантов осуществления эффект представляет собой изменение отношения PD-1-положительных/PD-1-отрицательных эффекторных клетки иммунной системы, например, Т-клеток или NK-клеток, как измеряют посредством сортировки клеток. В одном из вариантов осуществления биоэквивалентное количество или доза ингибитора mTOR представляет собой количество или дозу, которая обеспечивает тот же уровень ингибирования киназы P70S6 как обеспечивает эталонная доза или эталонное количество эталонного соединения. В одном из вариантов осуществления биоэквивалентное количество или доза ингибитора mTOR представляет собой количество или дозу, которая обеспечивает тот же уровень изменения отношения PD-1-положительных/PD-1-отрицательных эффекторных клеток иммунной системы, например, Т-клеток или NK-клеток, как обеспечивает эталонная доза или эталонное количество эталонного соединения.

Термин "низкая усиливающая иммунитет доза" при использовании в сочетании с ингибитором mTOR, например, аллостерическим ингибитором mTOR, например, RAD001 или рапамицином, или каталитическим ингибитором mTOR относится к дозе ингибитора mTOR, который частично, но не полностью

ингибирует активность mTOR, например, как измеряют по ингибированию активности киназы P70S6. Способы оценки активности mTOR, например, по ингибированию киназы P70S6 описаны в настоящем описании. Доза является недостаточной для приведения к полному подавлению иммунитета, но является достаточной для усиления иммунного ответа. В одном из вариантов осуществления низкая усиливающая иммунитет доза ингибитора mTOR приводит к уменьшению числа PD-1-положительных эффекторных клеток иммунной системы, например, Т-клеток или NK-клеток и/или увеличению числа PD-1-отрицательных эффекторных клеток иммунной системы, например, Т-клеток или NK-клеток, или увеличению отношения PD-1-отрицательных Т-клеток/PD-1-положительных эффекторных клеток иммунной системы, например, Т-клеток или NK-клеток.

В одном из вариантов осуществления низкая усиливающая иммунитет доза ингибитора mTOR приводит к увеличению числа интактных эффекторных клеток иммунной системы, например, Т-клеток или NK-клеток. В одном из вариантов осуществления низкая усиливающая иммунитет доза ингибитора mTOR приводит к одному или более из следующих ниже:

- повышению экспрессии одного или более из следующих ниже маркеров: $CD62L^{high}$, $CD127^{high}$, $CD27^{+}$ и BCL2, например, на Т-клетках памяти, например, предшественниках Т-клеток памяти;

- снижению экспрессии KLRG1, например, на Т-клетках памяти, например, предшественниках Т-клеток памяти, и

- повышению числа предшественников Т-клеток памяти, например, клеток с любой одной или комбинацией следующих ниже характеристик: повышенного $CD62L^{high}$, повышенного $CD127^{high}$, повышенного $CD27^{+}$, сниженного KLRG1 и повышенного BCL2;

где любое из описанных выше изменений происходит, например, по меньшей мере транзиторно, например, по сравнению с не получавшим лечение индивидуумом.

Как используют в настоящем описании, "рефрактерное" относится к заболеванию, например, злокачественной опухоли, которая не реагирует на лечение. В вариантах осуществления рефрактерная злокачественная опухоль может являться резистентной к лечению до лечения или во время его начала. В других вариантах

осуществления рефрактерная злокачественная опухоль может становиться резистентной во время лечения. Рефрактерную злокачественную опухоль также называют резистентной злокачественной опухолью.

Как используют в настоящем описании, "рецидивирующий" или "рецидив" относится к возврату или повторному возникновению заболевания (например, злокачественной опухоли) или признаков и симптомов заболевания, такого как злокачественная опухоль, после периода улучшения или ответной реакции, например, после предварительного лечения терапии, например, терапии злокачественной опухоли. Начальный период ответной реакции может включать снижение уровня злокачественных клеток ниже определенного порогового значения, например, ниже 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%. Повторное появление может включать повышение уровня злокачественных клеток выше определенного порогового значения, например, выше 20%, 1%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%. Например, в отношении B-ALL, повторное появление может включать, например, повторное появление бластов в крови, костном мозге (>5%) или любом экстрамедуллярном участке после полного ответа. Полный ответ в этом контексте может включать <5% бластов BM. В более общем смысле в одном из вариантов осуществления ответ (например, полный ответ или частичный ответ) может включать отсутствие детектируемой MRD (минимальной резидуальной болезни). В одном из вариантов осуществления начальный период ответной реакции длится по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 суток, по меньшей мере 1, 2, 3 или 4 недели, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 или 12 месяцев, или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 год.

В некоторых вариантах осуществления терапия, которая предусматривает введение ингибитора CD19, например, терапия CD19 CAR, может приводить к рецидиву или к заболеванию, рефрактерному к лечению. Рецидив или резистентность может быть вызвана потерей CD19 (например, мутацией потери антигена) или другим изменением CD19, которое снижает уровень CD19 (например, вызываемым клональной селекцией CD19-отрицательных клонов). Злокачественную

опухоль, которая характеризуется такой потерей CD19 или изменением, обозначают в настоящем описании как "CD19-отрицательная злокачественная опухоль" или "CD19-отрицательная рецидивирующая злокачественная опухоль". Следует понимать, что CD19-отрицательная злокачественная опухоль не обязательно характеризоваться 100% потерей CD19, а достаточным снижением для того, чтобы снижать эффективность терапии CD19, таким образом, что такая злокачественная опухоль рецидивирует или становится рефрактерной. В некоторых вариантах осуществления CD19-отрицательная злокачественная опухоль является результатом терапии CD19 CAR.

Диапазоны: на всем протяжении этого описания различные аспекты изобретения могут быть предоставлены в формате диапазонов. Следует понимать, что описание в формате диапазонов приводят только для удобства и краткости, и их не следует истолковывать как негибкое ограничение объема изобретения. Таким образом, следует рассматривать, что в описании диапазона конкретно описаны все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые величины в этом диапазоне. Например, следует рассматривать, что в описании диапазона, такого как от 1 до 6, конкретно описаны поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., а также отдельные числа в этом диапазоне, например, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 и 6. Это применимо независимо от ширины диапазона.

NKR-CAR

В настоящем описании раскрыты композиции и способы регуляции специфичности и активности цитотоксических клеток, например, Т-клеток или NK-клеток, например, с неприродным химерным антигенным рецептором (CAR). В одном из вариантов осуществления CAR представляет собой NKR-CAR. NKR-CAR представляет собой CAR, который обладает общими функциональными и структурными свойствами с рецептором иммунной функции NK-клетки (или NKR). NKR и NKR-CAR описаны в настоящем описании, например, в разделе ниже. Как обсуждается ниже, ряд NKR может служить в качестве основы для NKR-CAR.

Рецепторы иммунной функции NK-клеток (NKR) и NK-клетки

Как обсуждается в настоящем описании, рецептор иммунной функции NK-клетки (или NKR) относится к эндогенному природному трансмембранному белку, экспрессируемому NK-клетками, который может взаимодействовать с лигандом на антигенпрезентирующей клетке и моделировать иммунный ответ NK-клетки, например, он может модулировать цитолитическую активность или секрецию цитокинов NK-клетки.

NK-клетки представляют собой мононуклеарные клетки, которые развиваются в костном мозге из лимфоидных предшественников, и морфологические признаки и биологические свойства, как правило, включают экспрессию детерминанты кластеров (CD) CD16, CD56 и/или CD57; отсутствие комплекса TCR альфа/бета или гамма/дельта на клеточной поверхности; способность связываться и вызывать гибель клеток-мишеней, которые не способы экспрессировать "свои" белки главного комплекса гистосовместимости (MHC)/лейкоцитарного антигена человека (HLA); и способность вызывать гибель опухолевых клеток или других пораженных клеток, которые экспрессируют лиганды к активирующим NK-рецепторам. NK-клетки характеризуются своей способностью связываться и вызывать гибель нескольких типов линий опухолевых клеток без необходимости предварительной иммунизации или активации. NK-клетки также могут высвобождать растворимые белки и цитокины, которые оказывают регулирующее действие на иммунную систему; и могут претерпевать несколько этапов клеточного деления и продуцировать дочерние клетки с биологическими свойствами аналогичными родительской клетке. После активации интерферонами и/или цитокинами NK-клетки опосредуют лизис опухолевых клеток и клеток, инфицированных внутриклеточными патогенами, посредством механизмов, для которых необходимыми являются прямые физические контакты между NK-клеткой и клеткой-мишенью. Лизис клеток-мишени включает высвобождение цитотоксических гранул NK-клеткой на поверхность связанной мишени и эффекторных белков, таких как перфорин и гранзим B, которые проникают через плазматическую мембрану мишени и индуцируют апоптоз или программируемую гибель клеток. Обычно, здоровые клетки защищены от лизиса NK-клетками.

Активность NK-клетки регулируется сложным механизмом, который включает стимулирующие и ингибирующие сигналы.

В кратком изложении, литическая активность NK-клеток регулируется различными рецепторами клеточной поверхности, которые преобразуют положительные или отрицательные внутриклеточные сигналы при взаимодействии с лигандами на клетке-мишени. Баланс между положительными и отрицательными сигналами, передаваемыми через такие рецепторы, определяет, лизирует или не лизирует (вызывает гибель) клетки-мишени NK-клетка. Стимулирующие сигналы NK-клетки могут быть опосредованы рецепторами естественной цитотоксичности (NCR), такими как NKp30, NKp44 и NKp46; а также рецепторами NKG2C, рецепторами NKG2D, определенными активирующими иммуноглобулиноподобными рецепторами клетки-киллера (KIR) и другими активирующими NK-рецепторами (Lanier, Annual Review of Immunology, 2005; 23:225-74). Ингибирующие сигналы NK-клетки могут быть опосредованы рецепторами, такими как Ly49, CD94/NKG2A, а также определенными ингибирующими KIR, которые распознают молекулы главного комплекса гистосовместимости (MHC) I класса (Karre et al., Nature, 1986; 319:675-8; Ohlen et al., Science, 1989; 246:666-8). Такие ингибирующие рецепторы связываются с полиморфными детерминантами молекул MHC I класса (включая HLA I класса), присутствующими на других клетках, и ингибируют опосредованный NK-клетками лизис.

KIR-CAR

В настоящем описании раскрыта молекула химерного антигенного рецептора (CAR), содержащая антигенсвязывающий домен и иммуноглобулиноподобный рецептор домен клетки-киллер (KIR-CAR). В одном из вариантов осуществления KIR-CAR по изобретению экспрессируется на поверхности эффекторной клетки иммунной системы, например, Т-клетки или NK-клетки.

NKCAR на основе KIR-CAR

KIR, обозначаемые как иммуноглобулиноподобные рецепторы клетки-киллер, были охарактеризованы у людей и у не являющихся человеком приматов, и представляют собой полиморфные трансмембранные молекулы 1 типа, присутствующие на определенных

подгруппах лимфоцитов, включая NK-клетки и некоторые Т-клетки. KIR взаимодействуют с детерминантами в доменах альфа 1 и 2 молекул MHC I класса, и, как описано в другом месте в настоящем описании, различные KIR являются стимулирующими или ингибирующими для NK-клеток.

Описываемые в настоящем описании NKR-CAR включают KIR-CAR, которые обладают общими функциональными и структурными свойствами с KIR.

KIR представляют собой семейство белков клеточной поверхности, встречающихся на NK-клетках. Они регулируют цитолитическую функцию таких клеток посредством взаимодействия с молекулами MHC I класса, которые экспрессируются всеми типами клеток. Это взаимодействие обеспечивает возможность детекции ими инфицированных вирусом клеток или опухолевых клеток. Большая часть KIR являются ингибирующими, что означает, что их распознавание MHC подавляет цитотоксическую активность NK-клетки, которая экспрессирует их. Только ограниченное число KIR обладают способностью активировать клетки.

Семейство генов KIR содержит по меньшей мере 15 локусов генов (KIR2DL1, KIR2DL2/L3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1/S1, KIR3DL2, KIR3DL3 и два псевдогена KIR2DP1 и KIR3DP1), кодируемых в области 100-200 т.п.н. комплекса лейкоцитарного рецепторного комплекса (LRC), локализованного на хромосоме 19 (19q13.4). LRC представляет собой большой 1 м.п.н. и плотный кластер быстро эволюционирующих гены иммунного ответа, которые содержат гены, кодирующие другие молекулы клеточной поверхности с отличными Ig-подобными внеклеточными доменами. Кроме того, удлиненный LRC содержит гены, кодирующие трансмембранные адапторные молекулы DAP10 и DAP12.

Гены KIR различаются по длине от 4 до 16 т.п.н. (полная геномная последовательность) и могут содержать от четырех до девяти экзонов. Гены KIR классифицируют как принадлежащие к одной из трех групп в соответствии с их структурными признаками: (1) гены KIR2D I типа, которые кодируют два белка внеклеточных доменов с конформацией D1 и D2; (2) структурно дивергентные гены

KIR2D II типа, которые кодируют два белка внеклеточного домена с конформацией D0 и D2; и, наконец, (3) гены KIR3D, кодирующие белки с тремя внеклеточными Ig-подобными доменами (D0, D1 и D2).

Гены KIR2D I типа, которые кодируют псевдоген KIR2DP1, а также гены KIR2DL1-3 и KIR2DS1-5, содержат восемь экзонов, а также последовательность псевдоэкзона 3. Этот псевдоэкзон инактивирован в KIR2D I типа. В некоторых случаях это обусловлено заменой нуклеотида, расположенному на участке сплайсинга интрон 2-экзон 3, где его нуклеотидная последовательность обладает идентичностью высокой степени с последовательностями экзона 3 KIR3D и характеризуется характерной делецией трех пар оснований. В других случаях преждевременный стоп-кодон инициирует дифференциальный сплайсинг экзона 3. В группе генов KIR2D I типа KIR2DL1 и KIR2DL2 имеют общую делецию в экзоне 7, отличающую их от всех других KIR в этом экзоне, что приводит к более короткой последовательности экзона 7. Аналогично, в KIR2D I типа KIR2DL1-3 отличается от KIR2DS1-5 только длиной области, кодирующей цитоплазматический хвост, в экзоне 9. Структура псевдогена KIR2DP1 отличается от структуры KIR2DL1-3 тем, что первая имеет более короткую последовательность экзона 4 вследствие делеции одной пары оснований.

Гены KIR2D II типа включают KIR2DL4 и KIR2DL5. В отличие от KIR3D и KIR2D I типа в KIR2D II типа характерным образом удалена область, соответствующая экзону 4 во всех других KIR. Кроме того, гены KIR2D II типа отличаются от гены KIR2D I типа тем, что первые содержат транслируемый экзон 3, тогда как гены KIR2D I типа на его месте содержат нетранслируемую последовательность псевдоэкзона 3. В генах IKIR2D I типа KIR2DL4 дополнительно отличается от KIR2DL5 (а также от других генов KIR) длиной своей последовательности экзона 1. Выявлено, что в KIR2DL4 экзон 1 является на шесть нуклеотидов длиннее и содержат инициирующий кодон, отличный от инициирующего кодона, содержащегося в других генах KIR. Такой инициирующий кодон лучше согласуется с "консенсусной последовательностью Козак инициации транскрипции", чем второй возможный инициирующий кодон в KIR2DL4, который

соответствует инициирующему кодону, содержащемуся в других генах KIR.

Гены KIR3D содержат девять экзонов и включают структурно родственные гены KIR3DL1, KIR3DS1, KIR3DL2 и KIR3DL3. Нуклеотидные последовательности KIR3DL2 являются самыми длинными из всех генов KIR и охватывают 16256 п.н. в полногеномных последовательностях и 1368 п.н. в кДНК. В группе KIR3D четыре гена KIR отличаются длиной области, кодирующей цитоплазматический хвост в экзоне 9. Длина цитоплазматического хвоста белков KIR может изменяться от 14 аминокислотных остатков в длину (в некоторых аллелях KIR3DS1) до 108 аминокислотных остатков в длину (в белках KIR2DL4). Кроме того, KIR3DS1 отличается от KIR3DL1 или KIR3DL2 тем, что первый содержит более короткую последовательность экзона 8. KIR3DL3 отличается от других последовательностей KIR тем, что он абсолютно не содержит экзон 6. Наибольшее наблюдаемое отличие структуры генов KIR ген представляло собой отличие структуры KIR3DP1. Этот фрагмент гена абсолютно не содержит экзоны 6-9, и в редких случаях только экзон 2. Оставшиеся участки гена, которые содержатся (экзон 1, 3, 4 и 5), обладают высоким уровнем идентичности последовательности с другими последовательностями KIR3D, в частности с последовательностями KIR3DL3.

Белки KIR содержат характерные Ig-подобные домены в своих внеклеточных областях, которые в некоторых белках KIR участвуют в связывании лиганда HLA I класса. Они также содержат трансмембранные и цитоплазматические области, которые являются функционально релевантными, т.к. они определяют тип сигнала, который преобразуется в NK-клетке. Белки KIR могут содержать два или три Ig-подобных домена (таким образом, KIR2D или KIR3D), а также короткие или длинные цитоплазматические хвосты (предоставляемые как KIR2DS или KIR2DL). Два доменных белка KIR разделяют на две группы в зависимости от происхождения содержащихся мембранно-дистальных Ig-подобных доменов. Белки KIR2D I типа (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4 и KIR2DS5) содержат мембранно-дистальный Ig-подобный домен, аналогичный по происхождению Ig-подобному домену

D1 KIR3D, но не содержит домен D0. Этот Ig-подобный домен D1 кодируется в основном четвертым экзоном соответствующих генов KIR. Белки IKIR2D I типа, KIR2DL4 и KIR2DL5, содержат мембранно-дистальный Ig-подобный домен последовательности, аналогичной домену D0, содержащемуся в белках KIR3D, однако IKIR2D I типа не содержит домен D1. Длинные цитоплазматические хвосты, как правило, содержат два иммунорецепторных тирозиновых ингибирующих мотива (ITIM), которые преобразуют ингибирующие сигналы в NK-клетке. Короткие цитоплазматические хвосты содержат положительно заряженный аминокислотный остаток в своей трансмембранной области, который позволяет им связываться с сигнальной молекулой DAP12, способной генерировать активирующий сигнал.

Исключением из этого является KIR2DL4, который содержит только один ITIM на N-конце. Кроме того, KIR2DL4 также содержит заряженный остаток (аргинин) в своем трансмембранном домене, свойство, которое обеспечивает возможность этому рецептору вызывать как ингибирующие, так и активирующие сигналы. KIR регулирует ответ NK-клеток человека путем, поставляя ингибирующие или активирующие сигналы при распознавании лигандов MHC I класса на поверхности возможных клеток-мишеней.

Длина белков KIR изменяется от 306 до 456 аминокислотных остатков. Хотя различия длины белков являются в основном следствием числа содержащихся Ig-подобных доменов, разность длины цитоплазматических областей также является фактором, оказывающим влияние. Длина лидерного пептида большинства белков KIR составляет 21 аминокислотный остаток. Однако наличие различного инициирующего кодона приводит к образованию соответственно более длинного лидерного пептида в белках KIR2DL4.

Длина Ig-подобного домена D0, содержащегося в белках IKIR2D I типа и белках KIR3D, составляет приблизительно 96 аминокислотных остатков. Длина домена D1 белков KIR2D I типа и KIR3D составляет 102 аминокислотных остатка, тогда как длина домена D2 всех белков KIR составляет 98 аминокислотных остатка. Длина области стебля изменяется от 24 аминокислотных остатков, содержащихся в большей части белков KIR, до всего семи

аминокислотных остатков в дивергентном белке KIR3DL3. Длина трансмембранной области составляет 20 аминокислотных остатков для большинства белков KIR, но один остаток короче в белках KIR2DL1 и KIR2DL2 в результате три делеции пары оснований в экзоне 7. В заключении, цитоплазматическая область белков KIR характеризуется большими диапазонами изменения длины, в диапазоне от 23 аминокислотных остатков в некоторых аллелях KIR3DS1 до 96 аминокислотных остатков, содержащихся в белках KIR3DL2.

Аминокислотные последовательности полипептиды KIR человека (*Homo sapiens*) доступны в базе данных NCBI e, см. например, номер доступа NP_037421.2 (GI:134268644), NP_703144.2 (GI:46488946), NP_001229796.1 (GI:338968852), NP_001229796.1 (GI:338968852), NP_006728.2 (GI:134268642), NP_065396.1 (GI: 11968154), NP_001018091.1 (GI:66267727), NP_001077008.1 (GI:134133244), NP_036444.1 (GI:6912472), NP_055327.1 (GI:7657277), NP_056952,.2 (GI:71143139), NP_036446.3 (GI:116517309), NP_001074239.1 (GI:124107610), NP_002246.5 (GI: 124107606), NP_001074241.1 (GI: 124107604), NP_036445.1 (GI:6912474).

Номенклатура для KIR основана на количестве внеклеточных доменов (где KIR2D и KIR3D содержат два и три внеклеточных Ig-домена, соответственно) и на том, является ли цитоплазматический хвост длинным (KIR2DL или KIR3DL) или коротким (KIR2DS или KIR3DS). Присутствие или отсутствие данного KIR изменяется от одной NK-клетки к другой в популяции NK, представленной у одного индивидуума. Среди людей также существуют относительно высокий уровень полиморфизма генов KIR, где определенные KIR гены присутствуют у некоторых, но не у всех индивидуумов. Экспрессия аллелей KIR в NK-клетках регулируется стохастически, что означает, что у данного индивидуума данный лимфоцит может экспрессировать один, два или более различных KIR в зависимости от генотипа индивидуума. NK-клетки одного индивидуума, как правило, экспрессируют различные комбинации KIR, обеспечивая репертуар NK-клеток с различными специфичностями к молекулам MHC I класса.

Определенные продукты генов KIR вызывают стимуляцию активности лимфоцитов при связывании с соответствующим лигандом. Все активирующие KIR содержат короткий цитоплазматический хвост с заряженным трансмембранным остатком, который связывается с адапторной молекулой, содержащей иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM), которые преобразуют стимулирующие сигналы в NK-клетку. В отличие от этого, ингибирующие KIR содержат длинный цитоплазматический хвост, содержащий иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM), который преобразует ингибирующие сигналы в NK-клетке при взаимодействии с их лигандами MHC I класса. Известные ингибирующие KIR включают представителей подсемейств KIR2DL и KIR3DL. Ингибирующие KIR, содержащие два домена Ig (KIR2DL), распознают аллотипы HLA-C: KIR2DL2 (ранее обозначаемый p58.2) и близкородственный аллельный продукт гена KIR2DL3 распознают аллотипы HLA-C "группы 1" (включая HLA-Cw1, -3, -7 и -8), тогда как KIR2DL1 (p58.1) распознает аллотипы HLA-C "группы 2" (такие как HLA-Cw2, -4, -5 и -6). Распознавание KIR2DL1 обусловлено наличием остатка Lys в положении 80 аллелей HLA-C. Распознавание KIR2DL2 и KIR2DL3 обусловлено наличием остатка Asn в положении 80 в HLA-C. Следует отметить, что подавляющее большинство аллелей HLA-C содержит остаток Asn или Lys в положении 80. Таким образом, KIR2DL1, -2 и -3 совместно распознают по существу все аллотипы HLA-C, встречающиеся у людей. Один KIR с тремя доменами Ig, KIR3DL1 (p70), распознает эпитоп, общий для аллелей HLA-Bw4. В заключении, KIR3DL2 (p140), гомодимер молекул с тремя домены Ig распознает HLA-A3 и -A11.

Однако изобретение не следует ограничивать ингибирующими KIR, содержащими цитоплазматический хвост, содержащий ITIM. Наоборот, любой ингибирующий белок, содержащий цитоплазматический домен, который экспрессируется с ингибирующим сигналом, можно использовать в конструировании CAR по изобретению. Неограничивающие примеры ингибирующего белка включают, но не ограничиваются ими, CTLA-4, PD-1 и т.п. Известно, что эти белки ингибируют активацию Т-клеток.

Таким образом, изобретение относится к KIR-CAR, содержащему внеклеточный домен, который содержит специфический к мишени связывающий элемент, иным образом обозначаемый как антигенсвязывающий домен, слитый с KIR или его фрагментом. В одном из вариантов осуществления KIR представляет собой активирующий KIR, который содержит короткий цитоплазматический хвост, который связывается с адапторной молекулой, содержащей иммунорецепторные тирозиновые активирующие мотивы (ITAM), которые преобразуют стимулирующие сигналы в NK-клетку (обозначаемые в другом месте в настоящем описании как actKIR-CAR). В одном из вариантов осуществления KIR представляет собой ингибирующий KIR, который содержит длинный цитоплазматический хвост, содержащий иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM), который преобразует ингибирующие сигналы (обозначаемый в другом месте в настоящем описании как inhKIR-CAR). В некоторых случаях при конструкции actKIR-CAR желательным является удаление шарнирной области для активирующих KIR. Это обусловлено тем, что изобретение частично основано на открытии того, что активирующий KIR-CAR, в котором удаляли шарнир KIR2DS2 для получения CAR KIR2S, такой CAR KIRS2 обладал повышенной цитолитической активностью по сравнению с actKIR-CAR, содержащим полноразмерный KIR2DS2 дикого типа.

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие желаемые молекулы по изобретению, можно получать известными в данной области рекомбинантными способами, такими как, например, скринингом библиотек из клеток, экспрессирующих ген, доставкой гена из вектора, для которого известно, что он содержит ген, или выделением непосредственно из клеток и тканей, содержащих ген, стандартными способами. Альтернативно, представляющий интерес ген можно получать синтезом, а не клонировать.

Настоящее изобретение относится к конструкциям ретровирусного и лентивирусного вектора, экспрессирующим KIR-CAR, которые можно непосредственно трансдуцировать в клетку. Настоящее изобретение также относится к конструкции РНК, которую можно непосредственно трансдуцировать в клетку. Способ получения иРНК для применения в трансфекции включает транскрипцию *in vitro*

(IVT) матрицы со специально сконструированными праймерами с последующим добавлением поли(A) с получением конструкции, содержащей 3'- и 5'-нетранслируемую последовательность ("UTR"), 5'-кэп и/или внутренний участок связывания рибосомы (IRES), ген, который необходимо экспрессировать, и хвост поли(A) длиной, как правило, 50-2000 оснований. Получаемой таким образом РНК можно эффективно трансфицировать различные виды клеток. В одном из вариантов осуществления матрица включает последовательности KIR-CAR.

В одном из вариантов осуществления KIR-CAR содержит антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен KIR. В одном из вариантов осуществления KIR-CAR содержит антигенсвязывающий домен и KIR внутриклеточный домен, например, внутриклеточный домен inhKIR.

Домен D KIR, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену D0, D1 или D2 KIR.

Домен D KIR, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами домена D KIR.

Домен D0 KIR, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену D0 KIR. В одном из вариантов осуществления домен D0 KIR KIR-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным доменом D0 KIR или доменом D0 KIR, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления домен D0 KIR KIR-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного домена D0 KIR или домена D0 KIR, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления домен D0 KIR KIR-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного домена D0 KIR или домена D0 KIR, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления домен D0 KIR KIR-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным доменом D0 KIR или доменом D0 KIR, описываемым в настоящем описании.

Домен D1 KIR, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами домена D1 KIR. В одном из вариантов осуществления домен D1 KIR KIR-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным доменом D1 KIR или доменом D1 KIR, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления домен D1 KIR KIR-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного домена D1 KIR или домена D1 KIR, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления домен D1 KIR KIR-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного домена D0 KIR или домена D1 KIR, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления домен D1 KIR KIR-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным доменом D1 KIR или доменом D1 KIR, описываемым в настоящем описании.

Домен D2 KIR, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами домена D2 KIR. В одном из вариантов осуществления домен D2 KIR KIR-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным доменом D2 KIR или доменом D2 KIR, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления домен D2 KIR KIR-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного домена D2 KIR или домена D2 KIR, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления домен D2 KIR KIR-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного домена D2 KIR или домена D2 KIR, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления домен D2 KIR KIR-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным доменом D2 KIR или доменом D2 KIR, описываемым в настоящем описании.

Шарнирный или стеблевой домен KIR, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами шарнирного или стеблевого домена KIR. В одном из вариантов осуществления шарнирный или стеблевой домен KIR KIR-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным шарнирным или стеблевым доменом KIR или шарнирным или стеблевым доменом KIR, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления шарнирный или стеблевой домен KIR KIR-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного шарнирного или стеблевого домена KIR или шарнирного или стеблевого домена KIR, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления шарнирный или стеблевой домен KIR KIR-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного шарнирного или стеблевого домена KIR или шарнирного или стеблевого домена KIR, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления шарнирный или стеблевой домен KIR KIR-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным шарнирным или стеблевым доменом KIR или шарнирным или стеблевым доменом KIR, описываемым в настоящем описании.

Трансмембранный домен KIR, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами трансмембранного домена KIR. В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен KIR KIR-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным трансмембранным доменом KIR или трансмембранным доменом KIR, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления трансмембранный домен KIR KIR-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природным трансмембранным доменом KIR или трансмембранным доменом KIR, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления трансмембранный домен KIR

KIR-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природным трансмембранным доменом KIR или трансмембранным доменом KIR, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления трансмембранный домен KIR KIR-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным трансмембранным доменом KIR или трансмембранным доменом KIR, описываемым в настоящем описании.

Внутриклеточный домен KIR, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами внутриклеточного домена KIR. Внутриклеточный домены KIR содержит внутриклеточный домены ингибирующего KIR (обозначаемые в настоящем описании как внутриклеточные домены inhKIR) и внутриклеточные домены активирующего KIR (обозначаемые в настоящем описании как внутриклеточные домены actKIR). В одном из вариантов осуществления внутриклеточный домен inhKIR содержит последовательность ITIM. В одном из вариантов осуществления внутриклеточный домен KIR KIR-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внутриклеточным доменом KIR или внутриклеточным доменом KIR, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления внутриклеточный домен KIR KIR-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного внутриклеточного домена KIR или внутриклеточного домена KIR, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внутриклеточный домен KIR KIR-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного внутриклеточного домена KIR или внутриклеточного домена KIR, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внутриклеточный домен KIR KIR-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природного внутриклеточного домена KIR или внутриклеточного домена KIR, описываемого в настоящем описании.

NCR

NKR-CAR, описываемый в настоящем описании, включает NCR-CAR, которые обладают общими функциональными и структурными свойствами с NCR.

Естественные киллерные (NK) клетки представляют собой цитотоксические лимфоидные клетки, специализирующиеся в разрушении опухолей и инфицированных вирусами клеток. В отличие от цитотоксических Т-лимфоцитов NK-клетки не экспрессируют антигенспецифические рецепторы. Распознавание трансформированных клеток происходит посредством связывания большого числа рецепторов клеточной поверхности с поверхностными маркерами на клетке-мишени. Рецепторы поверхности клеток-NK можно различать в зависимости от того, активируют или ингибируют они опосредованную NK-клетками цитотоксичность. Различные взаимодействия между различными рецепторами, по-видимому, приводят к формированию синапсов между NK-клетками и клетками-мишенями. Интеграция активирующих и ингибирующих сигналов в синапсе обуславливает, проявляют или не проявляют NK-клетки свою цитолитическую функцию на клетку-мишень. Среди активирующих рецепторов семейство Ig-подобных молекул называют рецепторами естественной цитотоксичности (NCR). Такие рецепторы естественной цитотоксичности включают молекулы NKp30, NKp44 и NKp46. NCR являются ключевыми активирующими рецепторами NK-клеток в распознавании опухолевых клеток. Все три NCR участвуют в клиренсе опухолевых и инфицированных вирусами клеток. В последних противовирусная активность инициируется взаимодействием NKp44 с гемагглютинином вируса гриппа или вируса Сендай. NKp46 направленно воздействует на инфицированные вирусом клетки посредством связывания с гемагглютинином вируса гриппа или гемагглютинином-нейраминидазой вируса Сендай. В противоположность этому, показано, что опосредованная NK-клетками цитотоксичность ингибируется связыванием NKp30 с белок pp65 цитомегаловируса человека (см., например, Arnon et al., Nat. Immunol., (2005) 6:515-523).

Аминокислотные последовательности полипептидов NCR человека (*Homo sapiens*) доступны в базе данных NCBI, см. например, номер доступа NP_004819.2 (GI:153945782), O14931.1 (GI:47605770),

O95944.2 (GI:251757303), O76036.1 (GI:47605775), NP_001138939.1 (GI:224586865) и/или NP_001138938.1 (GI:224586860).

В одном из вариантов осуществления NCR-CAR содержит антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен NCR. В одном из вариантов осуществления KIR-CAR содержит антигенсвязывающий домен и NCR внутриклеточный домен.

Внеклеточный домен NCR, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами внеклеточного домена NCR. В одном из вариантов осуществления внеклеточный домен NCR NCR-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внеклеточным доменом NCR или внеклеточным доменом NCR, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления внеклеточный домен NCR NCR-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного внеклеточного домена NCR или внеклеточного домена NCR, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внеклеточный домен NCR NCR-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного внеклеточного домена NCR или внеклеточного домена NCR, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внеклеточный домен NCR NCR-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внеклеточным доменом NCR или внеклеточным доменом NCR, описываемым в настоящем описании.

Шарнирный или стеблевой домен NCR, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами шарнирного или стеблевого домена NCR. В одном из вариантов осуществления шарнирный или стеблевой домен NCR NCR-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным шарнирным или стеблевым доменом NCR или шарнирным или стеблевым доменом NCR, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления шарнирный или стеблевой домен NCR NCR-CAR отличается не более чем на 15, 10,

5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного шарнирного или стеблевого домена NCR или шарнирного или стеблевого домена NCR, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления шарнирный или стеблевой домен NCR NCR-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного шарнирного или стеблевого домена NCR или шарнирного или стеблевого домена NCR, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления шарнирный или стеблевой домен NCR NCR-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным шарнирным или стеблевым доменом NCR или шарнирным или стеблевым доменом NCR, описываемым в настоящем описании.

Трансмембранный домен NCR, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами трансмембранного домена NCR. В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен NCR NCR-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным трансмембранным доменом NCR или трансмембранным доменом NCR, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления трансмембранный домен NCR NCR-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного трансмембранного домена NCR или трансмембранного домена NCR, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления трансмембранный домен NCR NCR-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного трансмембранного домена NCR или трансмембранного домена NCR, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления трансмембранный домен NCR NCR-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным трансмембранным доменом NCR или трансмембранным доменом NCR, описываемым в настоящем описании.

Внутриклеточный домен NCR, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему

структурными и функциональными свойствами внутриклеточного домена NCR. В одном из вариантов осуществления внутриклеточный домен NCR NCR-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внутриклеточным доменом NCR или внутриклеточным доменом NCR, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления внутриклеточный домен NCR NCR-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного внутриклеточного домена NCR или внутриклеточного домена NCR, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внутриклеточный домен NCR NCR-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного внутриклеточного домена NCR или внутриклеточного домена NCR, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внутриклеточный домен NCR NCR-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внутриклеточным доменом NCR или внутриклеточным доменом NCR, описываемым в настоящем описании.

Рецепторы SLAM

NKR-CAR, описываемые в настоящем описании, включают SLAMF-CAR, которые обладают общими функциональными и структурными свойствами с SLAMF.

Семейство активирующих лимфоциты сигнальных молекула (SLAM) рецепторов иммунной клетки является близкородственным семейству CD2 суперсемейства молекул иммуноглобулина (Ig). В настоящее время семейство SLAM (SLAMF) включает девять представителей, навеваемых SLAM, CD48, CD229, 2B4, CD84, NTB-A, CRACC, BLAME и CD2F-10. В основном, молекулы SLAM содержат от двух до четырех внеклеточных доменов Ig, трансмембранный сегмент и внутриклеточную богатую тирозином область. Молекулы дифференциально экспрессируются различными типами клеток иммунной системы. Несколько из них являются собственными лигандами, и SLAM идентифицировали как рецептор вируса кори человека. Известно, что несколько небольших содержащих SH2 адапторных белков связываются с внутриклеточными доменами

представителей семейства SLAM и модулируют передачу сигналов рецептора, включая SH2D1A (также известный как SLAM-ассоциированный белок [SAP]) и SH2D1B (также известный как EAT2). Например, в Т-клетках и NK-клетках активированные рецепторы семейства SLAM становятся фосфорилированными по тирозину и рекрутируют адаптор SAP, а затем киназу Fyn Src. Последующий каскад передачи сигнала влияет на результат взаимодействий Т-клетка-антигенпрезентирующая клетка и NK-клетка-клетка-мишень.

Аминокислотные последовательности рецептора полипептидов SLAM человека (*Homo sapiens*) являются доступными в базе данных NCBI, см. например, номер доступа NP_057466.1 (GI: 7706529), NP_067004.3 (GI: 19923572), NP_003028.1 (GI:4506969), NP_001171808.1 (GI: 296434285), NP_001171643.1 (GI:296040491), NP_001769.2 (GI:21361571), NP_254273.2 (GI: 226342990), NP_064510.1 (GI: 9910342) и/или NP_002339.2 (GI: 55925578).

В одном из вариантов осуществления SLAMF-CAR содержит антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен SLAMF. В одном из вариантов осуществления SLAMF-CAR содержит антигенсвязывающий домен и внутриклеточный домен SLAMF.

Внеклеточный домен SLAMF, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами внеклеточного домена SLAMF. В одном из вариантов осуществления внеклеточный домен SLAMF SLAMF-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внеклеточным доменом SLAMF или внеклеточным доменом SLAMF, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления внеклеточный домен SLAMF SLAMF-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного внеклеточного домена SLAMF или внеклеточного домена SLAMF, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внеклеточный домен SLAMF SLAMF-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного внеклеточного домена SLAMF или внеклеточного домена SLAMF, описываемого в

настоящем описании. В вариантах осуществления внеклеточный домен SLAMF SLAMF-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внеклеточным доменом SLAMF или внеклеточным доменом SLAMF, описываемым в настоящем описании.

Шарнирный или стеблевой домен SLAMF, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами шарнирного или стеблевого домена SLAMF. В одном из вариантов осуществления шарнирный или стеблевой домен SLAMF SLAMF-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным шарнирным или стеблевым доменом SLAMF или шарнирным или стеблевым доменом SLAMF, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления шарнирный или стеблевой домен SLAMF SLAMF-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного шарнирного или стеблевого домена SLAMF или шарнирного или стеблевого домена SLAMF, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления шарнирный или стеблевой домен SLAMF SLAMF-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного шарнирного или стеблевого домена SLAMF или шарнирного или стеблевого домена SLAMF, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления шарнирный или стеблевой домен SLAMF SLAMF-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным шарнирным или стеблевым доменом SLAMF или шарнирным или стеблевым доменом SLAMF, описываемым в настоящем описании.

Трансмембранный домен SLAMF, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами трансмембранного домена SLAMF. В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен SLAMF SLAMF-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным трансмембранным доменом SLAMF или трансмембранным

доменом SLAMF, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления трансмембранный домен SLAMF SLAMF-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного трансмембранного домена SLAMF или трансмембранного домена SLAMF, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления трансмембранный домен SLAMF SLAMF-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного трансмембранного домена SLAMF или трансмембранного домена SLAMF, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления трансмембранный домен SLAMF SLAMF-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным трансмембранным доменом SLAMF или трансмембранным доменом SLAMF, описываемым в настоящем описании.

Внутриклеточный домен SLAMF, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами внутриклеточного домена SLAMF. В одном из вариантов осуществления SLAMF внутриклеточный домен SLAMF-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внутриклеточным доменом SLAMF или внутриклеточным доменом SLAMF, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления внутриклеточный домен SLAMF SLAMF-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного внутриклеточного домена SLAMF или внутриклеточного домена SLAMF, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внутриклеточный домен SLAMF SLAMF-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного внутриклеточного домена SLAMF или внутриклеточного домена SLAMF, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внутриклеточный домен SLAMF SLAMF-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внутриклеточным доменом SLAMF или внутриклеточным доменом SLAMF, описываемым в настоящем описании.

Fc-связывающие рецепторы

NKR-CAR, описываемые в настоящем описании, включают CAR на основе Fc-рецепторов, FcR-CAR, например, CD16-CAR и CD64-CAR, которые обладают общими функциональными и структурными свойствами с CD16 и CD64.

При активации NK-клетки продуцируют в большом количестве цитокины и хемокины и одновременно обладают высокой цитолитической активностью. Активация NK-клеток может происходить через прямое связывание рецепторов NK-клеток с лигандами на клетке-мишени, как можно видеть при непосредственном цитолизе опухолевых клеток, или через перекрестное связывание Fc-рецептора (CD 16; FcγRIII) в результате связывания участка Fc антител, связанных с несущей антиген клеткой. Такое участие CD16 (перекрестное связывание CD16) инициирует ответы NK-клеток посредством внутриклеточных сигналов, которые получают через одну или оба связанных с CD16 адапторных цепей, FcRγ или CD3ζ. Вовлечение CD16 приводит к фосфорилированию γ- или ζ-цепи, которая в свою очередь рекрутирует тирозинкиназы, syk и ZAP-70, инициируя каскад передачи сигнала, что приводит к быстрым и эффективным эффекторным функциям. Наиболее хорошо известной эффекторной функцией является высвобождение цитоплазматических гранул, несущих токсические белки для уничтожения находящихся поблизости клеток-мишеней посредством процесса антителозависимой клеточной цитотоксичности. Перекрестное связывание с CD16 также приводит к продукции цитокинов и хемокинов, которые в свою очередь активируют и регулирует серию иммунных ответов.

Однако в отличие от T- и B-лимфоцитов полагают, что NK-клетки обладают только ограниченной способностью распознавания мишени с использованием кодируемых зародышевой линией активирующих рецепторов (Bottino et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 298:175-182 (2006); Stewart et al., Curr. Top.. Microbiol. Immunol., 298:1-21 (2006)). NK-клетки экспрессируют активирующий Fc-рецептор CD 16, который распознает покрытые IgG клетки-мишени, таким образом расширяя распознавание мишени

(Ravetch and Bolland, Annu. Rev. Immunol., 19:275-290 (2001); Lanier, Nat. Immunol., 9(5):495-502 (2008); Bryceson and Long, Curr. Opin. Immunol., 20(3):344-352 (2008)). Для активности экспрессии и передачи сигнала нескольких активирующих рецепторов NK-клетки необходимыми являются физически связанные адапторы, которые преобразуют сигналы посредством иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов (ITAM). Среди таких адапторов цепи FcRγ и CD3ζ могут связываться с CD16 и рецепторами естественной цитотоксичности (NCR) в виде подобных дисульфиду гомодимеров или гетеродимеров, и полагали, что такие цепи экспрессируются всеми зрелыми NK-клетками.

Аминокислотная последовательность CD16 (*Homo sapiens*) является доступной в базе данных NCBI, см. например, номер доступа NP_000560.5 (GI: 50726979), NP_001231682.1 (GI: 348041254).

В одном из вариантов осуществления FcR-CAR содержит антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен FcR. В одном из вариантов осуществления FcR-CAR содержит антигенсвязывающий домен и внутриклеточный домен FcR.

Внеклеточный домен CD16, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами внеклеточного домена CD16. В одном из вариантов осуществления внеклеточный домен CD16 CD16-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внеклеточным доменом CD16 или внеклеточным доменом CD16, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления внеклеточный домен CD16 CD16-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного внеклеточного домена CD16 или внеклеточного домена CD16, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внеклеточный домен CD16 CD16-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного внеклеточного домена CD16 или внеклеточного домена CD16, описываемого в настоящем

описании. В вариантах осуществления внеклеточный домен CD16 CD16-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внеклеточным доменом CD16 или внеклеточным доменом CD16, описываемым в настоящем описании.

Шарнирный или стеблевой домен CD16, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами шарнирного или стеблевого домена CD16. В одном из вариантов осуществления шарнирный или стеблевой домен CD16 CD16-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным шарнирным или стеблевым доменом CD16 или шарнирным или стеблевым доменом CD16, описываем в настоящем описании. В вариантах осуществления шарнирный или стеблевой домен CD16 CD16-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного шарнирного или стеблевого домена CD16 или шарнирного или стеблевого домена CD16, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления шарнирный или стеблевой домен CD16 CD16-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного шарнирного или стеблевого домена CD16 или шарнирного или стеблевого домена CD16, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления шарнирный или стеблевой домен CD16 CD16-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным шарнирным или стеблевым доменом CD16 или шарнирным или стеблевым доменом CD16, описываемым в настоящем описании.

Трансмембранный домен CD16, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами трансмембранного домена CD16. В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен CD16 CD16-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным трансмембранным доменом CD16 или трансмембранным доменом CD16, описываемым в настоящем описании. В вариантах

осуществления трансмембранный домен CD16 CD16-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного трансмембранного домена CD16 или трансмембранного домена CD16, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления трансмембранный домен CD16 CD16-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного трансмембранного домена CD16 или трансмембранного домена CD16, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления трансмембранный домен CD16 CD16-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным трансмембранным доменом CD16 или трансмембранным доменом CD16, описываемым в настоящем описании.

Внутриклеточный домен CD16, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами внутриклеточного домена CD16. В одном из вариантов осуществления внутриклеточный домен CD16 CD16-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внутриклеточным доменом CD16 или внутриклеточным доменом CD16, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления внутриклеточный домен CD16 CD16-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного внутриклеточного домена CD16 или внутриклеточного домена CD16, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внутриклеточный домен CD16 CD16-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного внутриклеточного домена CD16 или внутриклеточного домена CD16, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внутриклеточный домен CD16 CD16-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внутриклеточным доменом CD16 или внутриклеточным доменом CD16, описываемым в настоящем описании.

Внеклеточный домен CD64, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему

структурными и функциональными свойствами внеклеточного домена CD64. В одном из вариантов осуществления внеклеточный домен CD64 CD64-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внеклеточным доменом CD64 или внеклеточным доменом CD64, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления внеклеточный домен CD64 CD64-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного внеклеточного домена CD64 или внеклеточного домена CD64, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внеклеточный домен CD64 CD64-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного внеклеточного домена CD64 или внеклеточного домена CD64, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внеклеточный домен CD64 CD64-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природного внеклеточного домена CD64 или внеклеточного домена CD64, описываемого в настоящем описании.

Шарнирный или стеблевой домен CD64, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами шарнирного или стеблевого домена CD64. В одном из вариантов осуществления шарнирный или стеблевой домен CD64 CD64-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным шарнирным или стеблевым доменом CD64 или шарнирным или стеблевым доменом CD64, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления шарнирный или стеблевой домен CD64 CD64-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного шарнирного или стеблевого домена CD64 или шарнирного или стеблевого домена CD64, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления шарнирный или стеблевой домен CD64 CD64-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного шарнирного или

стеблевого домена CD64 или шарнирного или стеблевого домена CD64, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления шарнирный или стеблевой домен CD64 CD64-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным шарнирным или стеблевым доменом CD64 или шарнирным или стеблевым доменом CD64, описываемым в настоящем описании.

Трансмембранный домен CD64, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами трансмембранного домена CD64. В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен CD64 CD64-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным трансмембранным доменом CD64 или трансмембранным доменом CD64, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления трансмембранный домен CD64 CD64-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного трансмембранного домена CD64 или трансмембранного домена CD64, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления трансмембранный домен CD64 CD64-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного трансмембранного домена CD64 или трансмембранного домена CD64, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления трансмембранный домен CD64 CD64-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным трансмембранным доменом CD64 или трансмембранным доменом CD64, описываемым в настоящем описании.

Внутриклеточный домен CD64, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами внутриклеточного домена CD64. В одном из вариантов осуществления внутриклеточный домен CD64 CD64-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внутриклеточным доменом CD64 или внутриклеточным доменом CD64 описываемым в настоящем описании. В вариантах

осуществления внутриклеточный домен CD64 CD64-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного внутриклеточного домена CD64 или внутриклеточного домена CD64, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внутриклеточный домен CD64 CD64-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного внутриклеточного домена CD64 или внутриклеточного домена CD64, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внутриклеточный домен CD64 CD64-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внутриклеточным доменом CD64 или внутриклеточным доменом CD64, описываемым в настоящем описании.

Ly49 и родственные лектиноподобные рецепторы киллерных клеток

Описываем в настоящем описании NKR-CAR, включают Ly49-CAR, которые обладают общими функциональными и структурными свойствами с Ly49.

Рецепторы Ly49 происходят по меньшей мере из 23 идентифицированных генов (Ly49A-W) у мыши. Эти рецепторы играют многие общие роли в NK-клетках и T-клетках мышей, какие играли KIR у людей, не смотря на их отличную структуру (интегральных мембранных белков II типа суперсемейства лектинов C-типа), и они также характеризуются значительной степенью генетической изменчивости, как и KIR человека. Заметное функциональное сходство рецепторов Ly49 и KIR позволяет предположить, что эти группы рецепторов развивались независимо, даже сходно для выполнения одних и тех же физиологических функций в NK-клетках и T-клетках.

Аналогично KIR у людей различные рецепторы Ly49 распознают различные аллели MHC I класса и дифференциально экспрессируются подпопуляциями NK-клеток. Исходные классические рецепторы Ly49, Ly49A и Ly49C содержат цитоплазматический домен, несущий два иммунорецепторных тирозиновых ингибирующих мотива (ITIM), аналогичных ингибирующим KIR, таким как KIR2DL3. Идентифицировано, что такие домены рекрутируют фосфатазу, SHP-1

и так же как ингибирующие KIR служат для ограничения активации NK-клеток и Т-клеток. В дополнение к ингибирующим молекулам Ly49 несколько представителей семейства, таких как Ly49D и Ly49H, утратили содержащие ITIM домены и вместо них приобрели способность взаимодействовать с сигнальной адапторной молекулой, DAP12 аналогично активирующим KIR, таким как KIR2DS2 у людей.

Аминокислотные последовательности представителей семейства Ly49 являются доступными в базе данных NCBI, см. например, номера доступа AAF82184.1 (GI: 9230810), AAF99547.1 (GI: 9801837), NP_034778.2 (GI: 133922593), NP_034779.1 (GI: 6754462), NP_001095090.1 (GI: 197333718), NP_034776.1 (GI: 21327665), AAK11559.1 (GI: 13021834) и/или NP_038822.3 (GI: 9256549).

В одном из вариантов осуществления Ly49-CAR содержит антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен Ly49. В одном из вариантов осуществления Ly49-CAR содержит антигенсвязывающий домен и внутриклеточный домен Ly49.

Внеклеточный домен LY49, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами внеклеточного домена LY49. В одном из вариантов осуществления внеклеточный домен LY49 LY49-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внеклеточным доменом LY49 или а внеклеточным доменом LY49, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления внеклеточный домен LY49 LY49-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного внеклеточного домена LY49 или внеклеточного домена LY49, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внеклеточный домен LY49 LY49-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного внеклеточного домена LY49 или внеклеточного домена LY49, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внеклеточный домен LY49 LY49-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внеклеточным доменом

LY49 или внеклеточным доменом LY49, описываемым в настоящем описании.

Шарнирный или стеблевой домен LY49, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами шарнирного или стеблевого домена LY49. В одном из вариантов осуществления шарнирный или стеблевой домен LY49 LY49-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным шарнирным или стеблевым доменом LY49 или шарнирным или стеблевым доменом LY49, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления шарнирный или стеблевой домен LY49 LY49-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного шарнирного или стеблевого домена LY49 или шарнирного или стеблевого домена LY49, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления шарнирный или стеблевой домен LY49 LY49-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного шарнирного или стеблевого домена LY49 или шарнирного или стеблевого домена LY49, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления шарнирный или стеблевой домен LY49 LY49-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным шарнирным или стеблевым доменом LY49 или шарнирным или стеблевым доменом LY49, описываемым в настоящем описании.

Трансмембранный домен LY49, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами трансмембранного домена LY49. В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен LY49 LY49-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным трансмембранным доменом LY49 или трансмембранным доменом LY49, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления трансмембранный домен LY49 LY49-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной

последовательности, например, природного трансмембранного домена LY49 или трансмембранного домена LY49, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления трансмембранный домен LY49 LY49-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного трансмембранного домена LY49 или трансмембранного домена LY49, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления трансмембранный домен LY49 LY49-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным трансмембранным доменом LY49 или трансмембранным доменом LY49, описываемым в настоящем описании.

Внутриклеточный домен LY49, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами внутриклеточного домена LY49. В одном из вариантов осуществления внутриклеточный домен LY49 LY49-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внутриклеточным доменом LY49 или внутриклеточным доменом LY49, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления внутриклеточный домен LY49 LY49-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного внутриклеточного домена LY49 или внутриклеточного домена LY49, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внутриклеточный домен LY49 LY49-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного внутриклеточного домена LY49 или внутриклеточного домена LY49, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления внутриклеточный домен LY49 LY49-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным внутриклеточным доменом LY49 или внутриклеточным доменом LY49, описываемым в настоящем описании.

Внутриклеточные сигнальные домены или адапторные молекулы, например, DAP12

Некоторые NKR-CAR взаимодействуют с другими молекулами, например, молекулами, содержащими внутриклеточный сигнальный

домен, например, ITAM. В одном из вариантов осуществления внутриклеточный сигнальный домен представляет собой DAP12.

DAP12 так называют вследствие его структурных особенностей и предполагаемой функции. Определенные рецепторы клеточной поверхности не содержат характерной функциональной группы, которая гипотетически может взаимодействовать с другим белком-партнером, предположительно белком 12 кДа. Механизм передачи сигнала может включать сигнал ITAM.

DAP12 идентифицировали из баз данных последовательностей на основании гипотетической связи с CD3 (см. Olcese et al., (1997) J. Immunol., 158:5083-5086), наличия последовательности ITAM (см. Thomas, (1995) J. Exp. Med., 181:1953-1956), прогнозирования определенного размера (см. Olcese and Takase et al., (1997) J. Immunol., 159:741-747, и других признаков. В частности, предполагали, что трансмембранный домен содержит заряженный остаток, который обеспечивает солевой мостик с соответствующими трансмембранными сегментами своих предполагаемых партнеров-рецепторов, белка CD94 KIR и, вероятно другими аналогичными белками. См. Daeron et al., (1995) Immunity, 3:635-646.

Фактически, многие из известных рецепторных молекул KIR, MIR, ILT и CD94/NKG2 могут в действительности функционировать с вспомогательным белком, который является частью функционального рецепторного комплекса. См. Olcese et al., (1997) J. Immunol., 158:5083-5086; и Takase et al., (1997) J. Immunol., 159:741-747.

Домен DAP 12, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами цитоплазматического домена DAP 12 и, как правило, содержит домен ITAM. В одном из вариантов осуществления домен DAP 12 KIR-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным DAP 12 или DAP 12, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления домен DAP 12 KIR-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного DAP12 или DAP12, описываемого в настоящем описании. В

вариантах осуществления домен DAP 12 KIR-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного DAP12 или DAP12, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления домен DAP 12 KIR-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным DAP12 или DAP12, описываемым в настоящем описании.

DAP10 идентифицировали частично по его гомологии с DAP12 и дурим признакам. В частности, в отличие от DAP12, который содержит активирующий мотив ITAM, DAP10 содержит ингибирующий мотив ITIM. MDL-1 идентифицировали по его функциональной связи с DAP12.

Функциональное взаимодействие между, например, DAP12 или DAP10 и его вспомогательным рецептором может обеспечивать возможность использования структурной комбинации в рецепторах, которая обычно не встречаются в усеченной форме рецептора. Таким образом, механизм передачи сигналов через такие вспомогательные белки как DAP12 и DAP10 может обеспечивать возможность представляющей интерес инженерии других KIR-подобных рецепторных комплексов, например, с типами рецепторов KIR, MIR, ILT и CD94 NKG2. Можно конструировать усеченные формы интактных рецепторов, которые взаимодействуют с DAP12 или DAP10 с образованием функционального сигнального комплекса.

Нуклеотидная последовательность DAP12 примата соответствует нуклеотидам от 1 до 339 SEQ ID NO: 332; аминокислотная последовательность соответствует аминокислотам от 1 до 113 SEQ ID NO: 333. Сигнальная последовательность, по-видимому, проходит от met(-26) до gln(-1) или ala1; зрелый белок должен проходит приблизительно от ala1 (или gln2), внеклеточный домен приблизительно от ala1 до pro14; внеклеточный домен содержит два цистеина в 7 и 9, которые, вероятно, обеспечивают дисульфидные связи с дополнительными гомотипическими или гетеротипическими вспомогательными белками; трансмембранная область проходит приблизительно от gly15 или val16 приблизительно до gly39; и мотив ITAM от tyr65 до leu79 (YxxL-6/8x-YxxL) (SEQ ID NO: 341). EST LVA03A идентифицировали и использовали для экстракции другой

перекрывающихся последовательностей. Также см. EST человека Genbank, которые являются частью DAP12 человека; некоторые, но не все, включая номера доступа Genbank № AA481924, H39980, W60940, N41026, R49793, W60864, W92376, H12338, T52100, AA480109, H12392, W74783 и T55959.

Ингибирующие NKR-CAR

Настоящее изобретение относится к композициям и способам ограничения истощения незлокачественных клеток типом терапии на основе Т-клеток с CAR. Как описано в настоящем описании, тип терапии на основе Т-клеток с CAR предусматривает использование NK-рецепторов включая, но, не ограничиваясь ими, активирующие и ингибирующие рецепторы NK-клеток, известные как иммуноглобулиноподобный рецептор киллерных клеток (KIR). Таким образом, изобретение относится к композициям и способам использования NKR-CAR, например, KIR-CAR, включая, но, не ограничиваясь ими активирующий NKR-CAR (actNKR-CAR), например, активирующий KIR-CAR (actKIR-CAR) и ингибирующий NKR-CAR (inhNKR-CAR), например, ингибирующий KIR-CAR (inhKIR-CAR).

В некоторых вариантах осуществления KIR inhKIR-CAR представляет собой ингибирующий KIR, который содержит длинный цитоплазматический хвост, содержащий иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM), который преобразует ингибирующие сигналы (обозначаемый в другом месте в настоящем описании как inhKIR-CAR).

В некоторых вариантах осуществления inhKIR-CAR содержит цитоплазматический домен ингибирующей молекулы, отличной от KIR. В некоторых вариантах осуществления такие ингибирующие молекулы могут снижать способность клетки вызывать ответ иммунного эффектора. Цитоплазматические домены ингибирующих молекул можно соединять, например, путем слияния с трансмембранными доменами KIR. Иллюстративные ингибирующие молекулы продемонстрированы в таблице 1.

Таблица 1: ингибирующие молекулы		
PD1	TIGIT	KIR
PD-L1	LAIR1	A2aR
PD-L2	CD160	MHC I класса

CTLA4	2B4	MHC II класса
TIM3	CD80	GAL9
CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5)	CD86	Аденозин
LAG3	B7-H3 (CD276)	TGFR (например, TGFR бета)
VISTA	B7-H4 (VTCN1)	
BTLA	HVEM (TNFRSF14 или CD270)	

В некоторых вариантах осуществления inhKIR-CAR содержит цитоплазматический домен PD1. Цитоплазматический домен PD1, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами цитоплазматического домена PD1. В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен PD1 KIR-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным цитоплазматическим доменом PD1 или цитоплазматическим доменом PD1, описываемым в настоящем описании (SEQ ID NO: 338). В вариантах осуществления цитоплазматический домен PD1 KIR-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного цитоплазматического домена PD1 или цитоплазматического домена PD1, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления цитоплазматический домен PD1 KIR-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного цитоплазматического домена PD1 или цитоплазматического домена PD1, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления цитоплазматический домен PD1 KIR-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным цитоплазматическим доменом PD1 или цитоплазматическим доменом PD1, описываемым в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления inhKIR-CAR содержит цитоплазматический домен CTLA-4. Цитоплазматический домен CTLA-4, как этот термин используют в настоящем описании, относится к домену полипептида, обладающему структурными и функциональными свойствами цитоплазматического домена CTLA-4. В одном из

вариантов осуществления цитоплазматический домен CTLA-4 KIR-CAR обладает по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 99% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным цитоплазматическим доменом CTLA-4 или цитоплазматическим доменом CTLA-4, описываемым в настоящем описании (SEQ ID NO: 339). В вариантах осуществления цитоплазматический домен CTLA-4 KIR-CAR отличается не более чем на 15, 10, 5, 2 или 1% своих остатков от эталонной последовательности, например, природного цитоплазматического домена CTLA-4 или цитоплазматического домена CTLA-4, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления цитоплазматический домен CTLA-4 KIR-CAR отличается не более чем на 5, 4, 3, 2 или 1 остаток от эталонной последовательности, например, природного цитоплазматического домена CTLA-4 или цитоплазматического домена CTLA-4, описываемого в настоящем описании. В вариантах осуществления цитоплазматический домен CTLA-4 KIR-CAR не отличается или обладает 100% гомологией с эталонной последовательностью, например, природным цитоплазматическим доменом CTLA-4 или цитоплазматическим доменом CTLA-4, описываемым в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления inhNKR-CAR, например, inhKIR-CAR при связывании с антигеном на не являющейся мишенью клетке или не участвующей в процессе клетке инактивирует цитотоксическую клетку, содержащую inhNKR-CAR. Несмотря на то, что большая часть описания, приводимого ниже, относится к inhKIR-CAR, изобретение включает аналогичное применение других inhNKR-CAR.

В одном из вариантов осуществления Т-клетки, экспрессирующие actKIR-CAR, обладают противоопухолевым свойством при связывании со своей мишенью, тогда как Т-клетки, экспрессирующие inhKIR-CAR, приводят к ингибированию активности клеток, когда inhKIR-CAR связывается со своей мишенью.

Независимо от типа KIR-CAR KIR-CAR конструируют так, чтобы они содержали внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, слитый с цитоплазматическим доменом. В одном из вариантов осуществления KIR-CAR, когда экспрессируется в Т-клетке,

способен перенаправлять распознавание антигена в зависимости от антигенной специфичности. Иллюстративный антиген представляет собой CD19, т.к. этот антиген экспрессируется при В-клеточной лимфоме. Однако CD19 также экспрессируется нормальными В-клетками, и, таким образом, CAR, содержащие домен против CD19 могут приводить к истощению нормальных В-клеток. Истощение нормальных В-клеток может делать индивидуума, получающего лечение, восприимчивым к инфекции, т.к. В-клетки обычно помогают Т-клеткам контролировать инфекцию. Настоящее изобретение относится к композициям и способам ограничения истощения нормальной ткани во время терапии на основе Т-клеток с KIR-CAR. В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли и других нарушений с использованием терапии Т-клеткам с KIR-CAR при этом, ограничивая истощение здоровых не участвующих в процессе клеток.

В одном из вариантов осуществления изобретение предусматривает контроль или регуляцию активности Т-клеток с KIR-CAR. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к композициям и способам, относящимся к генетической модификации Т-клеток для экспрессии совокупность типов KIR-CAR, где активация Т-клетки с KIR-CAR зависит от связывания совокупности типов KIR-CAR с их рецептором-мишенью. Зависимость от связывания совокупности типов KIR-CAR улучшает специфичность литической активности Т-клетки с KIR-CAR, таким образом, снижая вероятность истощения нормальной здоровой ткани.

В другом варианте осуществления изобретение содержит композиции и способы, относящиеся к генетической модификации Т-клетки ингибирующим KIR-CAR. В одном из вариантов осуществления ингибирующий KIR-CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который распознает антиген, ассоциированный с нормальной незлокачественной клеткой, и ингибирующий цитоплазматический домен.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к двойному KIR-CAR, где Т-клетка является генетически модифицированной так, чтобы экспрессировать inhKIR-CAR и actKIR-CAR. В одном из вариантов осуществления связывание inhKIR-CAR с

нормальной незлокачественной клеткой приводит к ингибированию Т-клетки с двойным KIR-CAR. Например, в одном из вариантов осуществления связывание inhKIR-CAR с нормальной незлокачественной клеткой приводит к гибели Т-клетка с двойным KIR-CAR. В другом варианте осуществления связывание inhKIR-CAR с нормальной незлокачественной клеткой приводит к ингибированию передачи сигнала actKIR-CAR. В еще одном варианте осуществления связывание inhKIR-CAR с нормальной незлокачественной клеткой приводит к индукции передачи сигнала, который предотвращает проявление противоопухолевой активности Т-клетки с actKIR-CAR. Таким образом, двойной KIR-CAR, содержащий по меньшей мере один inhKIR-CAR и по меньшей мере один actKIR-CAR по изобретению, относится к механизму регуляции активности Т-клетки с двойным KIR-CAR.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли и других нарушений с использованием видов терапии на основе Т-клеток с KIR-CAR при сведении к минимуму истощения нормальной здоровой ткани. Злокачественная опухоль может представлять собой гемобластоз, солидную опухоль, первичную или метастазирующую опухоль. Другие заболевания, которые моно лечить с использованием композиций и способов по изобретению, включают вызываемые вирусами, бактериями и паразитами инфекции, а также аутоиммунные заболевания.

Внеклеточный шарнирный домен

Внеклеточный шарнирный домен, как этот термин используют в настоящем описании, относится к полипептидной последовательности NKR-CAR, расположенной между трансмембранным доменом и антигенсвязывающим доменом. В одном из вариантов осуществления внеклеточный шарнирный домен обеспечивает достаточное расстояние от внешней поверхности клетки и антигенсвязывающего домена, а также гибкость для сведения к минимуму стерического препятствия между клеткой и антигенсвязывающим доменом. В одном из вариантов осуществления внеклеточный шарнирный домен является достаточно коротким или гибким, чтобы он не препятствовал взаимодействию клетки, которая содержит NKR-CAR, с несущей антиген клеткой,

например, клеткой-мишенью. В одном из вариантов осуществления длина внеклеточного шарнирного домена составляет от 2 до 20, от 5 до 15, от 7 до 12 или от 8 до 10 аминокислот. В одном из вариантов осуществления шарнирный домен содержит по меньшей мере 50, 20 или 10 остатков. В вариантах осуществления длина шарнира составляет от 10 до 300, от 10 до 250 или от 10 до 200 остатков. В одном из вариантов осуществления расстояние, на которое шарнир простирается от клетки, является достаточно коротким, что шарнир не препятствует взаимодействию с поверхностью клетки-мишени. В одном из вариантов осуществления шарнир протирается менее чем на 20, 15 или 10 нанометров от поверхности цитотоксической клетки. Таким образом, на пригодность шарнира могут влиять линейная длина, число аминокислотных остатков и гибкость шарнира. Длина шарнира IgG4 может составлять 200 аминокислот, но расстояние, на которое он простирается от поверхности цитотоксической клетки, является меньше вследствие сворачивания домена Ig. Домен CD8 альфа, который состоит из ~43 аминокислоты, является достаточно линейным при длине ~8 нм. В противоположность этому, длина шарнира IgG4 C2 и C3 составляет ~200 аминокислот, но его расстояние от поверхности цитотоксической клетки является сравнимым с расстоянием шарнира CD8 альфа. Без желания быть связанными теорией, на сходство в удлинении влияет гибкость.

В некоторых случаях внеклеточный шарнирный домен представляет собой, например, шарнир из белка человека, его фрагмент или короткий олиго- или полипептидный линкер.

В некоторых вариантах осуществления шарнир представляет собой искусственную последовательность. В одном из вариантов осуществления шарнир представляет собой короткий олигопептидный линкер, содержащий дублет глицин-серин.

В некоторых вариантах осуществления шарнир представляет собой природную последовательность. В некоторых вариантах осуществления шарнир может представлять собой шарнир Ig (иммуноглобулина) человека или его фрагмент. В одном из вариантов осуществления, например, шарнир содержит (например, состоит из) аминокислотную последовательность шарнира IgG4 (SEQ

ID NO: 3). В одном из вариантов осуществления, например, шарнир содержит (например, состоит из) аминокислотную последовательность шарнира IgD (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления шарнир может представлять собой шарнир CD8 человека или его фрагмент. В одном из вариантов осуществления, например, шарнир содержит (например, состоит из) аминокислотную последовательность шарнира CD8 (SEQ ID NO: 2). Дополнительные последовательности иллюстративных шарнирных доменов предоставлены в таблице 5.

TCAR

В некоторых вариантах осуществления терапия на основе клеток с CAR по настоящему изобретению включает NKR-CAR в комбинации с TCAR. В вариантах осуществления терапия на основе клеток с CAR по настоящему изобретению включает экспрессирующую NKR-CAR клетку, описываемую в настоящем описании, дополнительно содержащую, например, экспрессирующую TCAR. В альтернативных вариантах осуществления терапия на основе клеток с CAR по настоящему изобретению включает первую клетку, экспрессирующую NKR-CAR, описываемый в настоящем описании, и вторую клетку, экспрессирующую TCAR.

В одном из вариантов осуществления TCAR содержит антигенсвязывающий домен, слитый с внутриклеточным доменом, например, цитоплазматическим доменом. В вариантах осуществления цитоплазматический домен содержит внутриклеточный сигнальный домен и продуцирует внутриклеточный сигнал, где внеклеточный домен, например, антигенсвязывающий домен, с которым он слит, связывается с контрлигандом. Внутриклеточные сигнальные домены могут включать первичные внутриклеточные сигнальные домены и костимулирующие сигнальные домены. В одном из вариантов осуществления молекулу TCAR можно конструировать для экспрессии в эффекторной клетке иммунной системы, например, Т-клетке или NK-клетке, таким образом, что молекула TCAR содержит домен, например, первичный внутриклеточный сигнальный домен, костимулирующий сигнальный домен, ингибирующие домены и т.д., которые получают из полипептида, которые, как правило, связаны с иммунной клеткой. Например, TCAR для экспрессии в эффекторной

клетке иммунной системы, например, Т-клетке или NK-клетке, может содержать домен 4-1BB и домен CD3 дзета. В этом случае оба домена 4-1BB и CD3 дзета получат из полипептидов, связанных с эффекторной клеткой иммунной системы, например, Т-клеткой или NK-клеткой. В другом варианте осуществления молекулу TCAR можно конструировать для экспрессии в эффекторной клетке иммунной системы, например, Т-клетке или NK-клетке, таким образом, что молекула TCAR содержит домен, который получают из полипептида, который, как правило, не связан с эффекторной клеткой иммунной системы. Альтернативно, TCAR для экспрессии в NK-клетке может содержать домен 4-1BB и домен CD3 дзета, получаемые из Т-клетки (см. например, WO2013/033626, включенную в настоящее описание посредством ссылки).

Следующие ниже разделы относятся к конструкции и экспрессии NKR-CAR и TCAR, описываемых в настоящем описании, и способам их использования.

Антигенсвязывающий домен

Описываемые в настоящем описании CAR, например, KIR-CAR и TCAR, описываемые в настоящем описании, содержат антигенсвязывающий домен во внеклеточной области. "Антигенсвязывающий домен", как термин используют в настоящем описании, относится к молекуле, которая обладает аффинностью к антигену-мишени, как правило, антигену на клетке-мишени, например, злокачественной клетке. Иллюстративный антигенсвязывающий домен содержит полипептид, например, молекулу антитела (которая включает антитело и его антигенсвязывающие фрагменты, например, иммуноглобулин, однодоменное антитело (sdAb) и scFv), или не принадлежащий антителу каркас, например, фибронектин, и т.п. В вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой одни полипептид. В вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит один, два или более полипептидов.

Выбор антигенсвязывающего домена может зависеть от типа и числа лигандов или рецепторов, которые определяют поверхность клетки-мишени. Например, антигенсвязывающий домен можно выбирать так, чтобы он распознавал лиганд или рецептор, который действует

как маркер клеточной поверхности на клетках-мишенях, связанных с конкретным состоянием болезни. Примеры маркеров клеточной поверхности, которые могут действовать как лиганды или рецепторы, включают маркер клеточной поверхности, ассоциированный с конкретным состоянием болезни, например, маркеры клеточной поверхности для вирусных заболеваний, вызываемых бактериями заболеваний, паразитарных инфекций, аутоиммунных заболеваний и нарушений, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией, например, злокачественной опухолью, например, злокачественной опухолью, описываемой в настоящем описании.

В отношении настоящего изобретения "опухолевый антиген" или "антиген пролиферативного нарушения" или "антиген, ассоциированный с пролиферативным нарушением" относится к антигенам, которые являются общими для конкретных пролиферативных нарушений. В определенных аспектах антигены пролиферативного нарушения по настоящему изобретению получают из злокачественных опухолей, включая, но, не ограничиваясь ими, первичную или метастатическую меланому, тиому, лимфому, саркому, рак легких (например, NSCLC или SCLC), рак печени, неходжкинскую лимфому, лимфома Ходжкина, лейкозы, множественную миелому, глиобластому, нейробластому, рак матки, рак шейки матки, злокачественную опухоль почки, рак щитовидной железы, рак мочевого пузыря, рак почки и аденокарциномы, такие как рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак толстого кишечника и т.п. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой В-клеточный острый лимфоидный лейкоз ("BALL"), Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз ("TALL"), острый лимфоидный лейкоз (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML); один или более хронических лейкозов включая, но, не ограничиваясь ими, хронический миелогенный лейкоз (CML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); дополнительный гематологические злокачественные опухоли или гематологические состояния, включая, но, не ограничиваясь ими, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, неоплазию из бластных плазмоцитоидных дендритных клеток, лимфому

Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, MALT-лимфому, лимфому мантийных клеток, лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, плазмобластную лимфому, неоплазию из плазмоцитоидных дендритных клеток, макроглобулинемию Вальденстрема.

В одном из вариантов осуществления опухолевый антиген содержит один или более антигенных эпитопов злокачественной опухоли, иммунологически распознаваемых проникающими в опухоль лимфоцитами (TIL), получаемых из злокачественной опухоли млекопитающего.

Опухолевые антигены представляют собой белки, которые продуцируют опухолевые клетки, которые вызывают иммунный ответ, в частности опосредованные Т-клетками иммунные ответы. Выбор антигенсвязывающего домена по изобретению зависит от конкретного типа злокачественной опухоли, которую необходимо лечить. Опухолевые антигены хорошо известны в данной области и включают, например, опухолевый антиген, описанный в международной заявке PCT/US2015/020606. В вариантах осуществления опухолевый антиген выбирают из ассоциированного с глиомой антигена, раково-эмбрионального антигена (CEA), EGFRvIII, рецептора альфа интерлейкина 11 (IL-11Ra), субъединицы альфа-2 рецептора интерлейкин 13 (IL-13Ra или CD213A2), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), B7H3 (CD276), Kit (CD117), карбоангидразы (CA-IX), CS-1 (также обозначаемый как CD2 субпопуляция 1), муцина 1, ассоциированного с клеточной поверхностью (MUC1), BCMA, онкогенного слитого белка, состоящего из кластерной области точечного разрыва (BCR) и bcr-abl гомлога 1 вирусного онкогена мышей лейкоза Абельсона (Abl), рецептора тирозинпротеинкиназы ERBB2 (HER2/neu), β-хорионического гонадотропина человека, альфа-фетопротеина (AFP), киназы анапластической лимфомы (ALK), CD19, CD123, циклина B1, лектин-

реактивного AFP, адренорецептора бета 3 связанного с Fos антигена 1, (ADRB3), тиреоглобулина, тирозиназы; рецептора 2 эфрина типа A (EphA2), рецептора конечных продуктов гликации (RAGE-1), почечного убиквитинованного антигена 1 (RU1), почечного убиквитинового антигена 2 (RU2), антигена синовиальной саркомы, точечного разрыва X 2 (SSX2), якорного белка 4 A-киназы (AKAP-4), лимфоцит-специфической протеинтирозинкиназы (LCK), связывающего проакрозин белка sp32 (OY-TES1), белка парного домена Pax-5 (PAX5), антигена плоскоклеточной карциномы, распознаваемого T-клетками, 3 (SART3), лектиноподобной молекулы 1 типа C (CLL-1 или CLECL1), фукозила GM1, гексасахаридной части глобо-H гликоцерамида (GloboH), MN-CA IX, молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM), EVT6-AML, трансглутаминазы 5 (TGS5), обратной транскриптазы теломеразы человека (hTERT), полисиаловой кислоты, плацентарного антигена 1 (PLAC1), карбоксилэстеразы кишечника, антигена Льюиса Y, сиалированной молекулы адгезии Льюиса (sLe), комплекса лимфоцитарного антигена 6, локуса K 9 (LY6K), мутантного белка теплового шока 70-2 (mut hsp70-2), M-CSF, гомолога v-myc, получаемого из онкогенного вируса миелоцитоматоза птиц нейробластомы (MYCN), представителя C гомологов семейства Ras (RhoC), относящегося к тирозиназе белка 2 (TRP-2), 1B1 цитохрома P450 (CYP1B1), подобного связывающему CCCTC фактору (белка с цинковыми пальцами) антигена (BORIS или брат регулятора сайтов импринтинга (Brother of the Regulator of Imprinted Sites)), простазы, специфического антигена простаты (PSA), белка Pax-3 парного домена (PAX3), кислой фосфатазы предстательной железы (PAP), антигена 1 злокачественной опухоли/семенников (NY-ESO-1), антигена 2 злокачественной опухоли/семенников (LAGE-1a), LMP2, нейтральной молекулы клеточной адгезии (NCAM), опухолевого белка p53 (p53), мутанта p53, мутантна саркомы крысы (Ras), гликопротеина 100 (gp100), простеина, OR51E2, паннексина 3 (PANX3), специфического мембранного антигена предстательной железы (PSMA), антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), ассоциированного с меланомой высокомолекулярного антигена (HMWMAA), клеточного рецептора 1 вируса гепатита A (HAVCR1), рецептора 2 фактора

роста эндотелия сосудов (VEGFR2), рецептора бета фактора роста тромбоцитов (PDGFR-бета), легумаина, E6 вируса папилломы человека (E6 HPV), E7 вируса папилломы человека (E7 HPV), сурвивина, теломеразы, белка 17 спермы (SPA17), специфического для стадии развития эмбрионального антигена 4 (SSEA-4), тирозиназы, белка TCR гамма альтернативной рамки считывания (TARP), белка опухоли Вильмса (WT1), опухолевого антигена 1 карциномы предстательной железы (PCTA-1), меланомного ингибитора апоптоза (ML-IAP), MAGE, меланома-ассоциированного антигена 1 (MAGE-A1), раково-тестикулярного антигена 1 семенников при меланоме (MAD-CT-1), раково-тестикулярного антигена 2 семенников при меланоме (MAD-CT-2), меланомного антигена, распознаваемого Т-клетками 1 (MelanA/MART1), семейства антигенов X, представителя 1A (XAGE1), мутантного фактора элонгации 2 (ELF2M), ERG (слитого гена TMPRSS2 ETS), N-ацетилглукозаминилтрансферазы V (NA17), нейтрофильнойй эластазы, точек разрыва транслокации при саркоме, дифференцировочного антигена молочной железы (NY-BR-1), эфринB2, CD20, CD22, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD97, CD171, CD179a, андрогенного рецептора, инсулинового фактора роста (IGF)-I, IGF-II, рецептора IGF-I, ганглиозида GD2 (GD2), о-ацетил-GD2-ганглиозида (OAcGD2), ганглиозида GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer), ганглиозида GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer), представителя D группы 5 класса C сопряженного с G-белком рецептора (GPRC5D), рецептора 20 сопряженного с G-белком (GPR20), открытой рамка считывания 61 хромосомы X (CXORF61), рецептора фолата (FRa), рецептора фолата бета, рецептора-сироты 1 рецепторной тирозинкиназы (ROR1), Fms-подобной тирозинкиназы 3 (Flt3), опухолеассоциированного гликопротеина 72 (TAG72), антигена Tn (TN Ag или (GalNAcα-Ser/Thr)), связывающего ангиопоэтин рецептора 2 клеточной поверхности (Tie 2), эндотелиального опухолевого маркера 1 (TEM1 или CD248), антигена, родственного эндотелиальному опухолевому маркеру 7 (TEM7R), клаудина 6 (CLDN6), рецептора тиреотропного гормона (TSHR), уроплакина 2 (UPK2), мезотелина, протеазы серина 21

(тестизина или PRSS21), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), белка активации фибробластов альфа (FAP), рецептора обоняния 51E2 (OR51E2), гена 6 варианта транслокации ETS, локализованного на хромосоме 12p (ETV6-AML), CD79a; CD79b; CD72; лейкоцит-ассоциированного иммуноглобулиноподобного рецептора 1 (LAIR1); фрагмента Fc рецептора IgA (FCAR или CD89); представителя 2 подсемейства A лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора (LILRA2); CD300 молекулоподобного представителя семейства f (CD300LF); представителя A семейство 12 лектинового домена типа C (CLEC12A); антигена 2 стромальных клеток костного мозга (BST2); содержащего EGF-подобный модуль муцин-подобного рецептора гормонов 2 (EMR2); лимфоцитарного антигена 75 (LY75); глипикана 3 (GPC3); Fc-рецептор-подобного 5 (FCRL5) и иммуноглобулин лямба-подобного полипептида 1 (IGLL1). В предпочтительном варианте осуществления опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из рецептора фолата (FRa), мезотелина, EGFRvIII, IL-13Ra, CD123, CD19, CD33, BCMA, GD2, CLL-1, CA-IX, MUC1, HER2 и любого их сочетания.

В одном из вариантов осуществления опухолевый антиген содержит один или более антигенных эпитопов злокачественной опухоли, ассоциированных со злокачественной опухолью. Злокачественные опухоли экспрессируют ряд белков, которые могут случить в качестве антигенов-мишеней для иммунной атаки. Эти молекулы включают, но не ограничиваются ими, тканеспецифические антигены, такие как MART-1, тирозиназа и GP 100 при меланоме и кислую фосфатазу предстательной железы (PAP), и специфический антиген простаты (PSA) при раке предстательной железы. Другие антигены-мишени включают связанные с трансформацией молекулы, такие как онкоген HER-2/Neu/ErbB-2. Еще одна другая группа антигенов-мишеней представляет собой онкофетальные антигены, такие как раково-эмбриональный антиген (CEA). При B-клеточной лимфоме опухолеспецифический идиотипический иммуноглобулин представляет собой истинный опухолеспецифический иммуноглобулиновый антиген, который является уникальным для индивидуальной опухоли. Антигены дифференцировки B-клеток, такие

как CD19, CD20 и CD37, являются другими кандидатами антигенов-мишеней при В-клеточной лимфоме.

Неограничивающие примеры опухолевых антигенов включают следующие ниже: антигены дифференцировки, такие как MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), тирозиназа, TRP-1, TRP-2 и опухолеспецифические мультилинейные антигены, такие как MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15; сверхэкспрессированные эмбриональные антигены, такие как CEA; сверхэкспрессированные онкогены и мутантные гены-супрессоры опухолей, такие как p53, Ras, HER-2/neu; уникальные опухолевые антигены, являющиеся результатом хромосомных транслокаций, такие как BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR; и антигены вирусов, такие как антигены вируса Эпштейна-Барр EBVA и антигены E6 и E7 вируса папилломы человека (HPV). Другие большие антигены на основе белка включают TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17,1, NuMa, K-ras, бета-катенин, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, альфа-фетопротеин, бета-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3\CA 27.29\BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68\P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733\EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, связывающий белок TA-90\Mac-2\связанный с циклофилином C белок, TAAL6, TAG72, TLP и TPS.

В зависимости от желаемого антигена, который выбирают в качестве мишени, CAR по изобретению можно конструировать так, чтобы он содержал соответствующий антигенсвязывающий домен, который является специфическим к желаемому антигену-мишени.

Антигенсвязывающие домены, получаемые из молекулы антитела

Антигенсвязывающий домен можно получать из молекулы антитела, например, одного или более моноклональных антител, поликлональных антитела, рекомбинантных антител, антител человека, гуманизированных антител, однодоменных антител, например, вариабельного домена тяжелой цепи (VH), вариабельного домена легкой цепи (VL) и вариабельного домена (VHH), например, от человека или верблюда. В некоторых случаях благоприятным является, когда антигенсвязывающий домен получают от того же

вида, для которого в конечном итоге используют CAR, например, для применения у людей благоприятным может являться, чтобы антигенсвязывающий домен CAR, например, KIR-CAR, например, описываемый в настоящем описании, содержал принадлежащий человеку или гуманизированный антигенсвязывающий домен. Антитела можно получать известными в данной области способами.

В определенных аспектах scFv является смежным и находится в той же рамке считывания, что и лидерная последовательность. В одном из аспектов лидерная последовательность представляет собой аминокислотную последовательность, предоставленную как SEQ ID NO: 1.

В одном из аспектов антигенсвязывающий домен представляет собой фрагмент, например, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В одном из аспектов антигенсвязывающий домен представляет собой Fv, Fab, (Fab')2, или бифункциональное (например, биспецифическое) гибридное антитело (например, Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol., 17, 105 (1987)). В одном из аспектов антитела и их фрагменты по изобретению связываются с опухолевым антигенным белком или его фрагментом со специфичностью дикого типа или с повышенной аффинностью.

В некоторых случаях scFvs можно получать известным в данной области способом (см., например, Bird et al., (1988) Science, 242:423-426 и Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883). Как описано выше и в другом месте, молекулы scFv можно получать связыванием цепей VH и VL друг с другом с использованием гибких полипептидных линкеров. В некоторых вариантах осуществления молекулы scFv содержат гибкий полипептидный линкер с оптимизированной длиной и/или композицией аминокислот. Длина гибкого полипептидного линкера может в значительной степени оказывать влияние на то, как вариабельные области scFv сворачиваются и взаимодействуют. Фактически, если применяют короткий полипептидный линкер (например, в диапазоне 5-10 аминокислот), то предотвращают внутрицепьевое сворачивание. Межцепьевое сворачивание также является необходимым для сближения двух вариабельных областей с образованием функционального участка связывания эпитопа. Для примеров

ориентации и размера линкера см., например, Hollinger et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:6444-6448, публикации патентных заявок США № 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794, и публикации PCT № WO2006/020258 и WO2007/024715, которые включены в настоящее описание посредством ссылки.

scFv может содержать линкер по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более аминокислотных остатков между его областями VL и VH. Последовательность линкера может содержать любую природную аминокислоту. В одном из вариантов осуществления пептидный линкер scFv состоит из аминокислот, таких как остатки глицина и/или серина, используемые отдельно или в комбинации для связывания вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи друг с другом. В одном из вариантов осуществления гибкий полипептидный линкер представляет собой линкер Gly/Ser и, например, содержит аминокислотную последовательность (Gly-Gly-Gly-Ser)n, где n представляет собой положительное целое число, которое равно или больше 1 (SEQ ID NO: 40). Например, n=1, n=2, n=3, n=4, n=5 и n=6, n=7, n=8, n=9 и n=10. В одном из вариантов осуществления гибкие полипептидные линкеры включают, но не ограничиваются ими, (Gly4 Ser)4 (SEQ ID NO: 27) или (Gly4 Ser)3 (SEQ ID NO: 28). В другом варианте осуществления линкеры содержат многие повторы (Gly2Ser), (GlySer) или (Gly3Ser) (SEQ ID NO: 29).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой однодоменные антигенсвязывающие (SDAB) молекулы. Молекула SDAB включает молекулы, определяющие комплементарность области которых являются частью однодоменного полипептида. Примеры включают, но не ограничиваются ими, вариабельные домены тяжелых цепей, связывающие молекулы, естественным образом не содержащие легкие цепи, одиночные домены, получаемые из общепринятых 4-цепочечных антител, сконструированные домены и однодоменные каркасы, отличные от тех, которые получают из антител (например, описанные более подробно ниже). Молекулы SDAB могут представлять собой любые из существующих в данной области или любые получаемые в будущем

однодоменные молекулы. Молекулы SDAB можно получать от любого вида, включая, но, не ограничиваясь ими, мышь, человека, верблюда, ламу, рыбу, акулу, козу, кролику и крупный рогатый скот. Этот термин также включает природные однодоменные молекулы антител от видов, отличных от *Camelidae* и акул.

В одном из аспектов молекулу SDAB можно получать из вариабельной области иммуноглобулина, встречающегося у рыбы, такой как, например, вариабельная область, которую получают из изотипа иммуноглобулина, известного как новый антигенный рецептор (NAR), встречающийся в сыворотке акулы. Способы получения однодоменных молекул, получаемых из вариабельной области NAR ("IgNAR") описаны в WO 03/014161 и у Streltsov (2005), Protein Sci., 14:2901-2909.

По другому аспекту молекула SDAB представляет собой природную однодоменную антигенсвязывающую молекулу, известную как тяжелая цепь без легких цепей. Такие однодоменные молекулы описаны, например, в WO 9404678 и у Hamers-Casterman C. et al., (1993) Nature, 363:446-448. Для ясности, такой вариабельный домен, получаемый из состоящей из тяжелой цепи молекулы, естественным образом не содержащей легкой цепи, известен в настоящем описании как VHH или нанотело для отличия его общепринятой VH содержащих четыре цепи иммуноглобулинов. Такую молекулу VHH можно получать от видов *Camelidae*, например, у верблюда, ламы, дромадера, альпаки и гуанако. Другие виды наряду с *Camelidae* могут продуцировать состоящие из тяжелой цепи молекулы, естественным образом не содержащие легкой цепи; такие VHH входят в объем изобретения.

В определенных вариантах осуществления молекула SDAB представляет собой одноцепочечный слитый полипептид, содержащий одну или более однодоменных молекул (например, нанотел), не содержащих комплементарный вариабельный домен или константную область, например, Fc, иммуноглобулина, которая связывается с одним или более антигенов-мишеней.

Молекулы SDAB могут быть рекомбинантными, с пересаженной CDR, гуманизированными, камелизированными, деиммунизированными

и/или получаемыми *in vitro* (например, селектируемыми посредством фагового дисплей).

В одном из вариантов осуществления участок антигенсвязывающего домена содержит антитело человека или его фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления не принадлежащее человеку антитело является гуманизированным, где конкретные последовательности или области антитела модифицируют для увеличения сходства с антителом, естественным образом образуемым у человека. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен является гуманизированным.

Не принадлежащие человеку антитела можно гуманизировать различными способами, известными в данной области, например, пересадка CDR (см., например, патент Европы № EP 239,400; международную публикацию № WO 91/09967; и патенты США № 5225539, 5530101 и 5585089, каждый из которых полностью включен в настоящее описании посредством ссылки), винирование или изменение поверхности (см., например, патенты Европы № EP 592.106 и EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814; и Roguska et al., 1994, PNAS, 91:969-973, каждый из которых включен в настоящее описании полностью посредством ссылки), перестановка цепей (см., например, патент США № 5565332, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки), и способами, описанными, например, в публикации патентной заявки США № US2005/0042664, публикации патентной заявки США № US2005/0048617, патенте США № 6407213, патенте США № 5766886, международной публикации № WO 9317105, Tan et al., 2002, J. Immunol., 169:1119-25; Caldas et al., 2000, Protein Eng., 13(5):353-60; Morea et al., 2000, Methods, 20:267-79; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem., 272:10678-84; Roguska et al., 1996, Protein Eng., 9(10):895-904; Couto et al., 1995, Cancer Res., 55:5973s-5977; Couto et al., 1995, Cancer Res., 55(8):1717-22; Sandhu, 1994, Gene, 150(2):409-10 и Pedersen et al., 1994, J. Mol. Biol., 235(3):959-73, каждая из которых полностью включена в настоящее описании посредством ссылки. Как

правило, каркасные остатки в каркасных областях заменяют соответствующим остатком из CDR донорного антитела для изменения, например, улучшения, связывания антигена. Такие замены каркаса идентифицируют хорошо известными в данной области способами, например, моделированием взаимодействий CDR и каркасных остатков для идентификации каркасных остатков, важных для связывания антигена, и сравнением последовательности для идентификации необычных каркасных остатков в конкретных положениях. (См., например, Queen et al., патент США № 5585089; и Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323, которые полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.) В предпочтительных вариантах осуществления молекула гуманизированного антитела содержит последовательность, описываемую в настоящем описании, например, вариабельную область легкой цепи и/или вариабельную область тяжелой цепи, описываемую в настоящем описании, например, гуманизированную вариабельную область легкой цепи и/или вариабельную область тяжелой цепи, описанные в таблице 4.

Гуманизированное антитело содержит один или более аминокислотных остатков, вводимых в него из источника, который не принадлежит человеку. Такие не принадлежащие человеку аминокислотные остатки, как правило, обозначают как "импортируемые" остатки, которые, как правило, изымают из "импортируемого" вариабельного домена. Таким образом, гуманизированные антитела содержат одну или более CDR из не принадлежащих человеку молекул иммуноглобулина и каркасные области от человека. Гуманизация антител хорошо известна в данной области, и ее можно по существу проводить следующим способом по Winter и соавторов (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), заменой CDR грызуна или последовательностей CDR соответствующими последовательностями антитела человека, т.е. пересадкой CDR (EP 239.400; публикация PCT № WO 91/09967 и патенты США № 4816567, 6331415, 5225539, 5530101,; 5585089, 6548640, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки). В

таких гуманизированных химерных антителах по существу менее чем интактный вариабельный домен человека заменяли соответствующей последовательностью от не являющихся человеком видов. На практике гуманизированные антитела, как правило, представляют собой антитела человека, в которых некоторые остатки CDR и возможно некоторые остатки каркаса (FR) заменяют остатками из аналогичных участков в антителах грызуна. Гуманизацию антител также можно получать винированием или изменением поверхности (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994); и Roguska et al., PNAS, 91:969-973 (1994)) или перестановкой цепей (патент США № 5565332), содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления антитело по изобретению дополнительно подготавливают с использованием антитела, содержащего одну или более последовательностей VH и/или VL, описываемых в настоящем описании, которые можно использовать в качестве исходного вещество для конструирования модифицированного антитела, где модифицированное антитело может обладать измененными свойствами по сравнению с исходным антителом. В различных вариантах осуществления антитело конструируют посредством модификации одной или более аминокислот в одной или обеих вариабельных областях (т.е. VH и/или VL), например, в одной или более областей CDR и/или в одной или более каркасных областей.

В другом аспекте антигенсвязывающий домен представляет собой Т-клеточный рецептор ("TCR") или его фрагмент, например, одноцепочечный TCR (scTCR). Способы получения таких TCR известны в данной области. См., например, Willemsen R.A. et al., Gene Therapy, 7: 1369-1377 (2000); Zhang T. et al., Cancer Gene Ther., 11: 487-496 (2004); Aggen et al., Gene Ther., 19(4):365-74 (2012) (ссылки полностью включены в настоящее описание by its entirety). Например, можно конструировать scTCR, которые содержат гены Vα и Vβ из клона Т-клетки, связанные линкером

(например, гибким пептидом). Такой подход является очень пригодным для ассоциированной со злокачественной опухолью мишенью, которая само по себе является внутриклеточной, однако фрагмент такого антигена (пептида) презентируется на поверхности злокачественных клеток MHC.

В вариантах осуществления молекула NKR-CAR или TCAR, описываемая в настоящем описании, содержит антигенсвязывающий домен, содержащий scFv, который специфически связывается с опухолевым антигеном, описываемым в настоящем описании. Аминокислотные последовательности scFv, которые специфически связываются с опухолевыми антигенами, описываемыми в настоящем описании, предоставлены в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления CDR последовательностей scFv, предоставленных в таблице 4, является подчеркнутым. Точные границы аминокислотной последовательности данной CDR можно определять с использованием любой из ряда хорошо известных систем нумерации, включая системы нумерации, описанные Kabat или Chothia, или с использованием комбинации систем нумерации Kabat и Chothia.

Последовательности scFv, предоставленные в таблице 4, содержат линкерную последовательность, которая соединяет вариабельные области тяжелых и легких цепей scFv. Линкерная последовательность может представлять собой любую из линкерных последовательностей, описываемых в настоящем описании, например, линкерную последовательность, предоставленную в таблице 5.

Также следует отметить, что некоторые из последовательностей scFv, предоставленные в таблице 4, дополнительно содержат лидерную последовательность, например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, при этом некоторые из последовательностей scFv, предоставленные в таблице 4, не содержат лидерную последовательность, например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. Последовательности scFv, предоставленные в таблице 4, с лидерной последовательностью или без нее, например, SEQ ID NO: 1, также входят в изобретение. Специалист в данной области может легко использовать последовательности, предоставленные в таблице 4, для получения scFv или антигенсвязывающих доменов CAR с лидерной

последовательностью или без нее, например, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

Таблица 4: Иллюстративные антигенсвязывающие домены

Антиген-мишень	**Название**	**Аминокислотная последовательность**	**SEQ ID NO:**
CD19	huscFv1	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISKYLNWYQQKPGQAPRLLIYHTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGNTLPYTFGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYYSSSLKSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTLVTVSS	161
CD19	huscFv2	Eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss	162
CD19	huscFv3	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik	163
CD19	huscFv4	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik	164
CD19	huscFv5	Eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss	165
CD19	huscFv6	Eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqg	166

		tlvtvss	
CD19	huscFv7	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyssslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik	167
CD19	huscFv8	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyyqsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik	168
CD19	huscFv9	Eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss	169
CD19	Hu scFv10	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik	170
CD19	Hu scFv11	Eivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleikggggsggggsggggsqvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvss	171
CD19	Hu scFv12	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsgvslpdygvswirqppgkglewigviwgsettyynsslksrvtiskdnsknqvslklssvtaadtavyycakhyyyggsyamdywgqgtlvtvssggggsggggsggggseivmtqspatlslspgeratlscrasqdiskylnwyqqkpgqaprlliyhtsrlhsgiparfsgsgsgtdytltisslqpedfavyfcqqgntlpytfgqgtkleik	172
CD19	muCTL019	Diqmtqttsslsaslgdrvtiscrasqdiskylnwyqqkpdgtvklliyhtsrlhsgvpsrfsgsgsgtdysltisnleqediatyfcqqgntlpytfgggtkleitggggsggggsggggsevklqesgpglvapsqslsvtctvsgvslpdygvswirqpprkglewlgviwgsettyynsalksrltiikdnsksqvflkmnslqtddtaiyycakhyyyggsyamdywgqgtsvtv	173

		ss	
CD123	Mu1172	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGNTFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPPTFGAGTKLELKGGGGSGGGGSSGGGSQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYIFTNYGMNWVKQAPGKSFKWMGWINTYTGESTYSADFKGRFAFSLETSASTAYLHINDLKNEDTATYFCARSGGYDPMDYWGQGTSVTVSS	174
CD123	Mu1176	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKDLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNKYPYTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSSGGGSQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPDQGLEWIGRIDPYDSETHYNQKFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGNWDDYWGQGTTLTVSS	175
CD123	huscFv1	Divltqspdslavslgeratincrasesvdnygntfmhwyqqkpgqppklliyrasnlesgvpdrfsgsgsrtdftltisslqaedvavyycqqsnedpptfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqiqlvqsgselkkpgasvkvsckasgyiftnygmnwvrqapgqglewmgwintytgestysadfkgrfvfsldtsvstaylqinalkaedtavyycarsggydpmdywgqgttvtvss	176
CD123	huscFv2	Divltqspdslavslgeratincrasesvdnygntfmhwyqqkpgqppklliyrasnlesgvpdrfsgsgsrtdftltisslqaedvavyycqqsnedpptfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqiqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgyiftnygmnwvrqapgqrlewmgwintytgestysadfkgrvtitldtsastaymelsslrsedtavyycarsggydpmdywgqgttvtvss	177
CD123	huscFv3	Eivltqspatlslspgeratlscrasesvdnygntfmhwyqqkpgqaprlliyrasnlesgiparfsgsgsrtdftltisslepedvavyycqqsnedpptfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqiqlvqsgselkkpgasvkvsckasgyiftnygmnwvrqapgqglewmgwintytgestysadfkgrfvfsldtsvstaylqinalkaedtavyycarsggydpmdywgqgttvtvss	178
CD123	huscFv4	Eivltqspatlslspgeratlscrasesvdnygntfmhwyqqkpgqaprlliyrasnlesgiparfsgsgsrtdftltisslepedvavyycqqsnedpptfgqgtkleikggggsggggsggggsggggsqiqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgyiftnygmnwvrqapgqrlewmgwintytgestysadfkgrvtitldtsastaymelsslrsedtavyycarsggydpmdywgqgttvtvss	179
CD123	huscFv5	Qiqlvqsgselkkpgasvkvsckasgyiftnygmnwvrqapgqglewmgwintytgestysadfkgrfvfsldtsvstaylqinalkaedtavyycarsggydpmdywgqgttvtvssggggsggggsggggsggggsdivltqspdslavslgeratincrasesvdnygntfmhwyqqkpgqppklliyrasnlesgvpdrfsgsgsrtdftltisslqaedvavyycqqsnedpptfgqgtkleik	180

CD123	huscFv6	Qiqlvqsgselkkpgasvkvsckasgyiftnygmnwvrqapgqglewm gwintytgestysadfkgrfvfsldtsvstaylqinalkaedtavyyc arsggydpmdywgqgttvtvssggggsggggsggggsggggseivltq spatlslspgeratlscrasesvdnygntfmhwyqqkpgqaprlliyr asnlesgiparfsgsgsrtdftltisslepedvavyycqqsnedpptf gqgtkleik	181
CD123	huscFv7	Qiqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgyiftnygmnwvrqapgqrlewm gwintytgestysadfkgrvtitldtsastaymelsslrsedtavyyc arsggydpmdywgqgttvtvssggggsggggsggggsggggsdivltq spdslavslgeratincrasesvdnygntfmhwyqqkpgqppklliyr asnlesgvpdrfsgsgsrtdftltisslqaedvavyycqqsnedpptf gqgtkleik	182
CD123	huscFv8	Qiqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgyiftnygmnwvrqapgqrlewm gwintytgestysadfkgrvtitldtsastaymelsslrsedtavyyc arsggydpmdywgqgttvtvssggggsggggsggggsggggseivltq spatlslspgeratlscrasesvdnygntfmhwyqqkpgqaprlliyr asnlesgiparfsgsgsrtdftltisslepedvavyycqqsnedpptf gqgtkleik	183
CD123	123-1 человека	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgy tftgyymhwvrqapgqglewmgwinpnsggtnyaqkfqgrvtmtrdts istaymelsrlrsddtavyycardmnilatvpfdiwgqgtmvtvssgg ggsggggsggggsdiqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqsistylnw yqqkpgkapnlliyaafslqsgvpsrfsgsgsgtdftltinslqpedf atyycqqgdsvpltfgggtkleik	184
CD123	123-2 человека	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgy tftgyymhwvrqapgqglewmgwinpnsggtnyaqkfqgrvtltrdts istvymelsrlrsddtavyycardmnilatvpfdiwgqgtmvtvssgg ggsggggsggggsdiqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqsissylnw yqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsgsgsgtdftltvnslqpedf atyycqqgdsvpltfgggtrleik	185
CD123	123-3 человека	malpvtalllplalllhaarpqvqlvqsgaevkkpgasvkvsckasgy iftgyyihwvrqapgqglewmgwinpnsggtnyaqkfqgrvtmtrdts istaymelsglrsddpavyycardmnilatvpfdiwgqgtlvtvssgg ggsggggsggggsdiqltqspsslsasvgdrvtitcrasqsissylnw yqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsgsgsgtdftltvnslqpedf atyycqqgdsvpltfgggtkveik	186
CD123	123-4 человека	malpvtalllplalllhaarpqvqlqqsgaevkksgasvkvsckasgy tftdyymhwlrqapgqglewmgwinpnsgdtnyaqkfqgrvtltrdts istvymelsrlrsddtavyycardmnilatvpfdiwgqgtmvtvssas ggggsggrasggggsdiqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqsissyl nwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsgsgsgtdftltisslqpe dfatyycqqgdsvpltfgggtkveik	187

CD123	hzCAR-1	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWY QQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK	188
CD123	hzCAR-2	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWY QQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK	189
CD123	hzCAR-3	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWY QQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK	190
CD123	hzCAR-4	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWY QQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK	191
CD123	hzCAR-5	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASK SISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQG LEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS	192
CD123	hzCAR-6	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASK SISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQG LEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS	193
CD123	hzCAR-7	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASK SISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTI SSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQG LEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS	194

CD123	hzCAR-8	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASK SISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQG LEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRVTMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS	195
CD123	hzCAR-9	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGY TFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKS VSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWY QQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK	196
CD123	hzCAR-10	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGY TFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKS VSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWY QQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK	197
CD123	hzCAR-11	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGY TFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKS VSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWY QQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK	198
CD123	hzCAR-12	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGY TFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKS VSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWY QQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK	199
CD123	hzCAR-13	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASK SISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQG LEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS	200
CD123	hzCAR-14	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASK SISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQG LEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS	201

CD123	hzCAR-15	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASK SISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTI SSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQG LEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS	202
CD123	hzCAR-16	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASK SISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQG LEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDRFVFSVDKSVSTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS	203
CD123	hzCAR-17	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGY TFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKS ISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWY QQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK	204
CD123	hzCAR-18	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGY TFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKS ISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWY QQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK	205
CD123	hzCAR-19	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGY TFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKS ISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWY QQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK	206
CD123	hzCAR-20	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGY TFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKS ISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWY QQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK	207
CD123	hzCAR-21	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASK SISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMPGKG LEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS	208

CD123	hzCAR-22	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASK SISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMPGKG LEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS	209
CD123	hzCAR-23	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASK SISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTI SSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMPGKG LEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS	210
CD123	hzCAR-24	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASK SISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYTFTSYWMNWVRQMPGKG LEWMGRIDPYDSETHYNQKFKDHVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS	211
CD123	hzCAR-25	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGY TFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKA KSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASKSISKDLAWY QQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK	212
CD123	hzCAR-26	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGY TFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKA KSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKSISKDLAWY QQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK	213
CD123	hzCAR-27	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGY TFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKA KSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASKSISKDLAWY QQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAA TYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK	214
CD123	hzCAR-28	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGY TFTSYWMNWVRQAPGKGLVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKA KSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSISKDLAWY QQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIK	215

CD123	hzCAR-29	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASK SISKDLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SSLQPEDFATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKG LVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS	216
CD123	hzCAR-30	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASK SISKDLAWYQQKPGQAPRLLIYSGSTLQSGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKG LVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS	217
CD123	hzCAR-31	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCRASK SISKDLAWYQQKPDQAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFTI SSLEAEDAATYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKG LVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS	218
CD123	hzCAR32	MALPVTALLLPLALLLHAARPDVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASK SISKDLAWYQQKPGQPPKLLIYSGSTLQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDVAVYYCQQHNKYPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYWMNWVRQAPGKG LVWVSRIDPYDSETHYNQKFKDRFTISVDKAKSTAYLQMNSLRAEDTA VYYCARGNWDDYWGQGTTVTVSS	219
EGFR vIII	huscFv1	Eiqlvqsgaevkkpgatvkisckgsgfniedyyihwvqqapgkglewm gridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrsedtavyyc afrggvywgqgttvtvssggggsggggsggggsggggsdvvmtqspds lavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvsk ldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfggg tkveik	220
EGFR vIII	huscFv2	Dvvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqp pkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqg thfpgtfgggtkveikggggsggggsggggsggggseiqlvqsgaevk kpgatvkisckgsgfniedyyihwvqqapgkglewmgridpendetky gpifqgrvtitadtstntvymelsslrsedtavyycafrggvywgqgt tvtvss	221
EGFR vIII	huscFv3	Eiqlvqsgaevkkpgeslrisckgsgfniedyyihwvrqmpgkglewm gridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyyc afrggvywgqgttvtvssggggsggggsggggsggggsdvvmtqspls lpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqqrpgqsprrlislvsk ldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycwqgthfpgtfggg tkveik	222

EGFR vIII	huscFv4	Dvvmtqsplslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqqrpgqs prrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycwqg thfpgtfgggtkveikggggsggggsggggsggggseiqlvqsgaevk kpgeslrisckgsgfniedyyihwvrqmpgkglewmgridpendetky gpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggvywgqgt tvtvss	223
EGFR vIII	huscFv5	Eiqlvqsgaevkkpgatvkisckgsgfniedyyihwvqqapgkglewm gridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrsedtavyyc afrggvywgqgttvtvssggggsggggsggggsggggsdvvmtqspls lpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqqrpgqsprrlislvsk ldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycwqgthfpgtfggg tkveik	224
EGFR vIII	huscFv6	Eiqlvqsgaevkkpgeslrisckgsgfniedyyihwvrqmpgkglewm gridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyyc afrggvywgqgttvtvssggggsggggsggggsggggsdvvmtqspds lavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvsk ldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfggg tkveik	225
EGFR vIII	huscFv7	Dvvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqp pkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqg thfpgtfgggtkveikggggsggggsggggsggggseiqlvqsgaevk kpgeslrisckgsgfniedyyihwvrqmpgkglewmgridpendetky gpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggvywgqgt tvtvss	226
EGFR vIII	huscFv8	Dvvmtqsplslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqqrpgqs prrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycwqg thfpgtfgggtkveikggggsggggsggggsggggseiqlvqsgaevk kpgatvkisckgsgfniedyyihwvqqapgkglewmgridpendetky gpifqgrvtitadtstntvymelsslrsedtavyycafrggvywgqgt tvtvss	227
EGFR vIII	Mu310C	eiqlqqsgaelvkpgasvklsctgsgfniedyyihwvkqrteqglewi gridpendetkygpifqgratitadtssntvylqlssltsedtavyyc afrggvywgpgttltvssggggsggggsggggshmdvvmtqspltlsv aigqsasisckssqslldsdgktylnwllqrpgqspkrlislvsklds gvpdrftgsgsgtdftlrisrveaedlgiyycwqgthfpgtfgggtkl eik	228
мезотелин	ss1 (mu)	Q V Q L Q Q S G P E L E K P G A S V K I S C K A S G Y S F T G Y T M N W V K Q S H G K S L E W I G L I T P Y N G A S S Y N Q K F R G K A T L T V D K S S S T A Y M D L L S L T S E D S A V Y F C A R G G Y D G R G F D Y W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I E L T Q S P A I	229

		M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P G R F S G S G S G N S Y S L T I S S V E A E D D A T Y Y C Q Q W S G Y P L T F G A G T K L E I	
мезотелин	M5 (человека)	QVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIK	234
мезотелин	M11 (человека)	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQNFQGRVTMTRDTSISTAYMELRRLRSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIRMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIK	240
мезотелин	M1 (человека)	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSEDTAVYYCARGRYYGMDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATISCRASQSVSSNFAWYQQRPGQAPRLLIYDASNRATGIPPRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAAYYCHQRSNWLYTFGQGTKVDIK	230
мезотелин	M2 (человека)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDLRRTVVTPRAYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQDISNSLNWYQQKAGKAPKLLIYDASTLETGVPSRFSGSGSGTDFSFTISSLQPEDIATYYCQQHDNLPLTFGQGTKVEIK	231
мезотелин	M3 (человека)	QVQLVQSGAEVKKPGAPVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGEWDGSYYYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQTPSSLSASVGDRVTITCRASQSINTYLNWYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSFSPLTFGGGTKLEIK	232
мезотелин	M4 (человека)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQVPGKGLVWVSRINTDGSTTTYADSVEGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRDDDTAVYYCVGGHWAVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISDRLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFAVYYCQQYGHLPMYTFGQGTKVEIK	233
мезотелин	M6 (человека)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC	235

		ARYRLIAVAGDYYYYGMDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGVGRWLAWYQQKPGTAPKL LIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINNLQPEDFATYYCQQANSF PLTFGGGTRLEIK	
мезотелин	M7 (человека)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWV AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARWKVSSSSPAFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIV LTQSPATLSLSPGERAILSCRASQSVYTKYLGWYQQKPGQAPRLLIYD ASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTINRLEPEDFAVYYCQHYGGSPLIT FGQGTRLEIK	236
мезотелин	M8 (человека)	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYPFTGYSLHWVRQAPGQGLEWM GWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC ARDHYGGNSLFYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLT QSPSSISASVGDTVSITCRASQDSGTWLAWYQQKPGKAPNLLMYDAST LEDGVPSRFSGSASGTEFTLTVNRLQPEDSATYYCQQYNSYPLTFGGG TKVDIK	237
мезотелин	M9 (человека)	QVQLVQSGAEVKKPGASVEVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWM GIINPSGGSTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVHMELSSLRSEDTAVYYC ARGGYSSSSDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPPSLSASVGDRVTITCRASQDISSALAWYQQKPGTPPKLLIYDA SSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFSSYPLTFG GGTRLEIK	238
мезотелин	M10 (человека)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWM GWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC ARVAGGIYYYYGMDVWGQGTTITVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDI VMTQTPDSLAVSLGERATISCKSSHSVLYNRNNKNYLAWYQQKPGQPP KLLFYWASTRKSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQTQ TFPLTFGQGTRLEIN	239
мезотелин	M12 (человека)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWM GRINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC ARTTTSYAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQ SPSTLSASVGDRVTITCRASQSISTWLAWYQQKPGKAPNLLIYKASTL ESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNTYSPYTFGQG TKLEIK	241
мезотелин	M13 (человека)	QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCEASGFIFSDYYMGWIRQAPGKGLEWV SYIGRSGSSMYYADSVKGRFTFSRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC AASPVVAATEDFQHWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIV MTQTPATLSLSPGERATLSCRASQSVTSNYLAWYQQKPGQAPRLLLFG ASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTINRLEPEDFAMYYCQQYGSAPVTF GQGTKLEIK	242
мезотелин	M14 (человека)	QVQLVQSGAEVRAPGASVKISCKASGFTFRGYYIHWVRQAPGQGLEWM GIINPSGGSRAYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSDDTAMYYC	243

		ARTASCGGDCYYLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPPTLSASVGDRVTITCRASENVNIWLAWYQQKPGKAPKLLIYK SSSLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYQSYPLTF GGGTKVDIK	
мезотелин	M15 (человека)	QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWV SGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKDGSSSWSWGYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSSELTQD PAVSVALGQTVRTTCQGDALRSYYASWYQQKPGQAPMLVIYGKNNRPS GIPDRFSGSDSGDTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSSGYPVFGTGTK VTVL	244
мезотелин	M16 (человека)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWV SGISWNSGSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC AKDSSSWYGGGSAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSSELTQ EPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIFGRSRRP SGIPDRFSGSSSGNTASLIITGAQAEDEADYYCNSRDNTANHYVFGTG TKLTVL	245
мезотелин	M17 (человека)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWV SGISWNSGSTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC AKDSSSWYGGGSAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSSELTQ DPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRP SGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRGSSGNHYVFGTG TKVTVL	246
мезотелин	M18 (человека)	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWV SRINSDGSSTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC VRTGWVGSYYYYMDVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEI VLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSNYLAWYQQKPGQPPRLLIY DVSTRATGIPARFSGGGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPW TFGQGTKVEIK	247
мезотелин	M19 (человека)	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGYSRYYYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIV MTQSPATLSLSPGERAILSCRASQSVYTKYLGWYQQKPGQAPRLLIYD ASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTINRLEPEDFAVYYCQHYGGSPLIT FGQGTKVDIK	248
мезотелин	M20 (человека)	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKREAAAGHDWYFDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDI RVTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTF GQGTKVEIK	249
мезотелин	M21 (человека)	QVQLVQSWAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWM GIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSNLRSEDTAVYYC	250

		ARSPRVTTGYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQL TQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKAS SLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYSSYPLTFGG GTRLEIK	
мезотелин	M22 (человека)	QVQLVQSGAEVRRPGASVKISCRASGDTSTRHYIHWLRQAPGQGPEWM GVINPTTGPATGSPAYAQMLQGRVTMTRDTSTRTVYMELRSLRFEDTA VYYCARSVVGRSAPYYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISDYSAWYQQKPGKAPKL LIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISYLQSEDFATYYCQQYYSY PLTFGGGTKVDIK	251
мезотелин	M23 (человека)	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMHWVRQAPGQGLEWM GIINPSGGYTTYAQKFQGRLTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC ARIRSCGGDCYYFDNWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDI QLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASENVNIWLAWYQQKPGKAPKLLIYK SSSLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYQSYPLTF GGGTKVDIK	252
мезотелин	M24 (человека)	QITLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTAGVHVGWIRQPPGKALE WLALISWADDKRYRPSLRSRLDITRVTSKDQVVLSMTNMQPEDTATYY CALQGFDGYEANWGPGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMT QSPSSLSASAGDRVTITCRASRGISSALAWYQQKPGKPPKLLIYDASS LESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIDSLEPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQG TKVDIK	253
CLL-1	139115 (человека)	EVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARDLEMATIMGGYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQPAS VSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSNRP SGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTLDVVFGG GTKLTVL	254
CLL-1	139116 (человека)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWV SLISGDGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYC ARVFDSYYMDVWGKGTTVTVSSGGGGSGGGGSGSGGSEIVLTQSPLSL PVTPGQPASISCRSSQSLVYTDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNR DSGVPDRFSGSGSDTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQGTHWSFTFGQGT RLEIK	255
CLL-1	139118 (человека)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLE WIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVSISVDTSKNQFSLKLKYVTAADTAVYY CATPGTYYDFLSGYYPFYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVM TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPYTFGQ GTKLEIK	256
CLL-1	139122 (человека)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWV ANINEDGSAKFYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFC	257

		ARDLRSGRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSL SPGGRATLSCRASQSISGSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPTFGLGTKLEIK	
CLL-1	139117 (человека)	EVQLQQSGPGLVRPSETLSLTCTVSGGPVRSGSHYWNWIRQPPGRGLE WIGYIYYSGSTNYNPSLENRVTISIDTSNNHFSLKLSSVTAADTALYF CARGTATFDWNFPFDSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGSGGSDIQMTQ SPSSLSASIGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPWTFGQGT KLEIK	258
CLL-1	139119 (человека)	QVQLQESGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWV GEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA RGSGLVVYAIRVGSGWFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGDSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLMYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPWTF GQGTKVDIK	259
CLL-1	139120 (человека)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWV SSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDPSSSGSYYMEDSYYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPTTV IYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDS SNQVVFGGGTKLTVL	260
CLL-1	139121 (человека)	QVNLRESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKGLEWV SYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC AREALGSSWEWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPS RFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYDNLPLTFGGGTKLEIK	261
CLL-1	146259 (человека)	QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSCKAPANTFSDHVMHWVRQAPGQRFEWM GYIHAANGGTHYSQKFQDRVTITRDTSANTVYMDLSSLRSEDTAVYYC ARGGYNSDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMT QSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFNGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGG TKVEIK	262
CLL-1	146261 (человека)	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWV SYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDLSVRAIDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIV LTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDA SNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDFATYYCQQAYSTPFTFG PGTKVEIK	263
CLL-1	146262 (человека)	EVQLVQSGGGVVRSGRSLRLSCAASGFTFNSYGLHWVRQAPGKGLEWV ALIEYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDKSKSTLYLQMDNLRAEDTAVYYC AREGNEDLAFDIWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLT QSPSSLSASVGDRVTITCQASQFIKKNLNWYQHKPGKAPKLLIYDASS	264

		LQTGVPSRFSGNRSGTTFSFTISSLQPEDVATYYCQQHDNLPLTFGGG TKVEIK	
CLL-1	146263 (человека)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNVSSNYMTWVRQAPGKGLEWV SVIYSGGATYYGDSVKGRFTVSRDNSKNTVYLQMNRLTAEDTAVYYCA RDRLYCGNNCYLYYYYGMDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSDIQVTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYS TPPLTFGQGTKVEIK	265
CLL-1	146264 (человека)	QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSCKASGYPFTGYYIQWVRQAPGQGLEWM GWIDPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYC ASDSYGYYYGMDVWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVTFTCRASQGISSALAWYQQKPGKPPKLLIYDAS SLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNNYPLTFGG GTKVEIK	266
CLL-1	181268 (человека)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKGLEWV SYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDPYSSSWHDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGT KVDIK	267
BCMA	139103 (человека)	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLGWV SGISRSGENTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYC ARSPAHYYGGMDVWGQGTTVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSDIVLTQS PGTLSLSPGERATLSCRASQSISSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRR ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDSAVYYCQQYHSSPSWTFGQG TKLEIK	268
BCMA	139105 (человека)	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWV SGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYC SVHSFLAYWGQGTLVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSDIVMTQTPLSLP VTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRA SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTK VEIK	269
BCMA	139111 (человека)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWV SGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCS AHGGESDVWGQGTTVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSDIVMTQTPLSLS VTPGQPASISCKSSQSLLRNDGKTPLYWYLQKAGQPPQLLIYEVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGAYYCMQNIQFPSFGGGTKL EIK	270
BCMA	139100 (человека)	QVQLVQSGAEVRKTGASVKVSCKASGYIFDNFGINWVRQAPGQGLEWM GWINPKNNNTNYAQKFQGRVTITADESTNTAYMEVSSLRSEDTAVYYC ARGPYYYQSYMDVWGQGTMVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSDIVMTQT PLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLNWYLQKPGQSPQLLIYL	271

		GSKRASGVPDRFSGSGSGTDFTLHITRVGAEDVGVYYCMQALQTPYTF GQGTKLEIK	
BCMA	139101 (человека)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSDAMTWVRQAPGKGLEWV SVISGSGGTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKLDSSGYYYARGPRYWGQGTLVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSDIQL TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYGAS TLASGVPARFSGSGSGTHFTLTINSLQSEDSATYYCQQSYKRASFGQG TKVEIK	272
BCMA	139102 (человека)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYGITWVRQAPGQGLEWM GWISAYNGNTNYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARGPYYYYMDVWGKGTMVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSEIVMTQSPL SLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYVDWYLQKPGQSPQLLIYLGS NRASGVPDRFSGSGSGTDFKLQISRVEAEDVGIYYCMQGRQFPYSFGQ GTKVEIK	273
BCMA	139104 (человека)	EVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWV SGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCS AHGGESDVWGQGTTVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSEIVLTQSPATLS VSPGESATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRASGIPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYGSSLTFGGGTKVEIK	274
BCMA	139106 (человека)	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWV SGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCS AHGGESDVWGQGTTVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSEIVMTQSPATLS VSPGERATLSCRASQSVSSKLAWYQQKPGQAPRLLMYGASIRATGIPD RFSGSGSGTEFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYGSSSWTFGQGTKVEIK	275
BCMA	139107 (человека)	EVQLVETGGGVVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWV SGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCS AHGGESDVWGQGTTVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSEIVLTQSPGTLS LSPGERATLSCRASQSVGSTNLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP DRFSGGGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPWTFGQGTKVEI K	276
BCMA	139108 (человека)	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWV SYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARESGDGMDVWGQGTTVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTLAFGQGTKVDIK	277
BCMA	139109 (человека)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWV SGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCS AHGGESDVWGQGTTVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSDIQLTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKVEIK	278
BCMA	139110 (человека)	QVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWV SYISSSGNTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC	279

		ARSTMVREDYWGQGTLVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSDIVLTQSPLS LPVTLGQPASISCKSSESLVHNSGKTYLNWFHQRPGQSPRRLIYEVSN RDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPGTFGQG TKLEIK	
BCMA	139112 (человека)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWV SGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCS AHGGESDVWGQGTTVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSDIRLTQSPSPLS ASVGDRVTITCQASEDINKFLNWYHQTPGKAPKLLIYDASTLQTGVPS RFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDIGTYYCQQYESLPLTFGGGTKVEIK	280
BCMA	139113 (человека)	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWV SGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCS AHGGESDVWGQGTTVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSETTLTQSPATLS VSPGERATLSCRASQSVGSNLAWYQQKPGQGPRLLIYGASTRATGIPA RFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYNDWLPVTFGQGTKVEIK	281
BCMA	139114 (человека)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFALSNHGMSWVRRAPGKGLEWV SGIVYSGSTYYAASVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRPEDTAIYYCS AHGGESDVWGQGTTVTVSSASGGGGSGGRASGGGGSEIVLTQSPGTLS LSPGERATLSCRASQSIGSSSLAWYQQKPGQAPRLLMYGASSRASGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYAGSPPFTFGQGTKVEI K	282
BCMA	149362 (человека)	Qvqlqesgpglvkpsetlsltctvsggsisssyyywgwirqppgkgle wigsiyysgsayynpslksrvtisvdtsknqfslrlssvtaadtavyy carhwqewpdafdiwgqgtmvtvssggggsggggsggggsettltqsp afmsatpgdkviisckasqdiddamnwyqqkpgeaplfiiqsatspvp gipprfsgsgfgtdfsltinniesedaayyfclqhdnfpltfgqgtkl eik	283
BCMA	149363 (человека)	vnlresgpalvkptqtltltctfsgfslrtsgmcvswirqppgkalew laridwdedkfystslktrltiskdtsdnqvvlrmtnmdpadtatyyc arsgaggtsatafdiwgpgtmvtvssggggsggggsggggsdiqmtqs psslsasvgdrvtitcrasqdiynnlawfqlkpgsaprslmyaanksq sgvpsrfsgsasgtdftltisslqpedfatyycqhyyrfpysfgqgtk leik	284
BCMA	149364 (человека)	evqlvesggglvkpggslrlscaasgftfssysmnwvrqapgkglewv ssisssssyiyyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtavyyc aktiaavyafdiwgqgttvtvssggggsggggsggggseivltqspls lpvtpeepasiscrssqsllhsngynyldwylqkpgqspqlliylgsn rasgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycmqalqtpytfgqg tkleik	285
BCMA	149365 (человека)	evqlvesggglvkpggslrlscaasgftfsdyymswirqapgkglewv syisssgstiyyadsvkgrftisrdnaknslylqmnslraedtavyyc ardlrgafdiwgqgtmvtvssggggsggggsggggssyvltqspsvsa apgytatiscggnnigtksvhwyqqkpgqapllvirddsvrpskipgr	286

		fsgsnsgnmatltisgvqagdeadfycqvwdsdsehvvfgggtkltvl	
BCMA	149366 (человека)	qvqlvqsgaevkkpgasvkvsckpsgytvtshyihwvrrapgqglewm gminpsggvtaysqtlqgrvtmtsdtssstvymelsslrsedtamyyc aregsgsgwyfdfwgrgtlvtvssggggsggggsggggssyvltqpps vsvspgqtasitcsgdglskkyvswyqqkagqspvvlisrdkerpsgi pdrfsgsnsadtatltisgtqamdeadyycqawddttvvfgggtkltv l	287
BCMA	149367 (человека)	qvqlqesgpglvkpsqtlsltctvsggsissggyywswirqhpgkgle wigyiyysgstyynpslksrvtisvdtsknqfslklssvtaadtavyy caragiaarlrgafdiwgqgtmvtvssggggsggggsggggsdivmtq spssvsasvgdrviitcrasqgirnwlawyqqkpgkapnlliyaasnl qsgvpsrfsgsgsgadftltisslqpedvatyycqkynsapftfgpgt kvdik	288
BCMA	149368 (человека)	qvqlvqsgaevkkpgssvkvsckasggtfssyaiswvrqapgqglewm ggiipifgtanyaqkfqgrvtitadeststaymelsslrsedtavyyc arrggyqllrwdvgllrsafdiwgqgtmvtvssggggsggggsggggs syvltqppsvsvapgqtaritcggnnigsksvhwyqqkpgqapvlvly gknnrpsgvpdrfsgsrsgttasltitgaqaedeadyycssrdssgdh lrvfgtgtkvtvl	289
BCMA	149369 (человека)	evqlqqsgpglvkpsqtlsltcaisgdsvssnsaawnwirqspsrgle wlgrtyyrskwysfyaislksriiinpdtsknqfslqlksvtpedtav yycarsspeglflywfdpwgqgtlvtvssggdgsggggsggggsssel tqdpavsvalgqtiritcqgdslgnyyatwyqqkpgqapvlviygtnn rpsgipdrfsasssgntasltitgaqaedeadyycnsrdssghhllfg tgtkvtvl	290
BCMA	EBB-C1978-A4 (человека)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKVEGSGSLDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSSAYLAWYQQKPGQPPRLLISGASTRATGI PDRFGGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSFNGSSLFTFGQG TRLEIK	291
BCMA	EBB-C1978-G1 (человека)	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFSRYPMSWVRQAPGKGLEWV SGISDSGVSTYYADSAKGRFTISRDNSKNTLFLQMSSLRDEDTAVYYC VTRAGSEASDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATL SLSPGERATLSCRASQSVSNSLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAIYYCQQFGTSSGLTFGGGTKLEI K	292
BCMA	EBB-C1979-C1 (человека)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAIYYC ARATYKRELRYYYGMDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMT QSPGTVSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDSAVYYCQQYHSSPSWTFG	293

		QGTRLEIK	
BCMA	EBB-1978-C7 (человека)	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNTLKAEDTAVYYCARATYKRELRYYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSTLSLSPGESATLSCRASQSVSTTFLAWYQQKPGQAPRLLIYGSSNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIRRLEPEDFAVYYCQQYHSSPSWTFGQGTKVEIK	294
BCMA	EBB-1978-D10	EVQLVETGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARVGKAVPDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQTPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYSFGQGTRLEIK	295
BCMA	EBB-1979-C12 (человека)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFDDYAMHWVRQRPGKGLEWVASINWKGNSLAYGDSVKGRFAISRDNAKNTVFLQMNSLRTEDTAVYYCASHQGVAYYNYAMDVWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRATQSIGSSFLAWYQQRPGQAPRLLIYGASQRATGIPDRFSGRGSGTDFTLTISRVEPEDSAVYYCQHYESSPSWTFGQGTKVEIK	296
BCMA	EBB-1980-G4 (человека)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVVRDGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGNGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPRFTFGPGTKVDIK	297
BCMA	EBB-1980-D2 (человека)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKIPQTGTFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPSWTFGQGTRLEIK	298
BCMA	EBB-1978-A10 (человека)	EVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTMSRENDKNSVFLQMNSLRVEDTGVYYCARANYKRELRYYYGMDVWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPGTLSLSPGESATLSCRASQRVASNYLAWYQHKPGQAPSLLISGASSRATGVPDRFSGSGSGTDFTLAISRLEPEDSAVYYCQHYDSSPSWTFGQGTKVEIK	299
BCMA	EBB-1978-D4	EVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKALVGATGAFDIWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLSSNFLAWYQQKPGQAPGLLIYGASNWATGTPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQYYGTSPMYTFGQGTKVEIK	300

BCMA	EBB-1980-A2 (человека)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLWFGEGFDPWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGGGTKVDIK	301
BCMA	EBB-1981-C3	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVGYDSSGYYRDYYGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGTSSRATGISDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGNSPPKFTFGPGTKLEIK	302
BCMA	EBB-1978-G4 (человека)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKMGWSSGYLGAFDIWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVASSFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASGRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGGSPRLTFGGGTKVDIK	303
BCMA	Гуманизированный huscFvBCMA 1	Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S N Y W M H W V R Q A P G Q G L E W M G A T Y R G H S D T Y Y N Q K F K G R V T I T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R G A I Y N G Y D V L D N W G Q G T L V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q D I S N Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y Y T S N L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y R K L P W T F G Q G T K L E I K R	304
BCMA	Гуманизированный huscFvBCMA 2	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSNLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YRKLPWTFGQ GTKLEIKRGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVK KPGSSVKVSC KASGGTFSNY WMHWVRQAPG QGLEWMGATYRGHSDTYYNQ KFKGRVTITA DKSTSTAYME LSSLRSEDTA VYYCARGAIYNGYDVLDNWGQGTLVTVSS	305
CD33	141643 (человека)	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLGGSLPDYGMDVWGQGTMVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTLITFGQGTKVDIK	306

CD33	141644 (человека)	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKASGYIFTNYYVHWVRQAPGQGLEWM GIISPSGGSPTYAQRLQGRVTMTRDLSTSTVYMELSSLTSEDTAVYFC ARESRLRGNRLGLQSSIFDHWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGS DIRMTQSPPSLSASVGDRVTIPCQASQDINNHLNWYQQKPGKAPQLLI YDTSNLEIGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQQYENLPL TFGGGTKVEIK	307
CD33	141645 (человека)	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKEDTIRGPNYYYYGMDVWGQGTTVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSET TLTQSPSSVSASVGDRVSITCRASQDIDTWLAWYQLKPGKAPKLLMYA ASNLQGGVPSRFSGSGSGTDFILTISSLQPEDFATYYCQQASIFPPTF GGGTKVDIK	308
CD33	141646 (человека)	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWM GIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSITTAYLQWSSLRASDSAMYYC ARGGYSDYDYYFDFWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQ SPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIY LGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPFT FGGGTKVEIK	309
CD33	141647 (человека)	QVQLVQSGGDLAQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWV AVIWPDGGQKYYGDSVKGRFTVSRDNPKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYC VRHFNAWDYWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSSL SAYVGGRVTITCQASQGISQFLNWFQQKPGKAPKLLISDASNLEPGVP SRFSGSGSGTDFTFTITNLQPEDIATYYCQQYDDLPLTFGGGTKVEIK	310
CD33	141648 (человека)	QVQLVQSGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSIFAMHWVRQAPGKGLEWV ATISYDGSNAFYADSVEGRFTISRDNSKDSLYLQMDSLRPEDTAVYYC VKAGDGGYDVFDSWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQS PLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYL GSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPTFG PGTKVDIK	311
CD33	141649 (человека)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKETDYYGSGTFDYWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGDRVTISCRASQGIGIYLAWYQQRSGKPPQLLIHGASTL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFASYWCQQSNNFPPTFGQGT KVEIK	312
CD33	141650 (человека)	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCKASGYMFTDFFIHWVRQAPGQGLEWM GWINPNSGVTKYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYC ATWYSSGWYGIANIWGQGTMVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQ SPSSLSASVGDRVTITCQASHDISNYLHWYQQKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFTGSGSGTDFTLTIRSLQPEDVAAYYCQQSDDLPHTFGQGT KVDIK	313
CD33	141651	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYWIGWVRQMPGKGLEWM	314

	(человека)	GIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYC ARHGPSSWGEFDYWGQGTLVTVSSASGGGGSGGGGSGGGGSDIRLTQS PSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTK VDIK	
CD33	2213 (гуманизированный)	NIMLTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQ SPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQSEDLAIYYCHQ YLSSRTFGGGTKLEIKRGGGGSGGGGSSGGGSQVQLQQPGAEVVKPGA SVKMSCKASGYTFTSYYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKF KGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGAGT TVTVSS	315
CD33	My96 (гуманизированный)	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQ SPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQ YLSSRTFGQGTKLEIKRGGGGSGGGGSSGGGSQVQLQQPGAEVVKPGA SVKMSCKASGYTFTSYYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKF QGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGT TVTVSS	316
Клаудин6	muMAB 64A	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWI GLINPYNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYC ARDYGFVLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQS PSIMSVSPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGTSPKLCIYSTSNLAS GVPARFSGRGSGTSYSLTISRVAAEDAATYYCQQRSNYPPWTFGGGTK LEIK	317
Клаудин6	mAb206-LCC	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWI GLINPYNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYC ARDYGFVLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQS PAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYLHWFQQKPGTSPKLWVYSTSNLPS GVPARFGGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSIYPPWTFGGGTK LEIK	318
Клаудин6	mAb206-SUBG	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWI GLINPYNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYC ARDYGFVLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQIVLTQS PSIMSVSPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGTSPKLGIYSTSNLAS GVPARFSGRGSGTSYSLTISRVAAEDAATYYCQQRSNYPPWTFGGGTK LEIK	319
WT1	ESK-1	QAVVTQPPSA SGTPGQRVTI SCSGSSSNIG SNTVNWYQQV PGTAPKLLIY SNNQRPSGVPDRFSGSKSGT SASLAISGLQ SEDEADYYCA AWDDSLNGWV FGGGTKLTVL GSRGGGGSGG GGSGGGGSLE MAQMQLVQSG AEVKEPGESL RISCKGSGYS FTNFWISWVR QMPGKGLEWM	320
WT1	WT1-2	QTVVTQPPSA SGTPGQRVTI SCSGSSSNIG SNYVYWYQQL PGTAPKLLIYRSNQRPSGVP DRFSGSKSGT SASLAISGPR	321

		SVDEADYYCA AWDDSLNGVV FGGGTKLTVL GSRGGGGSGG GGSGGGSLEM AQVQLVQSGA EVKKPGSSVK VSCKASGGTF SSYAISWVRQ APGQGLEWMG GIIPIFGTAN YAQKFQGRVT ITADESTSTA YMELSSLRSE DTAVYYCARR IPPYYGMDVW GQGTTVTVSS				
WT1	WT1-3	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SYSTPLTFGG GTKVDIKRSR GGGGSGGGGS GGGGSLEMAQ VQLQQSGPGL VKPSQTLSLT CAISGDSVSS NSAAWNWIRQ SPSRGLEWLG RTYYGSKWYN DYAVSVKSRI TINPDTSKNQ FSLQLNSVTP EDTAVYYCAR GRLGDAFDIW GQGTMVTVSS				322
WT1	WT1-4	DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCRASQNIN KWLAWYQQRP GKAPQLLIYK ASSLESGVPS RFSGSGSGTE YTLTISSLQP DDFATYYCQQ YNSYATFGQG TKVEIKRSRG GGGSGGGGSG GGGSLEMAQV QLVQSGAEVK KPGESLKISC KGSGYNFSNK WIGWVRQLPG RGLEWIAIIY PGYSDITYSP SFQGRVTISA DTSINTAYLH WHSLKASDTA MYYCVRHTAL AGFDYWGLGT LVTVSS				323
WT1	WT1-5	QSVVTQPPSV SVAPGKTARI TCGRNNIGSK SVHWYQQKPG QAPVLVVYDD SDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRVEAG DEADYYCQVW DSSSDHVVFG GGTKLTVLGS RGGGGSGGGG SGGSLEMAEV QLVQSGGGVV RPGGSLRLSC AASGFTFDDY GMSWVRQAPG KGLEWVSGIN WNGGSTGYAD SVRGRFTISR DNAKNSLYLQ MNSLRAEDTA LYYCARERGY GYHDPHDYWG QGTLVTVSS				324
WT1	WT1-6	QSVLTQPPSV SGAPGQRVTI SCTGSSSNIG AGYDVHWYQQ LPGTAPKLLI YGNSNRPSGV PDRFSGSKSG TSASLAISGL QSEDEADYYC AAWDDSLNGY VFGTGTKLTV LGSRGGGGSG GGGSGGGGSL EMAEVQLVET GGGLLQPGGS LRLSCAASGF SVSGTYMGWV RQAPGKGLEW VALLYSGGGT YHPASLQGRF IVSRDSSKNM VYLQMNSLKA EDTAVYYCAK GGAGGGHFDS WGQGTLVTVS S				325
WT1	WT1-7	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMSWVRQA PGKGLEWVSQ IDPWGQETLY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKLT GRFDYWGQGT LVTVSSGGGG SGGGGSGGGG STDIQMTQSP SSLSASVGDR VTITCRASQS ISSYLNWYQQ KPGKAPKLLI YSASQLQSGV PSRFSGSGSG TDFTLTISSL QPEDFATYYC QQGPGTPNTF GQGTKVEIKR A				326

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен против мезотелин представляет собой антигенсвязывающий участок, например, CDR, связывающий домен антитела против мезотелина,

описанный в таблице 4, например, ss1, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, 10, M11, M12, M13, M14, M15, M16, M17, M18, M19, M20, M21, M22, M23 или M24, например, ss1, M5 или M11. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен против мезотелина представляет собой антигенсвязывающий участок человека, например, CDR, связывающего домена антитела человека против мезотелина, описанного в таблице 4, например, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, 10, M11, M12, M13, M14, M15, M16, M17, M18, M19, M20, M21, M22, M23, или M24, например, M5 или M11. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с мезотелином, представляет собой антигенсвязывающий домен в соответствии с таблицами 2-3 WO 2015/090230, включенными в настоящее описание посредством ссылки.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен человека, который связывается с мезотелином, связывается с тем же эпитопом, что и эпитоп связываемый антигенсвязывающим доменом SS1 мыши (предоставленным в таблице 4). В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен человека, который связывается с мезотелином, связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, связываемого антигенсвязывающим доменом SS1 мыши (предоставленным в таблице 4). Как описано в WO 2015/090230, включенной, таким образом, посредством ссылки, связывающие домены антитела человека против мезотелина M-5 и M-11, описанные в таблице 4, связываются с эпитопом, отличным от SS1.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен против CLL-1 представляет собой антигенсвязывающий участок, например, CDR, антитела, доступного от R&D, Ebiosciences, Abcam, например, PE-CLL1-hu кат. № 353604 (BioLegend) и PE-CLL1 (CLEC12A) кат. № 562566 (BD). В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий участок против CLL-1 представляет собой антигенсвязывающий участок, например, CDR, связывающего домена антитела против CLL-1, описанного в таблице 4, например, 139115, 139116, 139117, 139118, 139119, 139120, 139121, 139121, 139122, 146259, 146261, 146262, 146263, 146264 или 181286.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен против CD123 представляет собой антигенсвязывающий участок, например, CDR, связывающего домена антитела против CD123, описанный в таблице 4, например, CD123-1, CD123-2, CD123-3, CD123-4 или hzCAR1-32. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен против CD123 представляет собой антигенсвязывающий домен в соответствии с таблицами 1-2 WO 2014/130635, включенными в настоящее описание посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен против CD33 представляет собой антигенсвязывающий участок, например, CDR, антитела, описанный, например, у Bross et al., Clin. Cancer Res., 7(6):1490-1496 (2001) (гемтузумаб озогамицин, hP67.6), Caron et al., Cancer Res., 52(24):6761-6767 (1992) (линтузумаб, HuM195), Lapusan et al., Invest. New Drugs, 30(3):1121-1131 (2012) (AVE9633), Aigner et al., Leukemia, 27(5): 1107-1115 (2013) (AMG330, CD33 BiTE), Dutour et al., Adv. hematol., 2012:683065 (2012), и Pizzitola et al., Leukemia, doi:10.1038/Lue.2014,62 (2014). В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий участок против CD33 представляет собой антигенсвязывающий участок, например, CDR, связывающего домена антитела против CD33, описанный в таблице 4, например, 141643, 141644, 141645, 141646, 141647, 141648, 141649, 141650, 141651, 2213 или My96.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен против GD2 представляет собой антигенсвязывающий участок, например, CDR, антитела, описанного, например, у Mujoo et al., Cancer Res., 47(4):1098-1104 (1987); Cheung et al., Cancer Res., 45(6):2642-2649 (1985), Cheung et al., J. Clin. Oncol., 5(9):1430-1440 (1987), Cheung et al., J. Clin. Oncol., 16(9):3053-3060 (1998), Handgretinger et al., Cancer Immunol. Immunother., 35(3):199-204 (1992). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен против GD2 представляет собой антигенсвязывающий участок антитела, выбранного из mAb 14.18, 14G2a, ch14.18, hu14.18, 3F8, hu3F8, 3G6, 8B6, 60C3, 10B8, ME36.1 и 8H9, см. например, WO2012033885, WO2013040371, WO2013192294, WO2013061273, WO2013123061, WO2013074916 и

WO201385552. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен против GD2 представляет собой антигенсвязывающий участок антитела, описанного в публикации US № 20100150910 или публикации PCT № WO 2011160119.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен против BCMA представляет собой антигенсвязывающий участок, например, CDR, антитела, описанный, например, в WO2012163805, WO200112812 и WO2003062401. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий участок против bcma представляет собой антигенсвязывающий участок, например, CDR, связывающего домена против bcma, описанный в таблице 4, например, 139100, 139101, 139102, 139103, 139104, 139105, 139106, 139107, 139108, 139109, 139110, 139111, 139112, 139113, 139114, 149362, 149363, 149364, 149365, 149366, 149367, 149368, 149369, EB c1978-A4, EB C1978-G1, EBB C1978-C7, EBB C1978-D10, EBB C1978-A10, EBB C1978-D4, EBB C1978-G4, EBB C1979-C1, EBB C1979-C12, EBB C1980-G4, EBB C1980-D2, EBB C1980-A2, EBB C1981- C3, huscFvBCMA1 или huscFvBCMA2.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен против WT-1 представляет собой антигенсвязывающий участок, например, CDR, антитела, описанного, например, у Dao et al., Sci. Transl. Med., 5(176):176ra33 (2013) или в WO2012/135854. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен против WT1 представляет собой антигенсвязывающий участок, например, CDR, связывающего домена антитела против WT1, описанного в таблице 4, например, ESK1, WT1-2, WT1-3, WT1-4, WT1-5, WT1-6 или WT1-7.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен против CLDN6 представляет собой антигенсвязывающий участок, например, CDR, антитела IMAB027 (Ganymed Pharmaceuticals), см. например, clinicaltrial.gov/show/NCT02054351. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен против CLDN6 представляет собой антигенсвязывающий участок, например, CDR, связывающего домена антитела против CLDN6, описанного в таблице 4, например, muMAB64A, mAb206-LCC или mAb206-SUBG.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен содержит одну, две, три (например, все три) CDR тяжелой цепи, CDR1 HC, CDR2 HC и CDR3 HC из антитела, приведенного выше, и/или одну, две, три (например, все три) CDR легкой цепи, CDR1 LC, CDR2 LC и CDR3 LC из антитела, приведенного выше. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела, приведенного выше.

Не принадлежащие антителу каркасы

В вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит не принадлежащий антителу каркас, например, фибронектин, анкирин, доменное антитело, липокалин, иммунофармацевтическое средство на основе модульного белка малого размера, максиантитела, белок А или аффилин. Не принадлежащий антителу каркас обладает способностью связываться с антигеном-мишенью на клетке. В вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой полипептид или его фрагмент природного белка, экспрессируемого клеткой. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит не принадлежащий антителу каркас. Можно применять широкий спектр не принадлежащих антителу каркасов при условии, что получаемый полипептид содержит по меньшей мере одну связывающую область, которая специфически связывается с антигеном-мишенью на клетке-мишени.

Не принадлежащие антителу каркасы ключают: фибронектин (Novartis, MA), анкирин (Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland), доменные антитела (Domantis, Ltd., Cambridge, MA и Ablynx nv, Zwijnaarde, Belgium), липокалин (Pieris Proteolab AG, Freising, Germany), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), максиантитела (Avidia, Inc., Mountain View, CA), белок А (Affibody AG, Sweden) и аффилин (гамма-крсталлин или убиквитин) (Scil Proteins GmbH, Halle, Germany).

Каркасы на основе фибронектина может быть основан на домене фибронектина III типа (например, десятый модуль фибронектина III типа (домен ^{10}Fn3)). Домен фибронектина III типа содержит 7 или 8 бета-цепей, которые располагаются между двумя бета-листами,

которые сами уложены друг напротив друга с образованием сердцевины белка, и дополнительно содержат петли (аналогичные CDR), которые соединяют бета-цепи друг с другом и предоставляют растворителю. Существует по меньшей мере три такие петли на каждом краю сэндвича бета-листа, где край представляет собой границу белка, перпендикулярного направлению бета-цепей (см. US 6818418). Вследствие такой структуры такой не принадлежащий антителу каркас имитирует антигенсвязывающие свойства, которые являются аналогичными по природе и аффинности связывания антител. Такие каркасы можно использовать в стратегии рандомизации и перестановке петель *in vitro*, что является аналогичным процессу созревания аффинности антител *in vivo*.

Технология анкирина основана на использовании белков с повторяющимися модулями, получаемыми из анкирина, в качестве каркаса для содержания вариабельных областей, которые можно использовать для связывания различных мишеней. Повторяющийся модуль анкирина представляет собой полипептид длиной 33 аминокислоты, состоящий из двух встречно-параллельных α-спиралей и β-изгиба. Связывание вариабельных областей в основном оптимизируют с использованием рибосомного дисплея.

Авимеры получают из природного содержащего А-домен белка, такого как HER3. Эти домены используются в природе для взаимодействий белок-белок, и у человека более 250 белков структурно основаны на А-доменах. Авимеры состоят из ряда различных мономеров (2-10) "А-домена", связанных аминокислотными линкерами. Можно создавать авимеры, которые связываются с антигеном-мишенью, с использованием методологии, описанной, например, в публикациях патентных заявок США № 20040175756, 20050053973, 20050048512 и 20060008844.

Аффинные лиганды аффитела представляют собой небольшие простые белки, состоящие из трехспирального пучка на основе каркаса одного из IgG-связывающих доменов белка А. Белок А представляет собой поверхностный белок из бактерии *Staphylococcus aureus*. Этот каркасный домен состоит из 58 аминокислот, 13 из которых располагаются в случайном порядке с

образованием библиотеки аффител с большим числом вариантов лигандов (см., например, US 5831012). Молекулы аффител имитируют антитела, они имеют молекулярную массу 6 кДа по сравнению с молекулярной массой антител, которая составляет 150 кДа. Несмотря на свой небольшой размер, участок связывания молекул аффител является аналогичным участку связывания антитела.

Белки-миметики эпитопа (PEM) представляют собой циклические пептидоподобные молекулы среднего размера (MW 1-2 кДа), имитирующие бета-шпилечные вторичные структуры белков, основной вторичной структуры, участвующей во взаимодействиях белок-белок.

Антигенсвязывающие домены, спаренные вопреки принципу комплементарности

Было обнаружено, что клетки, содержащие совокупность химерных погруженных в мембрану рецепторов, каждый из которых содержит антигенсвязывающий домен (CMER), для которых взаимодействия между антигенсвязывающим доменом CMER могут являться нежелательными, например, т.к. оно ингибирует способность одного или более антигенсвязывающих доменов связываться со своим когнатным антигеном. Таким образом, в настоящем описании раскрыты первый и второй неприродный CMER, содержащий антигенсвязывающие домены, которые сводят к минимуму такие взаимодействия, когда экспрессируются в одной и той же клетке. В одном из вариантов осуществления совокупность CMER содержит два TCAR. В одном из вариантов осуществления совокупность CMER содержит TCAR и другой CMER. В одном из вариантов осуществления совокупность CMER содержит два NKR-CAR. В одном из вариантов осуществления совокупность CMER содержит NKR-CAR и другой CMER. В одном из вариантов осуществления совокупность CMER содержит TCAR и NKR-CAR.

В некоторых вариантах осуществления описываемое в заявке изобретение содержит первый и второй CMER, где антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CMER и указанного второго CMER не содержит вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CMER и указанного второго CMER представляет собой scFv,

а другой не является scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CMER и указанного второго CMER содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CMER и указанного второго CMER содержит нанотело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CMER и указанного второго CMER содержит VHH-домен верблюда

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CMER и указанного второго CMER содержит scFv, а другой содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CMER и указанного второго CMER содержит scFv, а другой содержит нанотело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого CMER и указанного второго CMER содержит scFv, а другой содержит VHH-домен верблюда.

В некоторых вариантах осуществления при наличии на поверхности клетки связывание антигенсвязывающего домена указанного первого CMER со своим когнатным антигеном по существу не снижается в результате наличия указанного второго CMER. В некоторых вариантах осуществления связывание антигенсвязывающего домена указанного первого CMER со своим когнатным антигеном в присутствии указанного второго CMER составляет 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от связывания антигенсвязывающего домена указанного первого CMER со своим когнатным антигеном при отсутствии указанного второго CMER.

В некоторых вариантах осуществления при наличии на поверхности клетки антигенсвязывающие домены указанного первого CMER и указанного второго CMER взаимодействуют друг с другом в меньшей степени, чем, если бы оба представляли собой

антигенсвязывающие домены scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены указанного первого CMER и указанного второго CMER взаимодействуют друг с другом на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньше, чем если бы оба представляли собой антигенсвязывающие домены scFv.

В некоторых вариантах осуществления описываемое в заявке изобретение содержит первый и второй KIR-CAR, где антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR не содержит вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR представляет собой scFv, а другой не является scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR содержит нанотело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR содержит VHH-домен верблюда.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR содержит scFv, а другой содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR содержит scFv, а другой содержит нанотело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR содержит scFv, а другой содержит VHH-домен верблюда.

В некоторых вариантах осуществления при наличии на поверхности клетки связывание антигенсвязывающего домена

указанного первого KIR-CAR со своим когнатным антигеном по существу не снижается в результате присутствия указанного второго KIR-CAR. В некоторых вариантах осуществления связывание антигенсвязывающего домена указанного первого KIR-CAR со своим когнатным антигеном в присутствии указанного второго KIR-CAR составляет 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от связывания антигенсвязывающего домена указанного первого KIR-CAR со своим когнатным антигеном при отсутствии указанного второго KIR-CAR.

В некоторых вариантах осуществления при наличии на поверхности клетки антигенсвязывающие домены указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR взаимодействуют друг с другом в меньшей степени чем, если бы оба представляли собой антигенсвязывающие домены scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены указанного первого KIR-CAR и указанного второго KIR-CAR взаимодействуют друг с другом на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньше, чем если бы оба представляли собой антигенсвязывающие домены scFv.

В некоторых вариантах осуществления описываемое в заявке изобретение содержит первый и второй TCAR, где антигенсвязывающий домен одного из указанного первого TCAR и указанного второго TCAR не содержит вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого TCAR и указанного второго TCAR представляет собой scFv, а другой не является scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого TCAR и указанного второго TCAR содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши, или не принадлежащего антителу каркаса. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого TCAR и указанного второго TCAR содержит нанотело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого TCAR и указанного второго TCAR содержит VHH-домен верблюда.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого TCAR и указанного второго TCAR содержит scFv, а другой содержит одиночный VH-домен, например, одиночный VH-домен верблюда, акулы или миноги или одиночный VH-домен, получаемый из последовательности человека или мыши. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого TCAR и указанного второго TCAR содержит scFv, а другой содержит нанотело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен одного из указанного первого TCAR и указанного второго TCAR содержит scFv, а другой содержит VHH-домен верблюда.

В некоторых вариантах осуществления при наличии на поверхности клетки связывание антигенсвязывающего домена указанного первого TCAR со своим когнатным антигеном по существу не снижается в результате наличия указанного второго TCAR. В некоторых вариантах осуществления связывание антигенсвязывающего домена указанного первого TCAR со своим когнатным антигеном в присутствии указанного второго TCAR составляет 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от связывания антигенсвязывающего домена указанного первого TCAR со своим когнатным антигеном при отсутствии указанного второго TCAR.

В некоторых вариантах осуществления при наличии на поверхности клетки антигенсвязывающие домены указанного первого TCAR и указанного второго TCAR взаимодействуют друг с другом в меньшей степени чем, если бы оба представляли собой антигенсвязывающие домены scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены указанного первого TCAR и указанного второго TCAR взаимодействуют друг с другом на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% меньше, чем если бы оба представляли собой антигенсвязывающие домены scFv.

Биспецифические CAR

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, для NKR-CAR или TCAR, описываемого в настоящем описании, содержит молекулу полиспецифического антитела, например, молекулу биспецифического антитела. Биспецифическое антитело обладает специфичностью не

более чем к двум антигенам. Биспецифическая молекула антител характеризуется первой последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания к первому эпитопу, и второй последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания ко второму эпитопу. В одном из вариантов осуществления первые и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы перекрываются. В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы не перекрываются. В одном из вариантов осуществления первый и второй эпитопы находятся на различных антигенах, например, различных белках (или различных субъединицах мультимерного белка). В одном из вариантов осуществления биспецифическая молекула антитела содержит последовательность вариабельного домен тяжелой цепи и последовательность вариабельного домен легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания с первым эпитопом, и последовательность вариабельного домен тяжелой цепи и последовательность вариабельного домен легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания со вторым эпитопом. В одном из вариантов осуществления биспецифическая молекула антитела содержит полуантитело, обладающее специфичностью связывания с первым эпитопом, и полуантитело, обладающее специфичностью связывания со вторым эпитопом. В одном из вариантов осуществления биспецифическая молекула антитела содержит полуантитело или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания с первым эпитопом, и полуантитело или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания со вторым эпитопом. В одном из вариантов осуществления биспецифическая молекула антител содержит scFv или его фрагмент, который обладает специфичностью связывания с первым эпитопом, и scFv или его фрагмент, который обладает специфичностью связывания со вторым эпитопом.

В определенных вариантах осуществления молекула антител представляет собой полиспецифическую (например, биспецифическую или триспецифическую) молекулу антитела. Протоколы получения

биспецифических или гетеродимерных молекул антител известны в данной области, включая, но, не ограничиваясь ими, например, подход "выступ-во-впадину", описанный, например, в US 5731168; спаривание Fc под действием электростатического взаимодействия, как описано, например, в WO 09/089004, WO 06/106905 и WO 2010/129304; образование гетеродимеров с доменами, сконструированными с помощью стандартной замены цепей (SEED), как описано, например, в WO 07/110205; замену Fab-фрагментов, как описано, например, в WO 08/119353, WO 2011/131746 и WO 2013/060867; двойной конъюгат антитела, например, посредством сшивания антител с получением биспецифической структуры с использованием гетеробифункционального реагента, содержащего реакционноспособную аминогруппу и реакционноспособную сульфгидрильную группу, как описано, например, в US 4433059; биспецифические детерминанты антитела, получаемые рекомбинацией полуантител (пар тяжелой-легкой цепей или Fab) из различных антител с использованием цикла восстановления и окисления дисульфидных связей между двумя тяжелыми цепями, как описано, например, в US 4444878; трифункциональные антитела, например, три фрагмента Fab', сшитые посредством реакционноспособных сульфгидрильных групп, как описано, например, в US5273743; биосинтетические связывающие белки, например, пару scFv, сшитых посредством хвостов на С-конце предпочтительно посредством химического перекрестного сшивания дисульфидными или аминогруппами, как описано, например, в US5534254; бифункциональные антитела, например, фрагменты Fab с различной специфичностью связывания, димеризованные посредством лейциновых застежек (например, c-fos и c-jun), которые содержат замещенный константный домен, как описано, например, в US5582996; биспецифические и олигоспецифические моно- и олиговалентные рецепторы, например, области VH-CH1 двух антител (двух фрагментов Fab), связанных через полипептидный спейсер между областью CH1 одного антитела и областью VH другого антитела, как правило, со связанными легкими цепями, как описано, например, в US5591828; биспецифические конъюгаты ДНК-антитело, например, сшивание антител или фрагментов Fab посредством двухцепочечного

участка ДНК, как описано, например, в US5635602; биспецифические слитые белки, например, экспрессирующую конструкцию, содержащую два scFv с гидрофильным спиральным пептидным линкером между ними и полной константной областью, как описано, например, в US5637481; поливалентные и связывающие белки, например, димер полипептидов, содержащих первый домен со связывающей областью вариабельной области тяжелой цепи Ig и второй домен со связывающей областью вариабельной области легкой цепи Ig, как правило, называемых диателами (также предусматривают структуры высшего порядка для получения биспецифических, триспецифических или тетраспецифических молекул, как описано, например, в US5837242; конструкции миниантител со связанными VL и VH цепями, дополнительно соединенными пептидными спейсерами с шарнирной областью антитела и областью CH3, которые можно подвергать димеризации с образованием биспецифических/поливалентних молекул, как описано, например, в US5837821; домены VH и VL, связанные с коротким пептидным линкером (например, 5 или 10 аминокислотами) или без линкера в любой ориентации, которые могут образовывать димеры с образованием биспецифических диател; тримеры и тетрамеры, как описано, например, в US5844094; нить доменов VH (или доменов VL в представителях семейства), соединенных пептидными связями с сшивающими группами на C-конце, дополнительно связанным с доменами VL с образованием серии FV (или нескольких scFv), как описано, например, в US5864019, и одноцепочечные связывающие полипептиды с доменами VH и VL, связанными через пептидный линкер, объединяют в поливалентные структуры посредством нековалентного или химического связывания с образованием, например, гомобивалентных, гетеробивалентных, трехвалентных и четырехвалентных структур с использованием формата типа scFV или диателo, как описано, например, в US5869620. Дополнительные иллюстративные полиспецифические и биспецифические молекулы и способы их получения можно найти, например, в US5910573, US5932448, US5959083, US5989830, US6005079, US6239259, US6294353, US6333396, US6476198, US6511663, US6670453, US6743896, US6809185, US6833441, US7129330, US7183076, US7521056, US7527787, US7534866,

US7612181, US2002004587A1, US2002076406A1, US2002103345A1, US2003207346A1, US2003211078A1, US2004219643A1, US2004220388A1, US2004242847A1, US2005003403A1, US2005004352A1, US2005069552A1, US2005079170A1, US2005100543A1, US2005136049A1, US2005136051A1, US2005163782A1, US2005266425A1, US2006083747A1, US2006120960A1, US2006204493A1, US2006263367A1, US2007004909A1, US2007087381A1, US2007128150A1, US2007141049A1, US2007154901A1, US2007274985A1, US2008050370A1, US2008069820A1, US2008152645A1, US2008171855A1, US2008241884A1, US2008254512A1, US2008260738A1, US2009130106A1, US2009148905A1, US2009155275A1, US2009162359A1, US2009162360A1, US2009175851A1, US2009175867A1, US2009232811A1, US2009234105A1, US2009263392A1, US2009274649A1, EP346087A2, WO0006605A2, WO02072635A2, WO04081051A1, WO06020258A2, WO2007044887A2, WO2007095338A2, WO2007137760A2, WO2008119353A1, WO2009021754A2, WO2009068630A1, WO9103493A1, WO9323537A1, WO9409131A1, WO9412625A2, WO9509917A1, WO9637621A2, WO9964460A1. Содержание указанных выше заявок полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

В каждом антителе или фрагменте антитела (например, scFv) биспецифической молекулы антитела VH может находиться выше или ниже VL. В некоторых вариантах осуществления в расположенном выше антителе или фрагменте антитела (например, scFv) VH (VH_1) располагается выше VL (VL_1), и в расположенном ниже антителе или фрагменте антитела (например, scFv) VL (VL_2) располагается выше VH (VH_2), таким образом, что полная биспецифическая молекула антитела характеризуется порядком расположения VH_1-VL_1-VL_2-VH_2. В других вариантах осуществления в расположенном выше антителе или фрагменте антитела (например, scFv) VL (VL_1) располагается выше VH (VH_1), и в расположенном ниже антителе или фрагменте антитела (например, scFv) VH (VH_2) располагается выше VL (VL_2), таким образом, что полная биспецифическая молекула антител характеризуется порядком расположения VL_1-VH_1-VH_2-VL_2. Необязательно линкер размещают между двумя антителами или фрагментами антител (например, scFvs), например, между VL_1 и VL_2, если конструкцию располагают как VH_1-VL_1-VL_2-VH_2, или между VH_1 и VH_2, если конструкцию располагают как VL_1-VH_1-VH_2-VL_2. Линкер

может представлять собой линкер, как описано в настоящем описании, например, линкер (Gly_4-Ser)n, где n представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 4 (SEQ ID NO: 63). Как правило, линкер между двумя scFv должен быть достаточной длины, чтобы устранять возможность ошибочное спаривание между доменами двух scFv. Необязательно, линкер размещают между VL и VH первого scFv. Необязательно, линкер размещают между VL и VH второго scFv. В конструкциях, которые содержат многие линкеры, любые два или более линкеров могут являться одинаковыми или различными. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления биспецифический CAR содержит VL, VH и необязательно один или более линкеров в порядке расположения, как описано в настоящем описании.

В одном из аспектов молекула биспецифического антитела характеризуется первой последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, например, scFv, которая обладает специфичностью связывания с опухолевым антигеном, описываемым в настоящем описании, например, содержит scFv, как описано в настоящем описании, например, как описано в таблице 4, или содержит CDR легкой цепи и/или CDR тяжелой цепи из scFv, описываемого в настоящем описании, и второй последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания со вторым эпитопом на другом антигене. В некоторых аспектах вторая последовательность вариабельного домена иммуноглобулина обладает специфичностью связывания с антигеном, экспрессируемым на опухоли, например, опухолевым антигеном, описываемым в настоящем описании.

Иллюстративные последовательности CAR

В вариантах осуществления NKR-CAR или TCAR, описываемые в настоящем описании, могут содержать одну или более последовательностей, предоставленных в таблице 5.

Таблица 5. Последовательности различных компонентов CAR (aa аминокислотная последовательность, na последовательность нуклеиновой кислоты)

SEQ	Описание	Последовательность

ID NO		
11	EF-1 промотор (na)	CGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGT CCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGA AGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCC TTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGT GAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCC GTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCG TGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGA GCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGA GCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCC GCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGA TAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTT TTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTA TTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCG CACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGA CGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGC CGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACC AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGC TCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCA CACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTC CACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTT TGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGT TTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTT GATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTC ATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGG TGTCGTGA
1	Лидер (aa)	MALPVTALLLPLALLLHAARP
12	Лидер (na)	ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGC ATGCCGCTAGACCC
2	Шарнир CD 8 (aa)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
13	Шарнир CD8 (na)	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGT CGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGG CGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT
3	Шарнир Ig4 (aa)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKM
14	Шарнир Ig4 (na)	GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCC TGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCT GATGATCAGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCC

		CAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTA CCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC AAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCG AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTA CACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG ACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCT GGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAG AGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGG CCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAA GATG
4	Шарнир IgD (aa)	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKE KEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSD LKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGT SVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLC EVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVP APPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH
15	Шарнир IgD (na)	AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCAC AGCCCCAGGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCAC TACGCGCAATACTGGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAG AAAGAAGAACAGGAAGAGAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCC ATACCCAGCCGCTGGGCGTCTATCTCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTT GTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGTTTCGTCGTGGGCTCTGAC CTGAAGGATGCCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGGAAAGGTACCCACAG GGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCTCAGAG CCAGCACTCAAGACTCACCCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACC TCTGTCACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCCACAGCGTCTGA TGGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCCAGGCACCAGTTAAGCTTAGCCTGAA TCTGCTCGCCAGTAGTGATCCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGC GAAGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCCAACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGG ACCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCGCTCCAGCCCGGCCCCCACC CCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTCTTAAGGGTCCCA GCACCACCTAGCCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTCCCATG AAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTA CGTGACTGACCATT
6	Трансмембранный CD8 (aa)	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
17	Трансмембранный CD8 (na)	ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGT CACTGGTTATCACCCTTTACTGC
7	Внутриклеточный домен 4-1BB (aa)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

18	Внутриклеточный домен 4-1BB (na)	AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGA GACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCC AGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG
8	CD27 (aa)	QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP
19	CD27 (na)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTC CCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACC ACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC
9	CD3-дзета (aa) (Q/K мутант)	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR
20	CD3-дзета (na) (Q/K мутант)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCC AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGA TGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCG AGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATA AGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAG GGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAG GACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
10	CD3-дзета (aa) (эталонная последовательность NCBI NM_000734.3)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR
21	CD3-дзета (na) (эталонная последовательность NCBI NM_000734.3)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCC AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGA TGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCG AGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATA AGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAG GGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAG GACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
36	Внутриклеточный домен CD28 (аминокислотная последовательность)	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
37	Внутриклеточный домен CD28 (нуклеотидная последовательность)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTC CCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACC ACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC
38	Внутриклеточный домен ICOS (аминокислотная последовательность)	T K K K Y S S S V H D P N G E Y M F M R A V N T A K K S R L T D V T L
39	Внутриклеточный домен ICOS	ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACA TGTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGT

	(нуклеотидная последовательность)	GACCCTA
5	шарнир/линкер GS (aa)	GGGGSGGGGS
16	шарнир/линкер GS (na)	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC
356	шарнир/линкер GS (na)	GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGGGGTTCC
25	линкер	GGGGS
26	линкер	(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)n, где n=1-6, например, GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS
27	линкер	(Gly4 Ser)4
28	линкер	(Gly4 Ser)3
29	линкер	(Gly3Ser)
40	линкер	(Gly-Gly-Gly-Ser)n, где n представляет собой положительное целое число, равное или больше 1
41	линкер	(Gly-Gly-Gly-Ser)n, где n=1-10, например, GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS
42	линкер	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
30	полиА	$(A)_{5000}$. Эта последовательность может содержать 50-5000 аденинов.
31	полиТ	$(T)_{100}$
32	полиТ	$(T)_{5000}$. Эта последовательность может содержать 50-5000 тиминов.
33	полиА	$(A)_{5000}$. Эта последовательность может содержать 100-5000 аденинов.
34	полиА	$(A)_{400}$. Эта последовательность может содержать 100-400 аденинов.
35	полиА	$(A)_{2000}$. Эта последовательность может содержать 50-2000 аденинов.
22	PD1 CAR (aa)	pgwfldspdrpwnpptfspallvvtegdnatftcsfsntsesfvlnwyr mspsnqtdklaafpedrsqpgqdcrfrvtqlpngrdfhmsvvrarrnds gtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfq tlvtttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdi yiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeed gcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeyd vldkrrgrdpemggkprrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrr gkghdglyqglstatkdtydalhmqalppr
23	PD-1 CAR (na) (PD1 ECD подчеркнут)	atggccctccctgtcactgccctgcttctcccccctcgcactcctgctcc acgccgctagaccacccggatggtttctggactctccggatcgcccgtg gaatcccccaaccttctcaccggcactcttggttgtgactgagggcgat

		aatgcgaccttcacgtgctcgttctccaacacctccgaatcattcgtgc tgaactggtaccgcatgagcccgtcaaaccagaccgacaagctcgccgc gtttccggaagatcggtcgcaaccgggacaggattgtcggttccgcgtg actcaactgccgaatggcagagacttccacatgagcgtggtccgcgcta ggcgaaacgactccgggacctacctgtgcggagccatctcgctggcgcc taaggcccaaatcaaagagagcttgagggccgaactgagagtgaccgag cgcagagctgaggtgccaactgcacatccatccccatcgcctcggcctg cggggcagtttcagaccctggtcacgaccactccggcgccgcgcccacc gactccggccccaactatcgcgagccagcccctgtcgctgaggccggaa gcatgccgccctgccgccggaggtgctgtgcatacccggggattggact tcgcatgcgacatctacatttgggctcctctcgccggaacttgtggcgt gctccttctgtccctggtcatcaccctgtactgcaagcggggtcggaaa aagcttctgtacattttcaagcagcccttcatgaggcccgtgcaaacca cccaggaggaggacggttgctcctgccggttccccgaagaggaagaagg aggttgcgagctgcgcgtgaagttctcccggagcgccgacgccccgcc tataagcagggccagaaccagctgtacaacgaactgaacctgggacggc gggaagagtacgatgtgctggacaagcggcgcggccgggaccccgaaat gggcgggaagcctagaagaaagaaccctcaggaaggcctgtataacgag ctgcagaaggacaagatggccgaggcctactccgaaattgggatgaagg gagagcggcggaggggaaaggggcacgacggcctgtaccaaggactgtc caccgccaccaaggacacatacgatgccctgcacatgcaggcccttccc cctcgc
24	PD-1 CAR (aa) с сигнальной послед. (PD1 ECD подчеркнут)	Malpvtalllplalllhaarppgwfldspdrpwnpptfspallvvtegd natftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcrfrv tqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvte rraevptahpspsprpaggfqtlvtttpaprpptpaptiasqplslrpe acrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvlllslvitlyckrgrk kllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfpeeeeggcelrvkfsrsadapa ykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrknpqeglyne lqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalp pr
338	Цитоплазматический домен PD1 (аминокислоты 192-288)	CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVP CVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL
339	Цитоплазматический домен CTLA-4 (аминокислоты 183-223)	AVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTEPECEKQFQPYFIPIN
340	Шарнир CD8 человека	TTTPAPRPPT PAPTIASQPL SLRPEACRPA AGGAVHTRGL DFA

Иллюстративные последовательности NKR-CAR и компоненты NKR-CAR дополнительно предоставлены в настоящем описании.

Ниже предоставлена последовательность нуклеиновой кислоты KIR-CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с мезотелином, и цитоплазматический домен, содержащий домен KIR2DS2. Любой из антигенсвязывающих доменов, описываемых в настоящем описании, можно заменять антигенсвязывающим доменом к мезотелину, предоставленным ниже.

Последовательность гена KIR2DS2 SS1 (SEQ ID NO: 327)

gtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttt
cgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattat
cccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggt
tgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagt
gctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccga
aggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaacc
ggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaaca
acgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagact
ggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttat
tgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagat
ggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaa
atagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttta
ctcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatc
ctttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagacc
ccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttttctgcgcgtaatctgctgcttgca
aacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactcttttt
ccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagt
taggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttacc
agtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccg
gataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacga
cctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggag
aaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttcca
gggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgat
ttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacg
gttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtg
gataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgca
gcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttg
gccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaac
gcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccccaggctttacactttatgcttccggctc

gtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgatta
cgccaagcgcgcaattaaccctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaatgtagt
cttatgcaatactcttgtagtcttgcaacatggtaacgatgagttagcaacatgccttacaagg
agagaaaaagcaccgtgcatgccgattggtggaagtaaggtggtacgatcgtgccttattagga
aggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgcattgcagagatattg
tatttaagtgcctagctcgatacaataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctggg
agctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttca
agtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtca
gtgtggaaaatctctagcagtggcgcccgaacagggacctgaaagcgaaagggaaaccagagct
ctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcgactggtg
agtacgccaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagta
ttaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccaggggaaagaaaaa
atataaattaaaacatatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggc
ctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacag
gatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggat
agagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagacc
accgcacagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggaga
agtgaattatataaatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcacccaccaaggcaa
agagaagagtggtgcagagagaaaaaagagcagtgggaataggagctttgttccttgggttctt
gggagcagcaggaagcactatgggcgcagcctcaatgacgctgacggtacaggccagacaatta
ttgtctggtatagtgcagcagcagaacaatttgctgagggctattgaggcgcaacagcatctgt
tgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacct
aaaggatcaacagctcctggggatttggggttgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtg
ccttggaatgctagttggagtaataaatctctggaacagattggaatcacacgacctggatgga
gtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaac
cagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggt
ttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtagg
tttaagaatagtttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccatta
tcgtttcagacccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaag
gtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgattaga
ctgtagcccaggaatatggcagctagattgtacacatttagaaggaaaagttatcttggtagca
gttcatgtagccagtggatatatagaagcagaagtaattccagcagagacagggcaagaaacag
catacttcctcttaaaattagcaggaagatggccagtaaaaacagtacatacagacaatggcag
caatttcaccagtactacagttaaggccgcctgttggtgggcggggatcaagcaggaatttggc
attccctacaatccccaaagtcaaggagtaatagaatctatgaataaagaattaaagaaaatta
taggacaggtaagagatcaggctgaacatcttaagacagcagtacaaatggcagtattcatcca

caattttaaaagaaaaggggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataata
gcaacagacatacaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcgggttt
attacagggacagcagagatccagtttggctgcatacgcgtcgtgaggctccggtgcccgtcag
tgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggggtcggcaattgaaccg
gtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttt
tcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttttcgcaac
gggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgg
gttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccga
gcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgt
gcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcg
cctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgct
ttttttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttt
ggggccgcgggcggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgc
gagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctgg
cctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcg
tgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgct
cgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaaggaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgc
ttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgtgcttttgg
agtacgtcgtctttaggttgggggggaggggttttatgcgatggagtttccccacactgagtggg
tggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttga
gtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttcttccatttcag
gtgtcgtgagctagaATGGGGGGACTTGAACCCTGCAGCAGGCTCCTGCTCCTGCCTCTCCTGC
TGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCCTGTCCAGGCCCAGGCCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGT
GAGCCCGGGCGTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTGCTCATTGCCCTG
GCCGTGTACTTCCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGA
AACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTA
CAGCGACCTCAACACACAGAGGCCGTATTACAAAgTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGT
CTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGatggccttaccagtgaccgcct
tgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccgggatcccaggtacaactgcagca
gtctgggcctgagctggagaagcctggcgcttcagtgaagatatcctgcaaggcttctggttac
tcattcactggctacaccatgaactgggtgaagcagagccatggaaagagccttgagtggattg
gacttattactccttacaatggtgcttctagctacaaccagaagttcaggggcaaggccacatt
aactgtagacaagtcatccagcacagcctacatggacctcctcagtctgacatctgaagactct
gcagtctatttctgtgcaaggggggttacgacgggaggggttttgactactggggccaaggga
ccacggtcaccgtctcctcaggtggaggcggttcaggcggcggtggctctagcggtggtggatc
ggacatcgagctcactcagtctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggtcaccatg

acctgcagtgccagctcaagtgtaagttacatgcactggtaccagcagaagtcaggcacctccc
ccaaaagatggatttatgacacatccaaactggcttctggagtcccaggtcgcttcagtggcag
tgggtctggaaactcttactctctcacaatcagcagcgtggaggctgaagatgatgcaacttat
tactgccagcagtggagtaagcaccctctcacgtacggtgctgggacaaagttggaaatcaaag
ctagcACGCGTggtggcggaggttctggaggtgggggttcccaggggcctggccacatgaggg
agtccacagaaaaccttccctcctggcccacccaggtcccctggtgaaatcagaagagacagtc
atcctgcaatgttggtcagatgtcaggtttgagcacttccttctgcacagagaggggaagtata
aggacactttgcacctcattggagagcaccatgatggggtctccaaggccaacttctccatcgg
tcccatgatgcaagaccttgcagggacctacagatgctacggttctgttactcactccccctat
cagttgtcagctcccagtgaccctctggacatcgtcatcacaggtctatatgagaaaccttctc
tctcagcccagccgggccccacggttttggcaggagagagcgtgaccttgtcctgcagctcccg
gagctcctatgacatgtaccatctatccagggaggggggaggcccatgaacgtaggttctctgca
gggcccaaggtcaacggaacattccaggccgactttcctctgggccctgccacccacggaggaa
cctacagatgcttcggctctttccgtgactctccctatgagtggtcaaactcgagtgacccact
gcttgtttctgtcacaggaaacccttcaaatagttggccttcacccactgaaccaagctccaaa
accggtaaccccagacacctgcatgttctgattgggacctcagtggtcaaaatccctttcacca
tcctcctcttctttctccttcatcgctggtgctccaacaaaaaaaatgctgctgtaatggacca
agagcctgcagggaacagaacagtgaacagcgaggattctgatgaacaagaccatcaggaggtg
tcatacgcataaGtcgacaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattc
ttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctat
tgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgag
gagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaaccccca
ctggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctat
tgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggc
actgacaattccgtggtgttgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgcctgtgttg
ccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggacct
tccttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacg
agtcggatctccctttgggccgcctccccgcctggaattcgagctcggtacctttaagaccaat
gacttacaaggcagctgtagatcttagccacttttaaaagaaaaggggggactggaagggcta
attcactcccaacgaagacaagatctgctttttgcttgtactgggtctctctggttagaccaga
tctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgcc
ttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcaga
cccttttagtcagtgtggaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagtatt
tataacttgcaaagaaatgaatatcagagagtgagaggaacttgtttattgcagcttataatgg
ttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagt
tgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatcccgcccctaac

tccgcccagttccgcccattctccgccccatggctgactaatttttttatttatgcagaggcc
gaggccgcctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctacgct
tttgcgtcgagacgtacccaattcgccctatagtgagtcgtattacgcgcgctcactggccgtc
gttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccttgcagcacatc
ccccttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcg
cagcctgaatggcgaatggcgcgacgcgccctgtagcggcgcattaagcgcggcgggtgtggtg
gttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccctagcgcccgctcctttcgctttcttcc
cttcctttctcgccacgttcgccggctttccccgtcaagctctaaatcgggggctccctttagg
gttccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggtgatggttcacgt
agtgggccatcgccctgatagacggtttttcgccctttgacgttggagtccacgttctttaata
gtggactcttgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcggtctattcttttgatttata
agggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcg
aattttaacaaaatattaacgtttacaatttcccaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcgg
aacccctatttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccc
tgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgccc
ttattccctttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagt
aaaagatgctgaagatcagttgg

Ниже приведена последовательность нуклеиновой кислоты KIR-CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с мезотелином, и цитоплазматический домен, содержащий домен KIRS2. Любой из антигенсвязывающих доменов, описываемых в настоящем описании, можно заменять антигенсвязывающим доменом к мезотелину, предоставленным ниже.

Последовательность гена KIRS2 SS1 (SEQ ID NO: 328)

gtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttt
cgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattat
cccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggt
tgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagt
gctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccga
aggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaacc
ggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaaca
acgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagact
ggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttat
tgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagat
ggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaa
atagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttta

ctcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatc
ctttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagacc
ccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttttctgcgcgtaatctgctgcttgca
aacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactcttttt
ccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagt
taggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttacc
agtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccg
gataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacga
cctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggag
aaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttcca
gggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgat
ttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacg
gttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtg
gataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgca
gcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttg
gccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaac
gcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccccaggctttacactttatgcttccggctc
gtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgatta
cgccaagcgcgcaattaaccctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaatgtagt
cttatgcaatactcttgtagtcttgcaacatggtaacgatgagttagcaacatgccttacaagg
agagaaaaagcaccgtgcatgccgattggtggaagtaaggtggtacgatcgtgccttattagga
aggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgcattgcagagatattg
tatttaagtgcctagctcgatacaataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctggg
agctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttca
agtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtca
gtgtggaaaatctctagcagtggcgcccgaacagggacctgaaagcgaaagggaaaccagagct
ctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcgactggtg
agtacgccaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagta
ttaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccaggggaaagaaaaa
atataaattaaaacatatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggc
ctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacag
gatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggat
agagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagacc
accgcacagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggaga
agtgaattatataaatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcacccaccaaggcaa
agagaagagtggtgcagagagaaaaaagagcagtgggaataggagctttgttccttgggttctt

gggagcagcaggaagcactatgggcgcagcctcaatgacgctgacggtacaggccagacaatta
ttgtctggtatagtgcagcagcagaacaatttgctgagggctattgaggcgcaacagcatctgt
tgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacct
aaaggatcaacagctcctggggatttggggttgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtg
ccttggaatgctagttggagtaataaatctctggaacagattggaatcacacgacctggatgga
gtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaac
cagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggt
ttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtagg
tttaagaatagtttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccatta
tcgtttcagacccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaag
gtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgattaga
ctgtagcccaggaatatggcagctagattgtacacatttagaaggaaaagttatcttggtagca
gttcatgtagccagtggatatatagaagcagaagtaattccagcagagacagggcaagaaacag
catacttcctcttaaaattagcaggaagatggccagtaaaaacagtacatacagacaatggcag
caatttcaccagtactacagttaaggccgcctgttggtgggcggggatcaagcaggaatttggc
attccctacaatccccaaagtcaaggagtaatagaatctatgaataaagaattaaagaaaatta
taggacaggtaagagatcaggctgaacatcttaagacagcagtacaaatggcagtattcatcca
caattttaaaagaaaaggggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataata
gcaacagacatacaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcgggttt
attacagggacagcagagatccagtttggctgcatacgcgtcgtgaggctccggtgcccgtcag
tgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggagggtcggcaattgaaccg
gtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttt
tcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaac
gggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgg
gttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccga
gcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgt
gcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcg
cctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgct
ttttttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttt
ggggccgcgggcggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgc
gagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctgg
cctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcg
tgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgct
cgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaaggaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgc
ttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgtgcttttgg
agtacgtcgtctttaggttgggggagggttttatgcgatggagtttccccacactgagtggg

tggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttga
gtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttttcttccatttcag
gtgtcgtgagctagaATGGGGGGACTTGAACCCTGCAGCAGGCTCCTGCTCCTGCCTCTCCTGC
TGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCCTGTCCAGGCCCAGGCCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGT
GAGCCCGGGCGTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTGCTCATTGCCCTG
GCCGTGTACTTCCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGA
AACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTA
CAGCGACCTCAACACACAGAGGCCGTATTACAAAgTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGT
CTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGatggccttaccagtgaccgcct
tgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccgggatcccaggtacaactgcagca
gtctgggcctgagctggagaagcctggcgcttcagtgaagatatcctgcaaggcttctggttac
tcattcactggctacaccatgaactgggtgaagcagagccatggaaagagccttgagtggattg
gacttattactccttacaatggtgcttctagctacaaccagaagttcaggggcaaggccacatt
aactgtagacaagtcatccagcacagcctacatggacctcctcagtctgacatctgaagactct
gcagtctatttctgtgcaaggggggttacgacgggaggggttttgactactggggccaaggga
ccacggtcaccgtctcctcaggtggaggcggttcaggcggcggtggctctagcggtggtggatc
ggacatcgagctcactcagtctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggtcaccatg
acctgcagtgccagctcaagtgtaagttacatgcactggtaccagcagaagtcaggcacctccc
ccaaaagatggatttatgacacatccaaactggcttctggagtcccaggtcgcttcagtggcag
tgggtctggaaactcttactctctcacaatcagcagcgtggaggctgaagatgatgcaacttat
tactgccagcagtggagtaagcaccctctcacgtacggtgctgggacaaagttggaaatcaaag
ctagcggtggcggaggttctggaggtgggggttcctcacccactgaaccaagctccaaaaccgg
taaccccagacacctgcatgttctgattgggacctcagtggtcaaaatccctttcaccatcctc
ctcttctttctccttcatcgctggtgctccaacaaaaaaaatgctgctgtaatggaccaagagc
ctgcagggaacagaacagtgaacagcgaggattctgatgaacaagaccatcaggaggtgtcata
cgcataaGtcgacaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaac
tatgttgctccttttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgctt
cccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagtt
gtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggt
tggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttcccccctccctattgcca
cggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactga
caattccgtggtgttgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgcctgtgttgccacc
tggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttcctt
cccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcg
gatctccctttgggccgcctccccgcctggaattcgagctcggtacctttaagaccaatgactt
acaaggcagctgtagatcttagccacttttaaaagaaaaggggggactggaagggctaattca

ctcccaacgaagacaagatctgctttttgcttgtactgggtctctctggttagaccagatctga
gcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgag
tgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccctt
ttagtcagtgtggaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagtatttataa
cttgcaaagaaatgaatatcagagagtgagaggaacttgtttattgcagcttataatggttaca
aataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgtgg
tttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatcccgcccctaactccgc
ccagttccgcccattctccgccccatggctgactaatttttttttatttatgcagaggccgaggc
cgcctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttttggaggcctacgcttttgc
gtcgagacgtacccaattcgccctatagtgagtcgtattacgcgcgctcactggccgtcgtttt
acaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccttgcagcacatccccct
ttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcc
tgaatggcgaatggcgcgacgcgccctgtagcggcgcattaagcgcggcgggtgtggtggttac
gcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccctagcgcccgctcctttcgctttcttcccttcc
tttctcgccacgttcgccggctttccccgtcaagctctaaatcgggggctcccttagggttcc
gatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggtgatggttcacgtagtgg
gccatcgccctgatagacggtttttcgccctttgacgttggagtccacgttctttaatagtgga
ctcttgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcggtctattcttttgatttataaggga
ttttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattt
taacaaaatattaacgtttacaatttcccaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccc
ctatttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgata
aatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttatt
cccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaag
atgctgaagatcagttgg

Ниже приведена последовательность нуклеиновой кислоты KIR-CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с мезотелином, и цитоплазматический домен, содержащий домен KIR2DL3. Любой из антигенсвязывающих доменов, описываемых в настоящем описании, можно заменять антигенсвязывающим доменом к мезотелину, предоставленным ниже.

Последовательность гена KIR2DL3 SS1 (SEQ ID NO: 329)

gtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttt
cgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattat
cccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggt
tgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagt
gctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccga

aggagctaaccgctttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaacc
ggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaaca
acgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagact
ggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttat
tgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagat
ggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaa
atagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttta
ctcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatc
ctttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagacc
ccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttttctgcgcgtaatctgctgcttgca
aacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactcttttt
ccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagt
taggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttacc
agtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccg
gataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacga
cctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggag
aaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttcca
gggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgat
ttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttttacg
gttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtg
gataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgca
gcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttg
gccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaac
gcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccccaggctttacactttatgcttccggctc
gtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgatta
cgccaagcgcgcaattaaccctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaatgtagt
cttatgcaatactcttgtagtcttgcaacatggtaacgatgagttagcaacatgccttacaagg
agagaaaaagcaccgtgcatgccgattggtggaagtaaggtggtacgatcgtgccttattagga
aggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgcattgcagagatattg
tatttaagtgcctagctcgatacaataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctggg
agctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttca
agtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtca
gtgtggaaaatctctagcagtggcgcccgaacagggacctgaaagcgaaagggaaaccagagct
ctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcgactggtg
agtacgccaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagta
ttaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccaggggaaagaaaaa

atataaattaaaacatatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggc
ctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacag
gatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggat
agagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagacc
accgcacagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggaga
agtgaattatataaatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcacccaccaaggcaa
agagaagagtggtgcagagagaaaaaagagcagtgggaataggagctttgttccttgggttctt
gggagcagcaggaagcactatgggcgcagcctcaatgacgctgacggtacaggccagacaatta
ttgtctggtatagtgcagcagcagaacaatttgctgagggctattgaggcgcaacagcatctgt
tgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacct
aaaggatcaacagctcctggggatttggggttgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtg
ccttggaatgctagttggagtaataaatctctggaacagattggaatcacacgacctggatgga
gtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaac
cagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggt
ttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtagg
tttaagaatagtttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccatta
tcgtttcagacccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaag
gtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgattaga
ctgtagcccaggaatatggcagctagattgtacacatttagaaggaaaagttatcttggtagca
gttcatgtagccagtggatatatagaagcagaagtaattccagcagagacagggcaagaaacag
catacttcctcttaaaattagcaggaagatggccagtaaaaacagtacatacagacaatggcag
caatttcaccagtactacagttaaggccgcctgttggtgggcggggatcaagcaggaatttggc
attccctacaatccccaaagtcaaggagtaatagaatctatgaataaagaattaaagaaaatta
taggacaggtaagagatcaggctgaacatcttaagacagcagtacaaatggcagtattcatcca
caattttaaaagaaaaggggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataata
gcaacagacatacaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcgggttt
attacagggacagcagagatccagtttggctgcatacgcgtcgtgaggctccggtgcccgtcag
tgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggggtcggcaattgaaccg
gtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttt
tcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaac
gggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgg
gttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccga
gcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagccccttcgcctcgt
gcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcg
cctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgct
ttttttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttt

ggggccgcgggcggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgc
gagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctgg
cctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcg
tgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgct
cgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaaggaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgc
ttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgtgcttttgg
agtacgtcgtctttaggttgggggggagggggttttatgcgatggagtttccccacactgagtggg
tggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttga
gtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagtttttttcttccatttcag
gtgtcgtgagctagaATGGGGGGACTTGAACCCTGCAGCAGGCTCCTGCTCCTGCCTCTCCTGC
TGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCCTGTCCAGGCCCAGGCCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGT
GAGCCCGGGCGTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTGCTCATTGCCCTG
GCCGTGTACTTCCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGA
AACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTA
CAGCGACCTCAACACACAGAGGCCGTATTACAAAgTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGT
CTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGatggccttaccagtgaccgcct
tgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccgggatcccaggtacaactgcagca
gtctgggcctgagctggagaagcctggcgcttcagtgaagatatcctgcaaggcttctggttac
tcattcactggctacaccatgaactgggtgaagcagagccatggaaagagccttgagtggattg
gacttattactccttacaatggtgcttctagctacaaccagaagttcaggggcaaggccacatt
aactgtagacaagtcatccagcacagcctacatggacctcctcagtctgacatctgaagactct
gcagtctatttctgtgcaagggggggttacgacgggaggggttttgactactggggccaaggga
ccacggtcaccgtctcctcaggtggaggcggttcaggcggcggtggctctagcggtggtggatc
ggacatcgagctcactcagtctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggtcaccatg
acctgcagtgccagctcaagtgtaagttacatgcactggtaccagcagaagtcaggcacctccc
ccaaaagatggatttatgacacatccaaactggcttctggagtcccaggtcgcttcagtggcag
tgggtctggaaactcttactctctcacaatcagcagcgtggaggctgaagatgatgcaacttat
tactgccagcagtggagtaagcaccctctcacgtacggtgctgggacaaagttggaaatcaaag
CTAGCggtggcggaggttctggaggtgggggttccCAGGGGGCCTGGCCACATGAGGGAGTCCA
CAGAAAACCTTCCCTCCTGGCCCACCCAGGTCCCCTGGTGAAATCAGAAGAGACAGTCATCCTG
CAATGTTGGTCAGATGTCAGGTTTCAGCACTTCCTTCTGCACAGAGAAGGGAAGTTTAAGGACA
CTTTGCACCTCATTGGAGAGCACCATGATGGGGTCTCCAAGGCCAACTTCTCCATCGGTCCCAT
GATGCAAGACCTTGCAGGGACCTACAGATGCTACGGTTCTGTTACTCACTCCCCCTATCAGTTG
TCAGCTCCCAGTGACCCTCTGGACATCGTCATCACAGGTCTATATGAGAAACCTTCTCTCTCAG
CCCAGCCGGGCCCCACGGTTCTGGCAGGAGAGAGCGTGACCTTGTCCTGCAGCTCCCGGAGCTC
CTATGACATGTACCATCTATCCAGGGAGGGGGAGGCCCATGAACGTAGGTTCTCTGCAGGGCCC

AAGGTCAACGGAACATTCCAGGCCGACTTTCCTCTGGGCCCTGCCACCCACGGAGGAACCTACA
GATGCTTCGGCTCTTTCCGTGACTCTCCATACGAGTGGTCAAACTCGAGTGACCCACTGCTTGT
TTCTGTCACAGGAAACCCTTCAAATAGTTGGCTTTCACCCACTGAACCAAGCTCCGAAACCGGT
AACCCCAGACACCTGCATGTTCTGATTGGGACCTCAGTGGTCATCATCCTCTTCATCCTCCTCC
TCTTCTTTCTCCTTCATCGCTGGTGCTGCAACAAAAAAAATGCTGTTGTAATGGACCAAGAGCC
TGCAGGGAACAGAACAGTGAACAGGGAGGACTCTGATGAACAAGACCCTCAGGAGGTGACATAT
GCACAGTTGAATCACTGCGTTTTCACACAGAGAAAAATCACTCACCCTTCTCAGAGGCCCAAGA
CACCCCCAACAGATATCATCGTGTACACGGAACTTCCAAATGCTGAGCCCTGAGtcgacaatca
acctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctccttttacg
ctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattt
tctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggca
acgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacc
tgtcagctcctttccgggactttcgctttcccccctccctattgccacggcggaactcatcgccg
cctgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgtc
ggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacg
tccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccgg
ctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggccgc
ctccccgcctggaattcgagctcggtacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatc
ttagccacttttaaaagaaaaggggggactggaagggctaattcactcccaacgaagacaaga
tctgcttttgcttgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggc
taactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtgtgtg
cccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaat
ctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagtatttataacttgcaaagaaatgaata
tcagagagtgagaggaacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatca
caaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaa
tgtatcttatcatgtctggctctagctatcccgcccctaactccgcccagttccgcccattctc
cgccccatggctgactaatttttttttatttatgcagaggccgaggccgcctcggcctctgagct
attccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctacgcttttgcgtcgagacgtacccaatt
cgccctatagtgagtcgtattacgcgcgctcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactggga
aaaccctggcgttacccaacttaatcgccttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaat
agcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcg
acgcgccctgtagcggcgcattaagcgcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctac
acttgccagcgccctagcgcccgctcctttcgctttcttcccttcctttctcgccacgttcgcc
ggctttccccgtcaagctctaaatcgggggctcccttagggttccgatttagtgctttacggc
acctcgaccccaaaaaacttgattagggtgatggttcacgtagtgggccatcgccctgatagac
ggtttttcgccctttgacgttggagtccacgttctttaatagtggactcttgttccaaactgga

acaacactcaaccctatctcggtctattcttttgatttataagggattttgccgatttcggcct
attggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaatattaacgtt
tacaatttcccaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttct
aaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattg
aaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgcccttattccctttttttgcggcattt
tgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgg

Последовательность нуклеиновой кислоты KIR-CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, и цитоплазматический домен, содержащий домен KIR2DS2, предоставлена ниже.

Последовательность конструкции KIR2DS2 CD19 (SEQ ID NO: 330)

gtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttt
cgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattat
cccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttggt
tgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagt
gctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccga
aggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaacc
ggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaaca
acgttgcgcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagact
ggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttat
tgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagat
ggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaa
atagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttta
ctcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatc
ctttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagacc
ccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttttctgcgcgtaatctgctgcttgca
aacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactcttttt
ccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagt
taggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttacc
agtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactcaagacgatagttaccg
gataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacga
cctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggag
aaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttcca
gggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgat
ttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacg

gttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtg
gataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgca
gcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttg
gccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaac
gcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccccaggctttacactttatgcttccggctc
gtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgatta
cgccaagcgcgcaattaaccctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaatgtagt
cttatgcaatactcttgtagtcttgcaacatggtaacgatgagttagcaacatgccttacaagg
agagaaaaagcaccgtgcatgccgattggtggaagtaaggtggtacgatcgtgccttattagga
aggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgcattgcagagatattg
tatttaagtgcctagctcgatacaataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctggg
agctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttca
agtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtca
gtgtggaaaatctctagcagtggcgcccgaacagggacctgaaagcgaaagggaaaccagagct
ctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcgactggtg
agtacgccaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagta
ttaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccaggggaaagaaaaa
atataaattaaaacatatagtatgggcaagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggc
ctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacag
gatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggat
agagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagacc
accgcacagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggaga
agtgaattatataaatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcacccaccaaggcaa
agagaagagtggtgcagagagaaaaaagagcagtgggaataggagctttgttccttgggttctt
gggagcagcaggaagcactatgggcgcagcctcaatgacgctgacggtacaggccagacaatta
ttgtctggtatagtgcagcagcagaacaatttgctgagggctattgaggcgcaacagcatctgt
tgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacct
aaaggatcaacagctcctggggatttggggttgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtg
ccttggaatgctagttggagtaataaatctctggaacagattggaatcacacgacctggatgga
gtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaac
cagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggt
ttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtagg
tttaagaatagtttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccatta
tcgtttcagacccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaag
gtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcgattaga
ctgtagcccaggaatatggcagctagattgtacacatttagaaggaaaagttatcttggtagca

gttcatgtagccagtggatatatagaagcagaagtaattccagcagagacagggcaagaaacag
catacttcctcttaaaattagcaggaagatggccagtaaaaacagtacatacagacaatggcag
caatttcaccagtactacagttaaggccgcctgttggtgggcggggatcaagcaggaatttggc
attccctacaatccccaaagtcaaggagtaatagaatctatgaataaagaattaaagaaaatta
taggacaggtaagagatcaggctgaacatcttaagacagcagtacaaatggcagtattcatcca
caattttaaaagaaaaggggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataata
gcaacagacatacaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttcgggttt
attacagggacagcagagatccagtttggctgcatacgcgtcgtgaggctccggtgcccgtcag
tgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggggtcggcaattgaaccg
gtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttt
tcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaac
gggtttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgg
gttatggcccttgcgtgccttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccga
gcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagcccttcgcctcgt
gcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgccgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcg
cctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgctgcgacgct
ttttttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttt
ggggccgcgggcggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgc
gagcgcggccaccgagaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctgg
cctcgcgccgccgtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcg
tgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcagggagctcaaaatggaggacgcggcgct
cgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaaggaaaagggcctttccgtcctcagccgtcgc
ttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgtgcttttgg
agtacgtcgtctttaggttgggggggagggggttttatgcgatggagtttccccacactgagtggg
tggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttga
gtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagtttttttcttccatttcag
gtgtcgtgagctagaATGGGGGGACTTGAACCCTGCAGCAGGCTCCTGCTCCTGCCTCTCCTGC
TGGCTGTAAGTGGTCTCCGTCCTGTCCAGGCCCAGGCCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGT
GAGCCCGGGCGTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTGCTCATTGCCCTG
GCCGTGTACTTCCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGA
AACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTA
CAGCGACCTCAACACACAGAGGCCGTATTACAAAgTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGT
CTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGatggccttaccagtgaccgcct
tgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccgggatccGACATCCAGATGACACA
GACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAG
GACATTAGTAAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCT

ACCATACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGA
TTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGT
AATACGCTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACAGGTGGCGGTGGCTCGG
GCGGTGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGT
GGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGT
GTAAGCTGGATTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTG
AAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAG
CCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAA
CATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCT
CCTCAgctagcACGCGTggtggcggaggttctggaggtgggggttcccaggggcctggccaca
tgagggagtccacagaaaaccttccctcctggcccacccaggtcccctggtgaaatcagaagag
acagtcatcctgcaatgttggtcagatgtcaggtttgagcacttccttctgcacagagagggga
agtataaggacactttgcacctcattggagagcaccatgatggggtctccaaggccaacttctc
catcggtcccatgatgcaagaccttgcagggacctacagatgctacggttctgttactcactcc
ccctatcagttgtcagctcccagtgaccctctggacatcgtcatcacaggtctatatgagaaac
cttctctctcagcccagccgggccccacggttttggcaggagagagcgtgaccttgtcctgcag
ctcccggagctcctatgacatgtaccatctatccagggaggggggaggcccatgaacgtaggttc
tctgcagggcccaaggtcaacggaacattccaggccgactttcctctgggccctgccacccacg
gaggaacctacagatgcttcggctctttccgtgactctccctatgagtggtcaaactcgagtga
cccactgcttgtttctgtcacaggaaacccttcaaatagttggccttcacccactgaaccaagc
tccaaaaccggtaaccccagacacctgcatgttctgattgggacctcagtggtcaaaatccctt
tcaccatcctcctcttctttctccttcatcgctggtgctccaacaaaaaaaatgctgctgtaat
ggaccaagagcctgcagggaacagaacagtgaacagcgaggattctgatgaacaagaccatcag
gaggtgtcatacgcataaGtcgacaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactg
gtattcttaactatgttgctcctttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatca
tgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctt
tatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaa
cccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccct
ccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggctcggctg
ttgggcactgacaattccgtggtgttgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgcct
gtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagc
ggaccttccttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccct
cagacgagtcggatctccctttgggccgcctccccgcctggaattcgagctcggtacctttaag
accaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccacttttaaaagaaaaggggggactggaa
gggctaattcactcccaacgaagacaagatctgctttttgcttgtactgggtctctctggttag
accagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaag

cttgccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatcc
ctcagacccttttagtcagtgtggaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattc
agtatttataacttgcaaagaaatgaatatcagagagtgagaggaacttgtttattgcagctta
taatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcat
tctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatcccgcc
cctaactccgcccagttccgcccattctccgccccatggctgactaatttttttttatttatgca
gaggccgaggccgcctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttttggaggcc
tacgcttttgcgtcgagacgtacccaattcgccctatagtgagtcgtattacgcgcgctcactg
gccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccttgcag
cacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaaca
gttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcgacgcgccctgtagcggcgcattaagcgcggcgggt
gtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccctagcgcccgctcctttcgctt
tcttcccttcctttctcgccacgttcgccggctttccccgtcaagctctaaatcgggggctccc
tttagggttccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattagggtgatggt
tcacgtagtgggccatcgccctgatagacggtttttcgccctttgacgttggagtccacgttct
ttaatagtggactcttgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcggtctattcttttga
tttataagggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttt
aacgcgaattttaacaaaatattaacgtttacaatttcccaggtggcacttttcggggaaatgt
gcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaa
taaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtg
tcgcccttattccctttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggt
gaaagtaaaagatgctgaagatcagttgg

Ниже приведена последовательность нуклеиновой кислоты ингибирующего CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, и цитоплазматический домен, содержащий домен PD1.

Последовательность химерного CAR CD19-PD1 (SEQ ID NO: 331)

TGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATATGGTGCACT
CTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTG
ACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGG
GAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTG
ATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTT
TTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCC
GCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATT
CAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACC
CAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGA

ACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATG
AGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAAC
TCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCA
TCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACT
GCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACA
TGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGA
CGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAA
CTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGAC
CACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCG
TGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATC
TACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCT
CACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAA
ACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATC
CCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTT
GAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGT
GGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCG
CAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAG
CACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTC
GTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACG
GGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGC
GTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG
CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGT
CCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGA
GCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGC
TCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGA
GCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG
AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGA
CAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCAT
TAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGAT
AACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAATACGACTCACTATA
GGGAGACAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCG
CTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGT
CTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTT
AAATTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACCATACATCAAGATTA
CACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTA
GCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACAC

GTTCGGAGGGGGGACTAAGTTGGAAATAACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCGGGT
GGCGGCGGATCTGAGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCC
TGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTCGCCA
GCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAAT
TCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAA
TGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGG
TAGCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAgctagcACGCGT
ggtggcggaggttctggaggtgggggttccaccctggtggttggtgtcgtgggcggcctgctgg
gcagcctggtgctgctagtctgggtcctggccgtcatctgctcccgggccgcacgagggacaat
aggagccaggcgcaccggccagcccctgaaggaggacccctcagccgtgcctgtgttctctgtg
gactatggggagctggatttccagtggcgagagaagaccccggagccccccgtgccctgtgtcc
ctgagcagacggagtatgccaccattgtctttcctagcggaatgggcacctcatcccccgcccg
caggggctcagctgacggccctcggagtgcccagccactgaggcctgaggatggacactgctct
tggcccctctgaGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTAGTGGCGCC

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты и кодируемым аминокислотным последовательностям, содержащим NKR-CAR, описываемый в настоящем описании, например, KIR-CAR, и дополнительно содержащим адапторную молекулу, которая взаимодействует с NKR-CAR для облегчения передачи сигнала для активации экспрессирующую CAR клетки, например, для увеличения пролиферации или цитотоксической активности экспрессирующей CAR клетки. Любой из антигенсвязывающих доменов, описываемых в настоящем описании, можно заменять антигенсвязывающим доменом в конструкциях NKR-CAR, приводимых ниже.

Последовательность нуклеиновой кислоты DAP12 является такой, как указано ниже:

ATGGGGGGACTTGAACCCTGCAGCAGGTTCCTGCTCCTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAG
TGGTCTCCGTCCTGTCCAGGTCCAGGCCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCGGGC
GTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTGCTCATTGCCCTGGCCGTGTACT
TCCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGAAACAGCGTAT
CACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTC
AACACACAGAGGCCGTATTACAAATGA

(SEQ ID NO: 367)

Аминокислотная последовательность DAP12 является такой, как указано ниже:

MGGLEPCSRFLLLPLLLAVSGLRPVQVQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIAL AVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK

(SEQ ID NO: 368)

Последовательность нуклеиновой кислоты FcεRγ является такой, как указано ниже:

ATGATTCCAGCAGTGGTCTTGCTCTTACTCCTTTTGGTTGAACAAGCAGCGGCCCTGGG AGAGCCTCAGCTCTGCTATATCCTGGATGCCATCCTGTTTCTGTATGGAATTGTCCTCACCCTC CTCTACTGCCGACTGAAGATCCAAGTGCGAAAGGCAGCTATAACCAGCTATGAGAAATCAGATG GTGTTTACACGGGCCTGAGCACCAGGAACCAGGAGACTTACGAGACTCTGAAGCATGAGAAACC ACCACAGTAG

(SEQ ID NO: 369)

Аминокислотная последовательность FcεRγ является такой, как указано ниже:

MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQVRKAAITSYE KSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ

(SEQ ID NO: 370)

В настоящем описании также предоставлены последовательности нуклеиновой кислоты для многоцепочечных NKR-CAR, содержащих NKR-CAR и адапторную молекулу. В таких конструкциях последовательность нуклеиновой кислоты NKR-CAR и адапторная молекулы являются связанными последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей участок расщепления пептида, например, T2A. Такие молекулы нуклеиновой кислоты транслируются в виде одноцепочечного полипептида перед расщеплением, и в настоящем описании также предоставлена аминокислотная последовательность одноцепочечного полипептида.

Ниже приведена последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность NKR-CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с мезотелином, например, SS1, и цитоплазматический домен KIRS2, а также адапторную молекулу DAP12, связанную через участок расщепления пептида T2A.

DAP12-T2A-SS1-KIRS2 (SEQ ID NO: 332)

ДНК 1464 п.н.

Признаки	**Локализация**
DAP12	1...339
Последовательность T2A	352...408
SS1-scFv	481...1200
GS-линкер	1207...1236
Получаемая из KIR2DS2 последовательность	1237...1464

ATGGGGGGAC TTGAACCCTG CAGCAGGTTC CTGCTCCTGC CTCTCCTGCT
GGCTGTAAGT GGTCTCCGTC CTGTCCAGGT CCAGGCCCAG AGCGATTGCA
GTTGCTCTAC GGTGAGCCCG GGCGTGCTGG CAGGGATCGT GATGGGAGAC
CTGGTGCTGA CAGTGCTCAT TGCCCTGGCC GTGTACTTCC TGGGCCGGCT
GGTCCCTCGG GGGCGAGGGG CTGCGGAGGC AGCGACCCGG AAACAGCGTA
TCACTGAGAC CGAGTCGCCT TATCAGGAGC TCCAGGGTCA GAGGTCGGAT
GTCTACAGCG ACCTCAACAC ACAGAGGCCG TATTACAAAG TCGAGGGCGG
CGGAGAGGGC AGAGGAAGTC TTCTAACATG CGGTGACGTG GAGGAGAATC
CCGGCCCTAG GATGGCCTTA CCAGTGACCG CCTTGCTCCT GCCGCTGGCC
TTGCTGCTCC ACGCCGCCAG GCCGGGATCC CAGGTACAAC TGCAGCAGTC
TGGGCCTGAG CTGGAGAAGC CTGGCGCTTC AGTGAAGATA TCCTGCAAGG
CTTCTGGTTA CTCATTCACT GGCTACACCA TGAACTGGGT GAAGCAGAGC
CATGGAAAGA GCCTTGAGTG GATTGGACTT ATTACTCCTT ACAATGGTGC
TTCTAGCTAC AACCAGAAGT TCAGGGGCAA GGCCACATTA ACTGTAGACA
AGTCATCCAG CACAGCCTAC ATGGACCTCC TCAGTCTGAC ATCTGAAGAC
TCTGCAGTCT ATTTCTGTGC AAGGGGGGGT TACGACGGGA GGGGTTTTGA
CTACTGGGGC CAAGGGACCA CGGTCACCGT CTCCTCAGGT GGAGGCGGTT
CAGGCGGCGG TGGCTCTAGC GGTGGTGGAT CGGACATCGA GCTCACTCAG
TCTCCAGCAA TCATGTCTGC ATCTCCAGGG GAGAAGGTCA CCATGACCTG
CAGTGCCAGC TCAAGTGTAA GTTACATGCA CTGGTACCAG CAGAAGTCAG
GCACCTCCCC CAAAAGATGG ATTTATGACA CATCCAAACT GGCTTCTGGA
GTCCCAGGTC GCTTCAGTGG CAGTGGGTCT GGAAACTCTT ACTCTCTCAC
AATCAGCAGC GTGGAGGCTG AAGATGATGC AACTTATTAC TGCCAGCAGT
GGAGTAAGCA CCCTCTCACG TACGGTGCTG GGACAAAGTT GGAAATCAAA
GCTAGCGGTG GCGGAGGTTC TGGAGGTGGG GGTTCCTCAC CCACTGAACC
AAGCTCCAAA ACCGGTAACC CCAGACACCT GCATGTTCTG ATTGGGACCT
CAGTGGTCAA AATCCCTTTC ACCATCCTCC TCTTCTTTCT CCTTCATCGC
TGGTGCTCCA ACAAAAAAAA TGCTGCTGTA ATGGACCAAG AGCCTGCAGG

GAACAGAACA GTGAACAGCG AGGATTCTGA TGAACAAGAC CATCAGGAGG TGTCATACGC ATAA

DAP12-T2A-SS1-KIRS2 (SEQ ID NO: 333)

Белок 488 а.к.

Признаки	**Локализация**
DAP12	1...113
Последовательность T2A	118...136
Сигнальный пептид из CD8 альфа	138...158
SS1-scFv	161...400
GS-линкер	403...412
Последовательность, получаемая из KIR2DS2	413...487

Последовательность

MGGLEPCSRF LLLPLLLAVS GLRPVQVQAQ SDCSCSTVSP GVLAGIVMGD LVLTVLIALA VYFLGRLVPR GRGAAEAATR KQRITETESP YQELQGQRSD VYSDLNTQRP YYKVEGGGEG RGSLLTCGDV EENPGPRMAL PVTALLLPLA LLLHAARPGS QVQLQQSGPE LEKPGASVKI SCKASGYSFT GYTMNWVKQS HGKSLEWIGL ITPYNGASSY NQKFRGKATL TVDKSSSTAY MDLLSLTSED SAVYFCARGG YDGRGFDYWG QGTTVTVSSG GGGSGGGGSS GGGSDIELTQ SPAIMSASPG EKVTMTCSAS SSVSYMHWYQ QKSGTSPKRW IYDTSKLASG VPGRFSGSGS GNSYSLTISS VEAEDDATYY CQQWSKHPLT YGAGTKLEIK ASGGGGSGGG GSSPTEPSSK TGNPRHLHVL IGTSVVKIPF TILLFFLLHR WCSNKKNAAV MDQEPAGNRT VNSEDSDEQD HQEVSYA

Ниже приведена последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность NKR-CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с мезотелином, например, SS1, и цитоплазматический домен TNKp46, а также адапторную молекулу FcεRγ, связанную через участок расщепления пептида T2A.

FCERG-T2A-SS1-TNKp46 (SEQ ID NO: 334)

ДНК 1365 п.н.

Признаки	**Локализация**
FCERG	1...258
T2A	271...327
Сигнальный пептид из CD8 альфа	331...393
SS1-scFv	400...1119
GS-линкер	1126...1155

Последовательность, получаемая из NKp46 1156...1365

Последовательность

ATGATTCCAG CAGTGGTCTT GCTCTTACTC CTTTTGGTTG AACAAGCAGC
GGCCCTGGGA GAGCCTCAGC TCTGCTATAT CCTGGATGCC ATCCTGTTTC
TGTATGGAAT TGTCCTCACC CTCCTCTACT GCCGACTGAA GATCCAAGTG
CGAAAGGCAG CTATAACCAG CTATGAGAAA TCAGATGGTG TTTACACGGG
CCTGAGCACC AGGAACCAGG AGACTTACGA GACTCTGAAG CATGAGAAAC
CACCACAGTC CGGAGGCGGC GGAGAGGGCA GAGGAAGTCT TCTAACATGC
GGTGACGTGG AGGAGAATCC CGGCCCTAGG ATGGCCTTAC CAGTGACCGC
CTTGCTCCTG CCGCTGGCCT TGCTGCTCCA CGCCGCCAGG CCGGGATCCC
AGGTACAACT GCAGCAGTCT GGGCCTGAGC TGGAGAAGCC TGGCGCTTCA
GTGAAGATAT CCTGCAAGGC TTCTGGTTAC TCATTCACTG GCTACACCAT
GAACTGGGTG AAGCAGAGCC ATGGAAAGAG CCTTGAGTGG ATTGGACTTA
TTACTCCTTA CAATGGTGCT TCTAGCTACA ACCAGAAGTT CAGGGGCAAG
GCCACATTAA CTGTAGACAA GTCATCCAGC ACAGCCTACA TGGACCTCCT
CAGTCTGACA TCTGAAGACT CTGCAGTCTA TTTCTGTGCA AGGGGGGGTT
ACGACGGGAG GGGTTTTGAC TACTGGGGCC AAGGGACCAC GGTCACCGTC
TCCTCAGGTG GAGGCGGTTC AGGCGGCGGT GGCTCTAGCG GTGGTGGATC
GGACATCGAG CTCACTCAGT CTCCAGCAAT CATGTCTGCA TCTCCAGGGG
AGAAGGTCAC CATGACCTGC AGTGCCAGCT CAAGTGTAAG TTACATGCAC
TGGTACCAGC AGAAGTCAGG CACCTCCCCC AAAAGATGGA TTTATGACAC
ATCCAAACTG GCTTCTGGAG TCCCAGGTCG CTTCAGTGGC AGTGGGTCTG
GAAACTCTTA CTCTCTCACA ATCAGCAGCG TGGAGGCTGA AGATGATGCA
ACTTATTACT GCCAGCAGTG GAGTAAGCAC CCTCTCACGT ACGGTGCTGG
GACAAAGTTG GAAATCAAAG CTAGCGGTGG CGGAGGTTCT GGAGGTGGGG
GTTCCTTAAC CACAGAGACG GGACTCCAGA AAGACCATGC CCTCTGGGAT
CACACTGCCC AGAATCTCCT TCGGATGGGC CTGGCCTTTC TAGTCCTGGT
GGCTCTAGTG TGGTTCCTGG TTGAAGACTG GCTCAGCAGG AAGAGGACTA
GAGAGCGAGC CAGCAGAGCT TCCACTTGGG AAGGCAGGAG AAGGCTGAAC
ACACAGACTC TTTGA

FCERG-T2A-SS1-TNKp46 (SEQ ID NO: 335)

Белок 455 а.к.

Признаки	**Локализация**
FCERG	1...86
T2A	91...109
Сигнальный пептид из CD8 альфа	111...131
SS1-scFv	134...373

GS-линкер	376...385
Последовательность, получаемя из NKp46	386...454

Последовательность

MIPAVVLLLL LLVEQAAALG EPQLCYILDA ILFLYGIVLT LLYCRLKIQV RKAAITSYEK SDGVYTGLST RNQETYETLK HEKPPQSGGG GEGRGSLLTC GDVEENPGPR MALPVTALLL PLALLLHAAR PGSQVQLQQS GPELEKPGAS VKISCKASGY SFTGYTMNWV KQSHGKSLEW IGLITPYNGA SSYNQKFRGK ATLTVDKSSS TAYMDLLSLT SEDSAVYFCA RGGYDGRGFD YWGQGTTVTV SSGGGGSGGG GSSGGGSDIE LTQSPAIMSA SPGEKVTMTC SASSSVSYMH WYQQKSGTSP KRWIYDTSKL ASGVPGRFSG SGSGNSYSLT ISSVEAEDDA TYYCQQWSKH PLTYGAGTKL EIKASGGGGS GGGGSLTTET GLQKDHALWD HTAQNLLRMG LAFLVLVALV WFLVEDWLSR KRTRERASRA STWEGRRRLN TQTL

Ниже приведена последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность NKR-CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с CD19, и цитоплазматический домен KIRS2, а также адапторную молекулу DAP12, связанную через участок расщепления пептида T2A.

DAP12-T2A-CD19-KIRS2 (SEQ ID NO: 336)

ДНК 1470 п.н.

Признаки	**Локализация**
DAP12	1...339
Последовательность T2A	352...408
CD19-scFv	481...481
GS-линкер	1213...1242
Получаемая из KIR2DS2 последовательность	1243...1470

Последовательность

ATGGGGGGAC TTGAACCCTG CAGCAGGTTC CTGCTCCTGC CTCTCCTGCT GGCTGTAAGT GGTCTCCGTC CTGTCCAGGT CCAGGCCCAG AGCGATTGCA GTTGCTCTAC GGTGAGCCCG GGCGTGCTGG CAGGGATCGT GATGGGAGAC CTGGTGCTGA CAGTGCTCAT TGCCCTGGCC GTGTACTTCC TGGGCCGGCT GGTCCCTCGG GGGCGAGGGG CTGCGGAGGC AGCGACCCGG AAACAGCGTA TCACTGAGAC CGAGTCGCCT TATCAGGAGC TCCAGGGTCA GAGGTCGGAT GTCTACAGCG ACCTCAACAC ACAGAGGCCG TATTACAAAG TCGAGGGCGG CGGAGAGGGC AGAGGAAGTC TTCTAACATG CGGTGACGTG GAGGAGAATC CCGGCCCTAG GATGGCCTTA CCAGTGACCG CCTTGCTCCT GCCGCTGGCC TTGCTGCTCC ACGCCGCCAG GCCGGGATCC GACATCCAGA TGACACAGAC TACATCCTCC CTGTCTGCCT CTCTGGGAGA CAGAGTCACC ATCAGTTGCA GGGCAAGTCA GGACATTAGT AAATATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCA

GATGGAACTG TTAAACTCCT GATCTACCAT ACATCAAGAT TACACTCAGG
AGTCCCATCA AGGTTCAGTG GCAGTGGGTC TGGAACAGAT TATTCTCTCA
CCATTAGCAA CCTGGAGCAA GAAGATATTG CCACTTACTT TTGCCAACAG
GGTAATACGC TTCCGTACAC GTTCGGAGGG GGGACTAAGT TGGAAATAAC
AGGTGGCGGT GGCTCGGGCG GTGGTGGGTC GGGTGGCGGC GGATCTGAGG
TGAAACTGCA GGAGTCAGGA CCTGGCCTGG TGGCGCCCTC ACAGAGCCTG
TCCGTCACAT GCACTGTCTC AGGGGTCTCA TTACCCGACT ATGGTGTAAG
CTGGATTCGC CAGCCTCCAC GAAAGGGTCT GGAGTGGCTG GGAGTAATAT
GGGGTAGTGA AACCACATAC TATAATTCAG CTCTCAAATC CAGACTGACC
ATCATCAAGG ACAACTCCAA GAGCCAAGTT TTCTTAAAAA TGAACAGTCT
GCAAACTGAT GACACAGCCA TTTACTACTG TGCCAAACAT TATTACTACG
GTGGTAGCTA TGCTATGGAC TACTGGGGTC AAGGAACCTC AGTCACCGTC
TCCTCAGCTA GCGGTGGCGG AGGTTCTGGA GGTGGGGGTT CCTCACCCAC
TGAACCAAGC TCCAAAACCG GTAACCCCAG ACACCTGCAT GTTCTGATTG
GGACCTCAGT GGTCAAAATC CCTTTCACCA TCCTCCTCTT CTTTCTCCTT
CATCGCTGGT GCTCCAACAA AAAAAATGCT GCTGTAATGG ACCAAGAGCC
TGCAGGGAAC AGAACAGTGA ACAGCGAGGA TTCTGATGAA CAAGACCATC
AGGAGGTGTC ATACGCATAA

DAP12-T2A-CD19-KIRS2 (SEQ ID NO: 337)

Белок 489 а.к.

Признаки	**Локализация**
DAP12	1...113
Последовательность T2A	118...136
Сигнальный пептид из CD8 альфа	138...158
CD19-scFv	161...402
GS-линкер	405...414
Получаемая из KIR2DS2 последовательность	415...489

Последовательность

MGGLEPCSRF LLLPLLLAVS GLRPVQVQAQ SDCSCSTVSP GVLAGIVMGD
LVLTVLIALA VYFLGRLVPR GRGAAEAATR KQRITETESP YQELQGQRSD
VYSDLNTQRP YYKVEGGGEG RGSLLTCGDV EENPGPRMAL PVTALLLPLA
LLLHAARPGS DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS KYLNWYQQKP
DGTVKLLIYH TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ
GNTLPYTFGG GTKLEITGGG GSGGGGSGGG GSEVKLQESG PGLVAPSQSL
SVTCTVSGVS LPDYGVSWIR QPPRKGLEWL GVIWGSETTY YNSALKSRLT
IIKDNSKSQV FLKMNSLQTD DTAIYYCAKH YYYGGSYAMD YWGQGTSVTV

SSASGGGGSG GGGSSPTEPS SKTGNPRHLH VLIGTSVVKI PFTILLFFLL HRWCSNKKNA AVMDQEPAGN RTVNSEDSDE QDHQEVSYA*

В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен KIR2DS2. Аминокислотная последовательность трансмембранного домена KIR2DS2 является такой, как указано ниже:

VLIGTSVVKIPFTILLFFLL (SEQ ID NO: 357)

В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен KIR2DL3. Аминокислотная последовательность трансмембранного домена KIR2DL3 является такой, как указано ниже:

VLIGTSVVIILFILLLFFLL (SEQ ID NO: 358)

В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен NKp46. Аминокислотная последовательность трансмембранного домена NKp46 является такой, как указано ниже:

LLRMGLAFLVLVALVWFLVEDWLS (SEQ ID NO: 359)

В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен получают из KIR2DS2, например, природного KIRS2DS2, как продемонстрировано на фигуре 29. Аминокислотная последовательность получаемого из KIR2DS2 цитоплазматического домена, также обозначаемая в настоящем описании как домен KIRS2, является такой, как указано ниже:

HRWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHQEVSYA (SEQ ID NO: 360)

В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен получают из KIR2DL3, например, природного KIR2DL3, как продемонстрировано на фигуре 30. Аминокислотная последовательность получаемого из KIR2DL3 цитоплазматического домена, также обозначаемого в настоящем описании как домен KIRL3, является такой, как указано ниже:

HRWCCNKKNAVVMDQEPAGNRTVNREDSDEQDPQEVTYAQLNHCVFTQRKITHPSQRPK TPPTDIIVYTELPNAEP (SEQ ID NO: 361)

В одном из вариантов осуществления цитоплазматический домен получают из NKp46, например, природного NKp46, как продемонстрировано на фигуре 31. Аминокислотная последовательность получаемого из NKp46 цитоплазматического

домена, также обозначаемого в настоящем описании как домен tNKp46 или TNKp46, является такой, как указано ниже:

RKRTRERASRASTWEGRRRLNTQTL (SEQ ID NO: 362)

В одном из вариантов осуществления трансмембранный и цитоплазматический домен, совместно содержит аминокислотную последовательность, предоставленную ниже:

VLIGTSVVKIPFTILLFFLLHRWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHQEVSYA (SEQ ID NO: 371)

Последовательность нуклеиновой кислоты и аминокислотная последовательность KIR-CAR, содержащего антигенсвязывающий домен человека, который связывается с мезотелином, также предоставлены в настоящем описании. Например, ниже предоставлена последовательность нуклеиновой кислоты KIR-CAR, содержащего лидерную последовательность, специфический к мезотелину антигенсвязывающий домен M5 человека и цитоплазматический домен KIRS2. Подчеркнутая последовательность означает последовательность scFv M5, которую можно легко заменять любым другим антигенсвязывающим доменом, например, scFv антитела человека против мезотелина, описываемым в настоящем описании.

Atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccag gccgggatcccaagtccaactcgttcaatcaggcgcagaagtcgaaaagcccggagcatcagtc aaagtctcttgcaaggcttccggctacaccttcacggactactacatgcactgggtgcgccagg ctccaggccagggactggagtggatgggatggatcaacccgaattccgggggaactaactacgc ccagaagtttcagggccgggtgactatgactcgcgatacctcgatctcgactgcgtacatggag ctcagccgcctccggtcggacgataccgccgtgtactattgtgcgtcgggatgggacttcgact actgggggcagggcactctggtcactgtgtcaagcggaggaggtggatcaggtggaggtggaag cgggggaggaggttccggcggcggaggatcagatatcgtgatgacgcaatcgccttcctcgttg tccgcatccgtgggagacagggtgaccattacttgcagagcgtcccagtccattcggtactacc tgtcgtggtaccagcagaagccggggaaagccccaaaactgcttatctatactgcctcgatcct ccaaaacggcgtgccatcaagattcagcggttcgggcagcgggaccgactttaccctgactatc agcagcctgcagccggaagatttcgccacgtactactgcctgcaaacctacaccaccccggact tcggacctggaaccaaggtggagatcaaggctagcggtggcggaggttctggaggtgggggttc ctcacccactgaaccaagctccaaaaccggtaaccccagacacctgcatgttctgattgggacc tcagtggtcaaaatccctttcaccatcctcctcttctttctccttcatcgctggtgctccaaca aaaaaaatgctgctgtaatggaccaagagcctgcagggaacagaacagtgaacagcgaggattc tgatgaacaagaccatcaggaggtgtcatacgcataa

(SEQ ID NO: 363)

Ниже приведена аминокислотная последовательность KIR-CAR, содержащего лидерную последовательность, специфический к мезотелин человека антигенсвязывающий домен M5 и цитоплазматический домен KIRS2. Подчеркнутая последовательность означает последовательность scFv M5, которую можно легко заменять любым другим антигенсвязывающим доменом, например, scFv антитела человека против мезотелина, описываемым в настоящем описании.

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMHW
VRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCASGW
DFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI
RYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQTYT
TPDFGPGTKVEIKASGGGGSGGGGSSPTEPSSKTGNPRHLHVLIGTSVVKIPFTILLFFLLHRW
CSNKKNAAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHQEVSYA

(SEQ ID NO: 364)

В другом примере ниже приведена последовательность нуклеиновой кислоты многочепочечного KIR-CAR, содержащего лидерную последовательность, специфический к мезотелину человека антигенсвязывающий домен M5 и цитоплазматический домен KIRS2, и дополнительно содержащего участок расщепления пептида и последовательность адапторной молекулы DAP12. Подчеркнутая последовательность означает последовательность scFv M5, которую можно легко заменять любым другим антигенсвязывающим доменом, например, scFv антитела человека против мезотелина, описываемым в настоящем описании. Выделенная жирным шрифтом последовательность означает последовательность DAP12, и выделенная курсивом последовательность означает участок расщепления пептида T2A.

ATGGGGGGACTTGAACCCTGCAGCAGGTTCCTGCTCCTGCCTCTCCTGCTGGCTGTAAG
TGGTCTCCGTCCTGTCCAGGTCCAGGCCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCGGGC
GTGCTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGCTGACAGTGCTCATTGCCCTGGCCGTGTACT
TCCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGACCCGGAAACAGCGTAT
CACTGAGACCGAGTCGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTC
AACACACAGAGGCCGTATTACAAA*Tccggaggcagcggagagggcagaggaagtcttctaacat*
*gcggtgacgtggaggagaatcccggcc*CTAGGatggccttaccagtgaccgccttgctcctgcc

gctggccttgctgctccacgccgccaggccggGATCCcaagtccaactcgttcaatcaggcgca
gaagtcgaaaagcccggagcatcagtcaaagtctcttgcaaggcttccggctacaccttcacgg
actactacatgcactgggtgcgccaggctccaggccagggactggagtggatgggatggatcaa
cccgaattccgggggaactaactacgcccagaagtttcagggccgggtgactatgactcgcgat
acctcgatctcgactgcgtacatggagctcagccgcctccggtcggacgataccgccgtgtact
attgtgcgtcgggatgggacttcgactactgggggcagggcactctggtcactgtgtcaagcgg
aggaggtggatcaggtggaggtggaagcgggggaggaggttccggcggcggaggatcagatatc
gtgatgacgcaatcgccttcctcgttgtccgcatccgtgggagacagggtgaccattacttgca
gagcgtcccagtccattcggtactacctgtcgtggtaccagcagaagccggggaaagccccaaa
actgcttatctatactgcctcgatcctccaaaacggcgtgccatcaagattcagcggttcgggc
agcgggaccgactttaccctgactatcagcagcctgcagccggaagatttcgccacgtactact
gcctgcaaacctacaccaccccggacttcggacctggaaccaaggtggagatcaagGctagcgg
tggcggaggttctggaggtgggggttcctcacccactgaaccaagctccaaaaccggtaacccc
agacacctgcatGTTCTGATTGGGACCTCAGTGGTCAAAATCCCTTTCACCATCCTCCTCTTCT
TTCTCCTTcatcgctggtgctccaacaaaaaaaatgctgctgtaatggaccaagagcctgcagg
gaacagaacagtgaacagcgaggattctgatgaacaagaccatcaggaggtgtcatacgcataa
(SEQ ID NO: 365)

Ниже приведена аминокислотная последовательность многоцепочечного KIR-CAR, содержащего лидерную последовательность, специфический к мезотелину человека антигенсвязывающий домен M5 и цитоплазматический домен KIRS2, и дополнительно содержащего участок расщепления пептида и последовательность адапторной молекулы DAP12. Подчеркнутая последовательность означает последовательность scFv M5, которую можно легко заменять любым другим антигенсвязывающим доменом, например, scFv антитела человека против мезотелина, описываем в настоящем описании. Выделенная жирным шрифтом последовательность означает последовательность DAP12, и выделенная курсивом последовательность означает участок расщепления пептида T2A.

MGGLEPCSRFLLLPLLLAVSGLRPVQVQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIAL
AVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYKSGGSGEGRGS
LLTCGDVEENPGPRMALPVTALLLPLALLLHAARPGSQVQLVQSGAEVEKPGASVKVSCKASGY
TFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDT
AVYYCASGWDFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRVT
ITCRASQSIRYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA

TYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIKASGGGGSGGGGSSPTEPSSKTGNPRHLHVLIGTSVVKIPFTI LLFFLLHRWCSNKKNAAVMDQEPAGNRTVNSEDSDEQDHQEVSYA (SEQ ID NO: 366)

Цитоплазматический домен

Цитоплазматический домен CAR, описываемого в настоящем описании, например, NKR-CAR или TCAR, содержит внутриклеточный сигнальный домен. Внутриклеточный сигнализация домен способен активировать по меньшей мере одну из нормальных эффекторных функций эффекторной клетки иммунной системы, в которую вводили CAR.

Примеры внутриклеточных сигнальных доменов для применения в CAR по изобретению включают цитоплазматические последовательности Т-клеточного рецептора (TCR) и корецепторы, которые действуют совместно, чтобы инициировать передачу сигнала после связывания антигенного рецептора, а также любое производное или вариант этих последовательностей и любую рекомбинантную последовательность, которая обладает такой же функциональной способностью.

Известно, что сигналы, генерируемые посредством одного TCR, являются недостаточными для полной активации эффекторной клетки иммунной системы, например, Т-клетки или NK-клетки, и что также необходимым является вторичный и/или костимулирующий. Таким образом, можно предположить, что активация эффекторной клетки иммунной системы, например, активация Т-клетки или активация NK-клетки, является опосредованной двумя различными классами цитоплазматических сигнальных последовательностей: последовательностей, которые инициируют антигензависимую первичную активацию через TCR (первичные внутриклеточные сигнальные домены), и последовательностей, которые действуют зависимым от антигена образом, обеспечивая вторичный или костимулирующий сигнал (вторичный цитоплазматический домен, например, костимулирующий домен).

Первичный внутриклеточный сигнальный домен

В некоторых вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен продуцирует внутриклеточный сигнал, когда внеклеточный домен, например, антигенсвязывающий домен, с которым он является слитым, связывается с когнатным

антигеном. Его получают из первичной стимулирующей молекулы, например, он содержит внутриклеточную последовательность первичной стимулирующей молекулы. Он содержит последовательность первичной стимулирующей молекулы, достаточную для продукции внутриклеточного сигнала, например, когда антигенсвязывающий домен, с которым он является слитым, связывается с когнатным антигеном.

Первичная стимулирующая молекула представляет собой молекулу, которая при связывании когнатного лиганда опосредует ответ иммунного эффектора, например, в клетке, в которой она экспрессируется. Как правило, она генерирует внутриклеточный сигнал, который зависит от связывания с когнатным лигандом, который содержит антиген. Комплекс TCR/CD3 представляет собой иллюстративную первичную стимулирующую молекулу; он генерирует внутриклеточный сигнал при связывании с когнатным лигандом, например, молекулой MHC, нагруженной пептидом. Как правило, например, в случае первичной стимулирующей молекулы TCR/CD3 генерация внутриклеточного сигнала первичным внутриклеточным сигнальным доменом зависит от связывания первичной стимулирующей молекулы с антигеном.

Первичная стимуляция может опосредовать измененную экспрессию определенных молекул, такую как снижение экспрессии TGF-β, и/или реорганизацию структуры цитоскелета и т.п. Стимуляция, например, в присутствии костимуляции может приводить к оптимизации, например, повышению иммунной эффекторной функции Т-клетки. Стимуляция, например, в отношении Т-клетки может опосредовать ответ Т-клетки, например, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п.

В одном из вариантов осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный мотив, например, иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать ITAM, содержащий цитоплазматические сигнальные последовательности из TCR дзета (CD3 дзета), FcR гамма, FcR бета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a,

CD79b, CD278 (также известный как "ICOS"), FcεRI, DAP10, DAP12 и CD66d.

Иллюстративные содержащие ITAM первичные внутриклеточные сигнальные домены предоставлены в таблице 2.

Таблица 2: Первичные внутриклеточные сигнальные домены (например, содержащие ITAM домены)	
CD3 дзета	CD5
FcR гамма	CD22
FcR бета	CD278 ("ICOS")
CD3 гамма	Fc эпсилон RI (FcεRI)
CD3 дельта	CD66d
CD3 эпсилон	DAP10
CD79a	DAP12
CD79b	

В одном из вариантов осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит модифицированный домен ITAM, например, мутантный домен ITAM, который обладает измененной (например, повышенной или сниженной) активностью по сравнению с нативным доменом ITAM. В одном из вариантов осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит модифицированный содержащий ITAM первичный внутриклеточный сигнальный домен, например, оптимизированный и/или усеченный содержащий ITAM первичный внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит один, два, три, четыре или более мотивов ITAM.

Первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит функциональный фрагмент или аналог первичной стимулирующей молекулы (например, CD3 дзета номер доступа GenBank BAG36664.1). Он может содержать полную внутриклеточную область или фрагмент внутриклеточной области, который является достаточным для генерации внутриклеточного сигнала, когда антигенсвязывающий домен, с которым он является слитым или спаренным посредством переключателя димеризации, связывается с когнатным антигеном. В вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен обладает по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичностью последовательности с природной первичной

стимулирующей молекулой, например, первичной стимулирующей молекулой, описанной в таблице 2, например, внутриклеточной первичной стимулирующей молекулой человека (номер доступа GenBank BAG36664.1) или другого млекопитающего, например, не являющихся человеком видов, например, грызуна, обезьяны, примата или мыши. В вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен обладает по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10.

В вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен обладает по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью или отличается не более, чем на 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотный остаток от соответствующих остатков природной первичной стимулирующей молекулы человека, например, природной первичной стимулирующей молекулы человека, описываемой в настоящем описании.

Внутриклеточный сигнальный домен TCAR может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен, например, сигнальный домен CD3-дзета сам по себе, или его можно комбинировать с любым другим желаемым внутриклеточным сигнальным доменом(ами), используемым в отношении TCAR. Например, внутриклеточный сигнальный домен TCAR может содержать первичный внутриклеточный сигнальный домен, например, участок дзета-цепи CD3 и один или более костимулирующих сигнальных доменов. Примеры костимулирующих сигнальных доменов предоставлены ниже.

Костимулирующий сигнальный домен

В одном из вариантов осуществления костимулирующий сигнальный домен продуцирует внутриклеточный сигнал, когда внеклеточный домен, например, антигенсвязывающий домен, с которым он является слитым или спаренным посредством переключателя димеризации, связывает с когнатный лиганд. Его получают из костимулирующей молекулы. Он содержит достаточную последовательность первичной костимулирующей молекулы для продукции внутриклеточного сигнала, например, когда антигенсвязывающий домен, с которым он является слитым или

спаренным посредством переключателя димеризации, связывает когнатный лиганд.

Костимулирующие молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от антигенных рецепторов или их контрлигандов, которые способствуют ответу иммунного эффектора. В некоторых случаях они являются Необходимыми для эффективного или усиленного иммунного ответа. Как правило, костимулирующая молекула генерирует внутриклеточный сигнал, который зависит от связывания с когнатным лигандом, который в вариантах осуществления являются отличным от антигена, например, антигена распознаваемого антигенсвязывающим доменом Т-клетки. Как правило, передача сигналов от первичной стимулирующей молекулы и костимулирующей молекулы вносят вклад в ответ иммунного эффектора, и в некоторых случаях обе являются необходимыми для эффективного или повышенного образования ответа иммунного эффектора.

Костимулирующий сигнальный домен содержит функциональный фрагмент или аналог костимулирующей молекулы (например, 4-1BB, CD28, CD27 и ICOS). Он может содержать полную внутриклеточную область или фрагмент внутриклеточной области костимулирующей молекулы, который является достаточным для генерации внутриклеточного сигнала, например, когда антигенсвязывающий домен, с которым он является слитым или спаренным посредством переключателя димеризации, связывает когнатный антиген. В вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен обладает по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичностью последовательности с природной костимулирующей молекулой, описываемой в настоящем описании, например, внутриклеточной костимулирующей молекулой человека или другого млекопитающего, например, не являющихся человеком видов, например, грызуна, обезьяны, аре или мыши. В вариантах осуществления костимулирующий домен обладает по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 38.

Иллюстративные костимулирующие сигнальные домены (внутриклеточный сигнальный домены) предоставлены в таблице 3.

Таблица 3: Костимулирующие сигнальные домены (идентифицируемые костимулирующими молекулами, из которых их получают)				
CD27	Молекула MHC I класса	SLAMF7	ITGA4	CD11c
CD28	рецепторый белок TNF	NKp80 (KLRF1)	IA4	ITGB1
4-1BB (CD137)	Иммуноглобулиноподобный белок	NKp44	CD49D	CD29
OX40	Цитокиновый рецептор	NKp30	ITGA6	ITGB2
CD30	Интегрин	NKp46	VLA-6	CD18
CD40	Сигнальная активирующая лимфоциты молекула (белок SLAM)	CD19	CD49f	ITGB7
ICOS (CD278)	Активирующие NK-клетку рецепторы	CD4	ITGAD	NKG2D
ICAM-1	Toll-подобный рецептор	CD8 альфа	CD11d	TNFR2
LFA-1 (CD11a/CD18)	BTLA	CD8 бета	ITGAE	TRANCE/ RANKL
CD2	CDS	IL2R бета	CD103	DNAM1 (CD226)
CD7	ICAM-1	IL2R гамма	ITGAL	SLAMF4 (CD244, 2B4)
LIGHT	GITR	IL7R альфа	CD11a	CD84
NKG2C	BAFFR	ITGA4	ITGAM	CD96 (Tactile)
B7-H3	HVEM (LIGHTR)	VLA1	CD11b	CEACAM1
Лиганд, который специфически связывается с CD83	KIRDS2	CD49a	ITGAX	CRTAM
Ly9 (CD229)	CD160 (BY55)	PSGL1	CD100 (SEMA4D)	CD69
SLAMF6 (NTB-A, Ly108)	SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3)	BLAME (SLAMF8)	SELPLG (CD162)	LTBR
LAT	GADS	SLP-76	PAG/Cbp	CD19a

В вариантах осуществления костимулирующий сигнальный домен, обладает по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью или отличается не более чем на 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотный остаток от соответствующих

остатков природной первичной стимулирующей молекулы человека, например, природной костимулирующей молекулы человека, описываемой в настоящем описании, например, предоставленной в таблице 3.

Внутриклеточные сигнальные последовательности в цитоплазматическом домене TCAR могут являться связанными друг с другом в случайно последовательности или в определенном порядке. Необязательно, короткий олиго- или полипептидный линкер, например, длиной от 2 до 10 аминокислот (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот) может образовывать связь между внутриклеточными сигнальными последовательностями. В одном из вариантов осуществления в качестве подходящего линкера можно использовать дублет глицин-серин. В одном из вариантов осуществления в качестве подходящего линкера можно использовать одну аминокислоту, например, аланин, глицин.

В одном из аспектов внутриклеточный сигнальный домен конструируют, так чтобы он содержал два или более, например, 2, 3, 4, 5 или более костимулирующих сигнальных домена. В одном из вариантов осуществления два или более, например, 2, 3, 4, 5 или более костимулирующих сигнальных доменов разделены линкерной молекулой, например, линкерной молекулой, описываемой в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления внутриклеточный сигнальный домен содержит два костимулирующих сигнальных домена. В некоторых вариантах осуществления линкер молекула представляет собой остаток глицина. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой остаток аланина.

В одном из аспектов внутриклеточный сигнальный домен конструируют, так чтобы он содержал сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен 4-1BB. В одном из аспектов сигнальный домен 4-1BB представляет собой сигнальный домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. В одном из аспектов сигнальный домен 4-1BB кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 18. В одном из аспектов сигнальный домен CD3-дзета представляет собой сигнальный домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9

(мутантный CD3-дзета) или SEQ ID NO: 10 (CD3-дзета человека дикого типа).

В одном из аспектов внутриклеточный сигнальный домен конструируют, так чтобы он содержал сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD27. В одном из аспектов сигнальный домен CD27 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8. В одном из аспектов сигнальный домен CD27 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:19. В одном из аспектов сигнальный домен CD3-дзета представляет собой сигнальный домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 (мутантный CD3-дзета) или SEQ ID NO: 10 (CD3-дзета человека дикого типа).

В одном из аспектов внутриклеточный сигнальный домен конструируют, так чтобы он содержал сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен CD28. В одном из аспектов сигнальный домен CD28 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36. В одном из аспектов сигнальный домен CD28 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 37. В одном из аспектов сигнальный домен CD3-дзета представляет собой сигнальный домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 (мутантный CD3-дзета) или SEQ ID NO: 10 (CD3-дзета человека дикого типа).

В одном из аспектов внутриклеточный сигнальный домен конструируют, так чтобы он содержал сигнальный домен CD3-дзета и сигнальный домен ICOS. В одном из аспектов сигнальный домен ICOS содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38. В одном из аспектов сигнальный домен ICOS кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO:39. В одном из аспектов сигнальный домен CD3-дзета представляет собой сигнальный домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 (мутантный CD3-дзета) или SEQ ID NO: 10 (CD3-дзета человека дикого типа).

Трансмембранный домен

В отношении трансмембранного домена в различных вариантах осуществления CAR можно конструировать так, чтобы он содержал трансмембранный домен, который присоединен к внеклеточному домену CAR. Как описано ранее, трансмембранный домен NKR-CAR,

описываемый в настоящем описании может представлять собой трансмембранный домен NKR, например, трансмембранный домен KIR, трансмембранный домен NCR, трансмембранный домен SLAMF, трансмембранный домен FcR, например, трансмембранный домен CD16 или трансмембранный домен CD64, или трансмембранный домен Ly49. Альтернативно, трансмембранный домен NKR-CAR или TCAR, описываемый в настоящем описании, может представлять собой любой из трансмембранных доменов, описанных ниже.

Трансмембранный домен можно получать из природного или рекомбинантного источника. В случае, когда источник является природным, домен можно получать из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. В одном из аспектов трансмембранный домен способен передавать сигналы внутриклеточному домену(ам), во всех случаях, когда CAR связался с мишенью. Трансмембранный домен для конкретного применения в настоящем изобретении может содержать по меньшей мере трансмембранную область(и), например, альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8 (например, CD8 альфа, CD8 бета), CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен может содержать по меньшей мере трансмембранную область(и), например, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, IL2R бета, IL2R гамма, IL7Rα, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKG2D, NKG2C и CD19.

Трансмембранный домен может содержать одну или более дополнительных аминокислот, смежных с трансмембранной областью, например, одну или более аминокислот, связанных с внеклеточной

областью белка, из которого получают трансмембранный белок (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 до 15 аминокислот внеклеточной области) и/или одну или более дополнительных аминокислот, связанных с внутриклеточной областью белка, из которого получают трансмембранный белок (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 до 15 аминокислот внутриклеточной области). В одном из аспектов трансмембранный домен представляет собой белок, который является связанным с одним из других доменов используемого CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен можно выбирать или модифицировать заменами аминокислот для устранения связывания таких доменов с трансмембранными доменами тех же белков или других белков мембранной поверхности, например, для сведения к минимуму взаимодействий с другими представителями рецепторного комплекса. В одном из аспектов трансмембранный домен способен к гомодимеризации с другим CAR на клеточной поверхности экспрессирующей CAR клетки, например, CART-клетки. В другом аспекте аминокислотную последовательность трансмембранного домена можно модифицировать или заменять таким образом, чтобы сводить к минимуму взаимодействия со связывающими доменами нативного партнера по связыванию, присутствующего в той же экспрессирующей CAR клетке, например, CART-клетке.

В некоторых случаях трансмембранный домен можно соединять с внеклеточной областью CAR, например, антигенсвязывающим доменом CAR через шарнир, например, шарнир из белка человека. Например, в одном из вариантов осуществления шарнир может представлять собой шарнир Ig (иммуноглобулина) человека, например, шарнир IgG4 или шарнир CD8. В одном из вариантов осуществления шарнир или спейсер содержит (например, состоит из) аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В одном из аспектов трансмембранный домен содержит (например, состоит из) трансмембранный домен SEQ ID NO: 6.

В одном из аспектов шарнир или спейсер содержит шарнир IgG4. Например, в одном из вариантов осуществления шарнир или спейсер содержит шарнир аминокислотной последовательности SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления шарнир или спейсер

содержит шарнир, кодируемый нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:14.

В одном из аспектов шарнир или спейсер содержит шарнир IgD. Например, в одном из вариантов осуществления шарнир или спейсер содержит шарнир аминокислотной последовательности SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления шарнир или спейсер содержит шарнир, кодируемый нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:15.

В одном из аспектов трансмембранный домен может являться рекомбинантным, в этом случае он содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В одном из аспектов триплет фенилаланина, триптофана и валина можно найти на каждом конце рекомбинантного трансмембранного домена.

Необязательно, короткий олиго- или полипептидный линкер длиной от 2 до 10 аминокислот может образовывать связь между трансмембранным доменом и цитоплазматической областью CAR. Дублет глицин-серин является особенно подходящим линкером. Например, в одном из аспектов линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5. В некоторых вариантах осуществления линкер кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:16.

В одном из аспектов шарнир или спейсер содержит шарнир KIR2DS2.

Химерный TCR

В одном из аспектов антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, антитело или фрагменты антител, описываемых в настоящем описании, например, как предоставлено в таблице 4, можно пересаживать в один или более константных доменов цепи Т-клеточного рецептора ("TCR"), например, альфа-цепи TCR или бета-цепи TCR с получением химерного TCR, который специфически связывается с желаемым опухолевым антигеном. Без связи с теорией, полагают, что химерные TCR передают сигнал через комплекс TCR при связывании антигена. Такие химерные TCR можно получать известными в данной области способами (например, Willemsen R.A. et al., Gene Therapy, 2000; 7: 1369-1377; Zhang

T. et al., Cancer Gene Ther., 2004; 11: 487-496; Aggen et al., Gene Ther., 2012 Apr;19(4):365-74).

В одном из вариантов осуществления экспрессирующая NKR-CAR клетка описываемая в настоящем описании, например, экспрессирующая KIR-CAR клетка, описываемая в настоящем описании, дополнительно содержит химерный TCR. В альтернативном варианте осуществления Экспрессирующую NKR-CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят в комбинации с клеткой, экспрессирующей химерный TCR. В таких вариантах осуществления антигенсвязывающий домен химерного TCR связывает тот же опухолевый антиген, что и NKR-CAR, описываемый в настоящем описании, например, KIR-CAR, или может связывать другой опухолевый антиген, в отличие от NKR-CAR, описываемого в настоящем описании, например, KIR-CAR.

Расщепленный CAR

В некоторых вариантах осуществления в экспрессирующей CAR клетке используют расщепленный CAR. Подход расщепленного CAR более подробно описан в публикациях WO2014/055442 и WO2014/055657, включенных в настоящее описание посредством ссылки. В кратком изложении, система расщепленного CAR содержит клетку, экспрессирующую первый CAR, содержащий первый антигенсвязывающий домен и костимулирующий домен (например, 4-1BB), и клетка также экспрессирует второй CAR, содержащий второй антигенсвязывающий домен и внутриклеточный сигнальный домен (например, CD3 дзета). Когда клетка встречает первый антиген, костимулирующий домен активируется, и клетка пролиферирует. Когда клетка встречает второй антиген, внутриклеточный сигнальный домен активируется, и начинает проявляться цитолитическая активность в отношении клетки. Таким образом, экспрессирующая CAR клетка полностью активируется только в присутствии обоих антигенов. В вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен распознает опухолевый антиген, описываемый в настоящем описании, а второй антигенсвязывающий домен распознает другой опухолевый антиген, описываемый в настоящем описании.

Стратегии регуляции химерных антигенных рецепторов

Существует много путей регуляции видов активности CAR. В некоторых вариантах осуществления для оптимизации безопасности и эффективности терапии CAR желаемым является регулируемый CAR, где активность CAR можно контролировать. Например, индуцирование апоптоза с использованием, например, каспазы, слитой с доменом димеризации (см., например, Di et al., N. Engl. J. Med., 2011 Nov. 3; 365(18):1673-1683), можно использовать в качестве безопасного переключателя в терапии CAR по настоящему изобретению. В другом примере, экспрессирующие CAR клетки также могут экспрессировать индуцибельную молекулу каспазы 9 (и-каспазу 9), которая при введении способствующего димеризации лекарственного средства (например, римидуцида (также называемого AP1903 (Bellicum Pharmaceuticals) или AP20187 (Ariad)), приводит к активации каспазы 9 и апоптозу клеток. Молекула и-каспазы 9 содержит связывающий домен химического индуктора димеризации (CID), который опосредует димеризацию в присутствии CID. Это приводит к индуцибельному и селективному истощению экспрессирующих CAR клеток. В некоторых случаях молекула и-каспаза 9 кодируется молекулой нуклеиновой кислотой, отличной от кодирующего CAR вектора(ов). В некоторых случаях молекула и-каспазы 9 кодируется той же молекулой нуклеиновой кислоты что и кодирующий вектор CAR. И-каспаза 9 может обеспечивать безопасный переключатель, устраняя любую токсичность экспрессирующих CAR клеток. См., например, Song et al., Cancer Gene Ther., 2008; 15(10):667-75; клиническое испытание там же № NCT02107963 и Di Stasi et al., N. Engl. J. Med., 2011; 365:1673-83.

Альтернативные стратегии регуляции терапии CAR по настоящему изобретению включают использование низкомолекулярных соединений или антител, которые инактивируют или выключают активность CAR, например, посредством удаления экспрессирующих CAR клеток, например, индицированием антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Например, экспрессирующие CAR клетки, описываемые в настоящем описании, также могут экспрессировать антиген, который распознают молекулы, способные индуцировать гибель клеток, например, ADCC или индуцируемую комплементом гибель клеток. Например, экспрессирующие CAR клетки, описываемые

в настоящем описании, также могут экспрессировать рецептор, на который может направленно воздействовать антитело или фрагмент антитела. Примеры таких рецепторов включают EpCAM, VEGFR, интегрины (например, интегрины αvβ3, α4, αI¾β3, α4β7, α5β1, αvβ3, αv), представителей суперсемейства рецепторов TNF (например, TRAIL-R_1, TRAIL-R2), рецептор PDGF, рецептор интерферона, рецептор фолата, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, рецептор IL-6, 5T4, GD2, GD3, CD2, CD3, CD4, CD5, CD1 1, CD1 1 a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, рецептор CD23/IgE, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62 л, CD74, CD80, CD125, CD147/базиджин, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7 и EGFR, и их усеченные варианты (например, варианты, сохраняющие один или более внеклеточных эпитопов, но не содержащие одну или более областей в цитоплазматическом домене).

Например, экспрессирующая CAR клетка, описываемая в настоящем описании, также может экспрессировать усеченный рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), который не обладает способностью передачи сигнала, но сохраняет эпитоп, который распознают молекулы, способные индуцировать ADCC, например, цетуксимаб (ERBITUX®), таким образом, введение цетуксимаба индуцирует ADCC и последующее истощение экспрессирующих CAR клеток (см., например, WO2011/056894 и Jonnalagadda et al., Gene Ther., 2013; 20(8)853-860). Другая стратегия включает экспрессию очень компактного маркера/суицидального гена, который объединяет эпитопы-мишени из антигенов CD32 и CD20 в экспрессирующих CAR клетках, описываемых в настоящем описании, который связывается с ритуксимабом, что приводит к селективному истощению экспрессирующих CAR клеток, например, посредством ADCC (см., например, Philip et al., Blood. 2014; 124(8)1277-1287). Другие способы истощения экспрессирующих CAR клеток, описываемых в настоящем описании, включают введение кэмпас, моноклонального антитела против CD52, которое селективно связывается и направляет зрелые лимфоциты, например, экспрессирующие CAR клетки, по пути разрушения, например,

посредством индукции ADCC. В других вариантах осуществления на экспрессирующую CAR клетку можно направленно воздействовать с использованием лиганда CAR, например, антиидиотипического антитела. В некоторых вариантах осуществления антиидиотипическое антитело может вызывать активность эффекторных клеток, например, активности ADCC или ADC, таким образом, снижая число экспрессирующих CAR клеток. В других вариантах осуществления CAR лиганд, например, антиидиотипическое антитело, можно связывать со средством, которое индуцирует цитолиз клетки, например, токсином, таким образом, снижая число экспрессирующих CAR клеток. Альтернативно, сами молекулы CAR можно конфигурировать таким образом, что можно регулировать активность, например, включать и выключать, как описано ниже.

В других вариантах осуществления экспрессирующая CAR клетка, описываемая в настоящем описании, также может экспрессировать белок-мишень, распознаваемый истощающим Т-клетки средством. В одном из вариантов осуществления белок-мишень представляет собой CD20, и истощающее Т-клетки средство представляет собой антитело против CD20, например, ритуксимаб. В таком варианте осуществления истощающее Т-клетки средство вводят однократно, если желательным является снижение или элиминация экспрессирующей CAR клетки, например, для ослабления индуцированной CAR токсичностью. В других вариантах осуществления истощающее Т-клетки средство представляет собой антитело против CD52, например, алемтузумаб, как описано в примерах в настоящем описании.

В других вариантах осуществления регулируемый CAR (RCAR) содержит набор полипептидов, как правило, два в наиболее простых вариантах осуществления, в которых компоненты стандартного CAR, описываемого в настоящем описании, например, антигенсвязывающий домен и внутриклеточный сигнальный домен, распределены на отдельных полипептидах или представителях. В некоторых вариантах осуществления набор полипептидов включает переключатель димеризации, который при наличии индуцирующей димеризацию молекулы может связывать полипептиды друг с другом, например, может связывать антигенсвязывающий домен с внутриклеточным

сигнальным доменом. Дополнительное описание и иллюстративные конфигурации таких регулируемых CAR приведены в настоящем описании и в международной публикации № WO 2015/090229, полностью включенной, таким образом, посредством ссылки.

В одном из аспектов RCAR содержит два полипептида или компонента: 1) внутриклеточный сигнальный компонент, содержащий внутриклеточный сигнальный домен, например, первичный внутриклеточный сигнальный домен, описываемый в настоящем описании, и первый переключающий домен; 2) антигенсвязывающий компонент, содержащий антигенсвязывающий домен, например, который специфически связывается с опухолевым антигеном, описываемым в настоящем описании, как описано в настоящем описании, и второй переключающий домен. Необязательно, RCAR содержит трансмембранный домен, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления трансмембранный домен может располагаться на внутриклеточном сигнальном компоненте, на антигенсвязывающем компоненте или на обоих. (Если не указано иное, когда компоненты или элементы RCAR описывают в настоящем описании, порядок может быть таким, как предоставлено, но другие виды порядка также включены. Другими словами, в одном из вариантов осуществления порядок является таким, как указано в тексте, но в других вариантах осуществления порядок может отличаться. Например, порядок элементов на одной стороне трансмембранной области может отличаться от примера, например, расположение переключающего домена относительно внутриклеточного сигнального домена может отличаться, например, являться обратным).

В одном из вариантов осуществления первый и второй переключающие домены могут образовывать внутриклеточный или внеклеточный переключатель димеризации. В одном из вариантов осуществления переключатель димеризации может представлять собой переключатель гомодимеризации, например, когда первый и второй переключающий домен являются одинаковыми, или переключатель гетеродимеризации, например, когда первый и второй переключающий домен отличаются друг от друга.

В вариантах осуществления RCAR может содержать "множественный переключатель". Множественный переключатель может содержать переключающие домены гетеродимеризации или переключающие домены гомодимеризации. Множественный переключатель содержит совокупность, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 переключающих доменов, независимо от первого компонента, например, антигенсвязывающего компонента, и второго компонента, например, внутриклеточного сигнального компонента. В одном из вариантов осуществления первый компонент может содержать совокупность первых переключающих доменов, например, переключающих доменов на основе FKBP, а второй компонент может содержать совокупность вторых переключающих доменов, например, переключающих доменов на основе FRB. В одном из вариантов осуществления первый компонент может содержать первый и второй переключающий домен, например, переключающий домен на основе FKBP и переключающий домен на основе FRB, а второй компонент может содержать первый и второй переключающий домен, например, переключающий домен на основе FKBP и переключающий домен на основе FRB.

В одном из вариантов осуществления внутриклеточный сигнальный компонент содержит один или более внутриклеточных сигнальных доменов, например, первичный внутриклеточный сигнальный домен и один или более костимулирующих сигнальных доменов.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий компонент может содержать один или более внутриклеточных сигнальных доменов, например, один или более костимулирующих сигнальных доменов. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий компонент содержит совокупность, например, 2 или 3 костимулирующих сигнальных домена, описываемых в настоящем описании, например, выбранных из 4-1BB, CD28, CD27, ICOS и OX40, и в вариантах осуществления не содержится первичный внутриклеточный сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий компонент содержит следующие костимулирующие сигнальные домены в направлении от внеклеточного к внутриклеточному: 4-1BB-CD27; 4-1BB-CD27; CD27-4-1BB; 4-1BB-

CD28; CD28-4-1BB; OX40-CD28; CD28-OX40; CD28-4-1BB или 4-1BB-CD28. В таких вариантах осуществления внутриклеточный связывающий компонент содержит домен CD3-дзета. В одном из таких вариантов осуществления RCAR содержит (1) антигенсвязывающий компонент, содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и два костимулирующих домена, и первый переключающий домен, и (2) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий трансмембранный домен или домен мембранного заякоривания и по меньшей мере один первичный внутриклеточный сигнальный домен, и второй переключающий домен.

Вариант осуществления предоставляет CAR, где антигенсвязывающий компонент не является заякоренным на поверхности CAR-клетки. Это обеспечивает возможность того, что клетка содержит внутриклеточный сигнальный компонент, который подходящим способом спаривают с одним или более антигенсвязывающих доменов без трансформации клетки последовательностью, кодирующей антигенсвязывающий компонент. В таких вариантах осуществления RCAR содержит: 1) внутриклеточный сигнальный компонент, содержащий: первый переключающий домен, трансмембранный домен, внутриклеточный сигнальный домен, например, первичный внутриклеточный сигнальный домен и первый переключающий домен, и 2) антигенсвязывающий компонент, содержащий: антигенсвязывающий домен и второй переключающий домен, где антигенсвязывающий компонент не содержит трансмембранный домен или домен мембранного заякоривания, и, необязательно, не содержит внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления RCAR может дополнительно содержать 3) второй антигенсвязывающий компонент, содержащий: втор антигенсвязывающий домен, например, второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген, отличный от антигена, который связывает антигенсвязывающий домен, и второй переключающий домен.

В настоящем описании также раскрыты RCAR, где антигенсвязывающий компонент обладает биспецифической активацией и способностью направленно воздействовать. В этом варианте осуществления антигенсвязывающий компонент может содержать

совокупность, например, 2, 3, 4 или 5 антигенсвязывающих доменов, например, scFvs, где каждый антигенсвязывающий домен связывается с антигеном-мишенью, например, различными антигенами или тем же антигеном, например, одинаковыми или отличными эпитопами на том же антигене. В одном из вариантов осуществления совокупность антигенсвязывающих доменов располагаются последовательно, и необязательно линкер или шарнирная область располагается между каждым из антигенсвязывающих доменов. Подходящие линкеры и шарнирные области описаны в настоящем описании.

Вариант осуществления относится к RCAR с конфигурацией, которая обеспечивает возможность переключения пролиферации. В этом варианте осуществления RCAR содержит: 1) внутриклеточный сигнальный компонент, содержащий: необязательно трансмембранный домен или домен мембранного заякоривания; один или более костимулирующих сигнальных доменом, например, выбранных из 4-1BB, CD28, CD27, ICOS и OX40, и переключающий домен, и 2) антигенсвязывающий компонент, содержащий: антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и первичный внутриклеточный сигнальный домен, например, домен CD3-дзета, где антигенсвязывающий компонент не содержит переключающий домен, или не содержит переключающий домен, который димеризуется с переключающим доменом на внутриклеточном сигнальном компоненте. В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий компонент не содержит костимулирующий сигнальный домен. В одном из вариантов осуществления внутриклеточный сигнальный компонент содержит переключающий домен из переключателя гомодимеризации. В одном из вариантов осуществления внутриклеточный сигнальный компонент содержит первый переключающий домен переключателя гетеродимеризации, и RCAR содержит второй внутриклеточный сигнальный компонент, который содержит второй переключающий домен переключателя гетеродимеризации. В таких вариантах осуществления второй внутриклеточный сигнальный компонент содержит те же внутриклеточные сигнальные домены как и внутриклеточный сигнальный компонент. В одном из вариантов осуществления переключатель димеризации является

внутриклеточным. В одном из вариантов осуществления переключатель димеризации является внеклеточным.

В любой из конфигураций RCAR, описываемых в настоящем описании, первый и второй переключающие домены содержат переключатель на основе FKBP-FRB, как описано в настоящем описании.

В настоящем описании также раскрыты клетки, содержащие RCAR, описываемый в настоящем описании. Любую клетку, которую конструируют для экспрессии RCAR, можно использовать в качестве RCARX-клетки. В одном из вариантов осуществления RCARX-клетка представляет собой Т-клетку и обозначается как RCART-клетка. В одном из вариантов осуществления RCARX-клетка представляет собой NK-клетку и обозначается как RCARN-клетка.

В настоящем описании также раскрыты нуклеиновые кислоты и векторы, содержащие кодирующие RCAR последовательности. Последовательность, кодирующую различные элементы RCAR, можно располагать на той же молекуле нуклеиновой кислоты, например, той же плазмиде или том же векторе, например, вирусном векторе, например, лентивирусном векторе. В одном из вариантов осуществления (i) последовательность, кодирующая антигенсвязывающий компонент, и (ii) последовательность, кодирующая внутриклеточный сигнальный компонент, могут содержаться на одной той же нуклеиновой кислоте, например, векторе. Продукцию соответствующих белков можно получать, например, с использованием отдельных промоторов или с использованием бицистронного продукта транскрипции (что может приводить к продукции двух белков в результате расщепления одного продукта трансляции или посредством трансляции двух отдельных белковых продуктов). В одном из вариантов осуществления последовательность, кодирующая расщепляемый пептид, например, последовательность P2A или F2A располагается между (i) и (ii). В одном из вариантов осуществления последовательность, кодирующая IRES, например, EMCV или EV71 IRES, располагается между (i) и (ii). В этих вариантах осуществления (i) и (ii) транскрибируются в виде одной РНК. В одном из вариантов осуществления первый промотор является

функционально связанным с (i), а второй промотор является функционально связанным с (ii), таким образом, что (i) и (ii) транскрибируются как отдельные иРНК.

Альтернативно, последовательность, кодирующая различные элементы RCAR, может располагаться на разных молекулах нуклеиновой кислоты, например, разных плазмидах или векторах, например, вирусном векторе, например, лентивирусном векторе. Например, (i) последовательность, кодирующая антигенсвязывающий компонент, может содержаться в первой нуклеиновой кислоте, например, первом векторе, а (ii) последовательность, кодирующая внутриклеточный сигнальный компонент, может содержаться во второй нуклеиновой кислоте, например, втором векторе.

Переключатели димеризации

Переключатели димеризации могут являться нековалентными или ковалентными. В нековалентном переключателе димеризации индуцирующая димеризацию молекула способствует нековалентному взаимодействию между переключающими доменами. В ковалентном переключателе димеризации индуцирующая димеризацию молекула способствует ковалентному взаимодействию между переключающими доменами.

В одном из вариантов осуществления RCAR содержит переключатель димеризации на основе FKBP/FRAP или FKBP/FRB. FKBP12 (FKBP или FK506-связывающий белок) представляет собой широко распространенный цитоплазматический белок, который служит в качестве первичной внутриклеточной мишени для натурального продукта иммуносупрессивного лекарственного средства, рапамицина. Рапамицин связывается с FKBP и с большим гомологом PI3K FRAP (RAFT, mTOR). FRB представляет собой участок FRAP длиной 93 аминокислота, который является достаточным для связывания с комплексом FKBP-рапамицина (Chen J., Zheng X.F., Brown E.J. and Schreiber S.L., (1995) Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4947-51.)

В вариантах осуществления в переключателе на основе FKBP/FRAP, например, FKBP/FRB можно использовать индуцирующую димеризацию молекулу, например, рапамицин или аналог рапамицина.

Аминокислотная последовательность FKBP является такой, как указано ниже:

DVPDYASLGGPSSPKKKRKVSRGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFD SSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDV ELLKLETSY (SEQ ID NO: 43).

В вариантах осуществления переключающий домен FKBP может содержать фрагмент FKBP, обладающий способностью связываться с FRB, или его фрагмент или аналог в присутствии рапамицина или рапалога, например, подчеркнутый участок SEQ ID NO: 43, который представляет собой:

VQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMLGKQEVIRGWE EGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLETS (SEQ ID NO: 44).

Аминокислотная последовательность FRB является такой, как указано ниже:

ILWHEMWHEG LEEASRLYFG ERNVKGMFEV LEPLHAMMER GPQTLKETSF NQAYGRDLME AQEWCRKYMK SGNVKDLTQA WDLYYHVFRR ISK (SEQ ID NO: 45).

"Переключатель на основе FKBP/FRAP, например, FKBP/FRB", как этот термин используют в настоящем описании, относится к переключателю димеризации, содержащему: первый переключающий домен, который содержит фрагмент FKBP или его аналог, обладающий способностью связываться с FRB или его фрагментом, или аналогом в присутствии рапамицина или рапалога, например, RAD001, и обладает по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с последовательностью FKBP SEQ ID NO: 54 или 55 или отличается не более чем на 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотный остаток от нее; и второй переключающий домен, который содержит фрагмент FRB или его аналог, обладающий способностью связываться с FRB или его фрагментом, или аналогом в присутствии рапамицина или рапалога, и обладает по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с последовательностью FRB SEQ ID NO: 56 или отличается не более чем на 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотный

остаток от нее. В одном из вариантов осуществления RCAR, описываемый в настоящем описании, содержит один переключающий домен, который содержит аминокислотные остатки, описанные в SEQ ID NO: 43 (или SEQ ID NO: 44), и один переключающий домен, который содержит аминокислотные остатки, описанные в SEQ ID NO: 45.

В вариантах осуществления переключатель димеризации FKBP/FRB содержит модифицированный переключающий домен FRB, для которого выявляют измененное, например, повышенное комплексообразование между переключающим доменом на основе FRB, например, модифицированным переключающим доменом FRB, переключающий домен на основе FKBP, и индуцирующей димеризацию молекулой, например, рапамицином или рапалогом, например, RAD001. В одном из вариантов осуществления модифицирующий переключающий домен FRB содержит одну или более мутаций, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более, выбранных из мутаций в положении(ях) аминокислоты L2031, E2032, S2035, R2036, F2039, G2040, T2098, W2101, D2102, Y2105 и F2108, где аминокислоту дикого типа подвергают мутации до любой другой природной аминокислоты. В одном из вариантов осуществления мутантный FRB содержит мутацию в E2032, где E2032 мутирует до фенилаланина (E2032F), метионина (E2032M), аргинина (E2032R), валина (E2032V), тирозина (E2032Y), изолейцина (E2032I), например, SEQ ID NO: 46 или лейцина (E2032L), например, SEQ ID NO: 47. В одном из вариантов осуществления мутантный FRB содержит мутацию в T2098, где T2098 мутирует до фенилаланина (T2098F) или лейцина (T2098L), например, SEQ ID NO: 48. В одном из вариантов осуществления мутантный FRB содержит мутацию в E2032 и в T2098, где E2032 мутирует до любой аминокислоты, и где T2098 мутирует до любой аминокислоты, например, SEQ ID NO: 49. В одном из вариантов осуществления мутантный FRB содержит мутацию E2032I и T2098L, например, SEQ ID NO: 50. В одном из вариантов осуществления мутантный FRB содержит мутацию E2032L и T2098L, например, SEQ ID NO: 51.

Таблица 6. Иллюстративный мутантный FRB, обладающий повышенной аффинностью к индуцирующей димеризацию молекуле.

Мутант FRB	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Мутант E2032I	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	46
Мутант E2032L	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	47
Мутант T2098L	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	48
Мутант E2032, T2098	ILWHEMWHEGL**X**EASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDL**X**QAWDLYYHVFRRISKTS	49
Мутант E2032I, T2098L	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	50
Мутант E2032L, T2098L	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGR DLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	51

Другие подходящие переключатели димеризации включают переключатель димеризации на основе GyrB-GyrB, переключатель димеризации на основе гиббереллина, переключатель димеризации метка/связывающее средство и переключатель димеризации гало-метка/замок-метка (snap-tag). С учетом рекомендаций, предоставленных в настоящем описании, специалисту в данной области будут понятны такие переключатели и соответствующие способствующие димеризации молекулы.

Индуцирующая димеризацию молекула

Образованию ассоциации между переключающими доменами способствует индуцирующая димеризацию молекула. В присутствии индуцирующей димеризацию молекулы взаимодействие или ассоциация между переключающими доменами обеспечивает передачу сигнала между полипептидом, связанным, например, слитым с первым переключающим доменом и полипептидом, связанным, например, слитым со вторым переключающим доменом. В присутствии неограничивающих уровней индуцирующей димеризацию молекулы передача сигнала увеличивается в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 5, 10, 50, 100 раз, например, как измеряют в системе, описываемой в настоящем описании.

Рапамицин и аналоги рапамицина (в некоторых случаях обозначаемые как рапалоги), например, RAD001, можно использовать в качестве индуцирующих димеризацию молекул в переключателе димеризации на основе FKBP/FRB, описываемом в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления индуцирующую димеризацию молекулу можно выбирать из рапамицина (сиролимуса), RAD001 (эверолимуса), зотаролимуса, темсиролимуса, AP-23573 (ридафоролимуса), биолимуса и AP21967. Дополнительные аналоги рапамицина пригодные для использования с переключателями димеризации на основе FKBP/FRB дополнительно описаны в разделе, озаглавленном "Способы комбинированного лечения", или в подразделе, озаглавленном "Комбинация с ингибитором mTOR в низкой дозе".

Коэкспрессия CAR с рецептором хемокина

В вариантах осуществления экспрессирующая CAR клетка, например, экспрессирующая NKR-CAR клетка, например, KIR-экспрессирующая CAR клетка, описываемая в настоящем описании, дополнительно содержит молекулу рецептора хемокина. Трансгенная экспрессия рецепторов хемокина CCR2b или CXCR2 в Т-клетках повышает миграцию в секретирующие CCL2 или CXCL1 солидные опухоли, включая меланому и нейробластому (Craddock et al., J. Immunother., 2010 Oct; 33(8):780-8 и Kershaw et al., Hum. Gene Ther., 2002 Nov 1; 13(16):1971-80). Таким образом, без желания быть связанными теорией, полагают, что рецепторы хемокина, экспрессируемые в экспрессирующих CAR клетках, которые распознают хемокины, секретируемые опухолями, например, солидными опухолями, могут улучшать хоминг экспрессирующей CAR клетки к опухоли, облегчать инфильтрацию экспрессирующей CAR клетки в опухоли и повышать противоопухолевую эффективность экспрессирующей CAR клетки. Молекула рецептора хемокина может содержать природный или рекомбинантный рецептор хемокина или его фрагмент, связывающий хемокин. Молекула рецептора хемокина, подходящая для экспрессии в экспрессирующей CAR клетке, описываемой в настоящем описании, включает рецептор хемокина CXC (например, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6 или CXCR7), рецептор хемокина CC (например, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5,

CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 или CCR11), рецептор хемокина CX3C (например, CX3CR1), рецептор хемокина XC (например, XCR1) или его фрагмент, связывающий хемокин. В одном из вариантов осуществления молекула рецептора хемокина, которая должна экспрессироваться с CAR, описываемым в настоящем описании, выбрана на основании хемокина(ов), секретируемого опухолью. В одном из вариантов осуществления экспрессирующая CAR клетка, описываемая в настоящем описании, дополнительно содержит, например, экспрессирует рецептор CCR2b или рецептор CXCR2. В одном из вариантов осуществления CAR, описываемый в настоящем описании, и молекула рецептора хемокина находятся на том же векторе или находятся на двух различных векторах. В вариантах осуществления, где CAR, описываемый в настоящем описании, и молекула рецептор хемокина находятся на одном и том же векторе, каждый из CAR и молекулы рецептора хемокина находится под контролем двух различных промоторов или находятся под контролем одного и того же промотора.

Конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующие CAR

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим одну или более конструкций CAR, описываемых в настоящем описании. В одном из аспектов молекула нуклеиновой кислоты предоставлена как транскрипт информационной РНК. В одном из аспектов молекула нуклеиновой кислоты предоставлена как конструкция ДНК.

В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая NKR-CAR, описываемый в настоящем описании, дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую внутриклеточный сигнальный домен или адапторную молекулу.

Настоящее изобретение также относится к векторам, в которые вводят ДНК по настоящему изобретению. Векторы, получаемые из ретровирусов, таких как лентивирус, представляют собой подходящие средства для получения длительного переноса генов, т.к. они обеспечивают длительную, стабильную интеграцию трансгена и его размножение в дочерних клетках. Лентивирусные векторы обладают дополнительным преимуществом по сравнению с

векторами, получаемыми из онкоретровирусов, таких как вирусы лейкозов мышей, которое заключается в том, что они могут трансдуцировать непролиферирующие клетки, такие как гепатоциты. Они также обладают дополнительным преимуществом низкой иммуногенности. Ретровирусный вектор также может представлять собой, например, гамма-ретровирусный вектор. Гамма-ретровирусный вектор может содержать, например, промотор, сигнал упаковки (ψ), участок связывания праймера (PBS), один или более (например, два) длинных концевых повтора (LTR) и представляющий интерес трансген, например, ген, кодирующий CAR. Гамма-ретровирусный вектор может не содержать структурные гены вируса, такие как gag, pol и env. Иллюстративные гамма-ретровирусные векторы включают вирус лейкоза мышей (MLV), вирус некроза селезенки (SFFV) и миелопролиферативный вирус саркомы (MPSV), и векторы, получаемые из них. Другие гамма-ретровирусные векторы описаны, например, у Tobias Maetzig et al., "Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application" Viruses. 2011 Jun; 3(6): 677-713.

В другом варианте осуществления вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую желаемый CAR по изобретению, представляет собой аденовирусный вектор (A5/35). В другом варианте осуществления экспрессию нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, можно проводить с использованием транспозон, таких как спящая красавица, crisper, CAS9 и нуклеазы цинковые пальцы. См. ниже June et al., 2009 Nature Reviews Immunology, 9.10: 704-716, включенную в настоящее описание посредством ссылки.

В кратком изложении экспрессию природных или синтетических нуклеиновых кислот, кодирующих CAR, как правило, получают посредством функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид CAR или его участок, с промотором и введения конструкции в экспрессирующий вектор. Векторы могут являться подходящими для репликации и интеграции у эукариот. Характерные клонирующие векторы содержат терминаторы транскрипции и трансляции, инициирующие последовательности и

промоторы, пригодные для регуляции экспрессии желаемой последовательности нуклеиновой кислоты.

Экспрессирующие конструкции по настоящему изобретению также можно использовать для иммунизации и генотерапии нуклеиновыми кислотами с использованием стандартных протоколов доставки генов. Способы доставки генов известны в данной области. См., например, патенты США № 5399346, 5580859, 5589466, полностью включенные посредством ссылки в настоящее описание. В другом варианте осуществления изобретение относится к генотерапевтическому вектору.

Нуклеиновую кислоту можно клонировать в различные типы векторов. Например, нуклеиновую кислоту можно клонировать в вектор, включая, но, не ограничиваясь ими плазмиду, фагмиду, производное фага, вирус животных и космиду. Представляющие особый интерес векторы включают экспрессирующие векторы, репликационные векторы, образующие зонд векторы и векторы секвенирования.

Кроме того, экспрессирующий вектор можно доставлять в клетку в форме вирусного вектора. Технология вирусного вектора хорошо известна в данной области и описана, например, у Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY) и в других учебниках по вирусологии и молекулярной биологии. Вирусы, которые являются пригодными в качестве векторов, включают, но не ограничиваются ими, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса и лентивирусы. В основном подходящий вектор содержит участок начала репликации, функциональный по меньшей мере в одном организме, промоторную последовательность, подходящие участки узнавания рестрикционных эндонуклеаз и один или более селектируемых маркеров, (например, WO 01/96584, WO 01/29058 и патент США № 6326193).

Был разработан ряд систем на основе вирусов для переноса генов в клетки млекопитающих. Например, ретровирусы представляют собой подходящую платформу для системы доставки генов. Выбранный ген можно вводить в вектор и упаковывать в ретровирусные частицы с применением известных в данной области способов. Затем

рекомбинантный вирус можно выделять и доставлять в клетки индивидуума *in vivo* или *ex vivo*. В данной области известен ряд ретровирусных систем. В некоторых вариантах осуществления используют аденовирусные векторы. В данной области известен ряд аденовирусных векторов are. В одном из вариантов осуществления используют лентивирусные векторы.

Дополнительные промоторные элементы, например, энхансеры регулируют частоту начала транскрипции. Как правило, они располагаются в области 30-110 п.н. выше участка начала, хотя недавно было показано, что ряд промоторов также содержит функциональные элементы ниже участка начала. Расстояние между промоторными элементами часто можно изменять, таким образом, что функция промотора сохраняется, когда элементы располагают в обратном порядке или перемещают относительно друг друга. В промоторе тимидинкиназы (tk) расстояние между промоторными элементами можно увеличивать до 50 п.н. в разные стороны до того, как активность начинает снижаться. Видимо, в зависимости от промотора индивидуальные элементы могут функционировать совместно или независимо для активации транскрипции.

Примером промотора, который способен экспрессировать трансген CAR в Т-клетке у млекопитающего, является промотор EF1a. Нативный промотор EF1a направляет экспрессию альфа-субъединицы комплекса фактора элонгации 1, который обеспечивает ферментативную доставку аминоацил-тРНК в рибосому. Промотор EF1a широко использовался в плазмидах экспрессии млекопитающих, и было продемонстрировано, что он является эффективным для направления экспрессии CAR из трансгенов, клонированных в лентивирусный вектор. См., например, Milone et al., Mol. Ther., 17(8): 1453-1464 (2009). В одном из аспектов промотор EF1a содержит последовательность, предоставленную как SEQ ID NO: 11.

Один из примеров промотора представляет собой последовательность предраннего промотора цитомегаловируса (CMV). Такая последовательность промотора представляет собой последовательность сильного конститутивного промотора, способную направлять высокие уровни экспрессии любой полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с ней. Однако также

можно использовать другие последовательности конститутивных промоторов, включая, но, не ограничиваясь ими, ранний промотор вируса обезьян 40 (SV40), вирус опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор длинного концевого повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор MoMuLV, промотор вируса лейкоза птиц, предранний промотор вируса Эпштейна-Барр, промотор вируса саркомы Рауса, промотор фактора элонгации 1α, а также промоторы генов человека, такие как, но, не ограничиваясь ими, промотор актина, промотор миозина, промотор гемоглобина и промотор креатинкиназы. Кроме того, изобретение не должно быть ограничено использованием конститутивных промоторов. Также предусматривают индуцибельные промоторы как часть изобретения. Использование индуцибельного промотора обеспечивает молекулярный переключатель, способный включать экспрессию полинуклеотидной последовательности, которая является функционально связанной, когда такая экспрессия является желательной, или выключение экспрессии, когда экспрессия не является желательной. Примеры индуцибельных промоторов включают, но не ограничиваются ими, промотор металлотионеина, промотор глюкокортикоидов, промотор прогестерона и промотор тетрациклина.

В одном из вариантов осуществления вектор представляет собой лентивирусный вектор. В одном из вариантов осуществления вектор дополнительно содержит промотор. В одном из вариантов осуществления промотор представляет собой промотор EF-1.

В одном из вариантов осуществления вектор представляет собой транскрибируемый *in vitro* вектор, например, вектор, который транскрибирует РНК молекулы нуклеиновой кислоты, описываемой в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит хвост поли(А), например, хвост поли(А), описываемый в настоящем описании, например, содержащий приблизительно 150 оснований аденозина. В одном из вариантов осуществления последовательность нуклеиновой кислоты в векторе дополнительно содержит 3'-UTR.

Другим примером промотора является промотор фосфоглицераткиназы (PGK). В вариантах осуществления желательным может являться усеченный промотор PGK (например, промотор PGK с одной или более, например, 1, 2, 5, 10, 100, 200, 300 или 400 делециями нуклеотидов по сравнению с последовательностью промотора PGK дикого типа). Нуклеотидные последовательности иллюстративных промоторов PGK приведены ниже.

Промотор PGK WT

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCC
TCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGG
CGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACC
GGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGA
TCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCT
GAATCCCCGCCTCGTCCTTCGCAGCGGCCCCCCGGGTGTTCCCATCGCCGCTTCTAGGCCCACT
GCGACGCTTGCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCGCGGCGACGCAAAGGGCCTTGG
TGCGGGTCTCGTCGGCGCAGGGACGCGTTTGGGTCCCGACGGAACCTTTTCCGCGTTGGGGTTG
GGGCACCATAAGCT

(SEQ ID NO: 52)

Иллюстративные усеченные промоторы PGK

PGK100:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCC
TCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTG

(SEQ ID NO: 53)

PGK200:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCC
TCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGG
CGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACC
GGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACG

(SEQ ID NO: 54)

PGK300:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCC
TCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGG
CGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACC
GGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGA
TCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCT
GAATCCCCG

(SEQ ID NO: 55)

PGK400:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCC
TCCGAACGTCTTACGCCTTGTGGCGCGCCCGTCCTTGTCCCGGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGG
CGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCCGCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACC
GGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGACGCTCCCATGA
TCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGGAAGGGCT
GAATCCCCGCCTCGTCCTTCGCAGCGGCCCCCCGGGTGTTCCCATCGCCGCTTCTAGGCCCACT
GCGACGCTTGCCTGCACTTCTTACACGCTCTGGGTCCCAGCCG

(SEQ ID NO: 56)

Вектор также может содержать, например, сигнальную последовательность для облегчения секреции, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции (например, из гена бычьего гормона роста (BGH)), элемент, обеспечивающий эписомальную репликацию и репликацию у прокариот (например, ориджин SV40 и ColE1 или другие известные в данной области), и/или элементы для обеспечения селекции (например, ген устойчивости к ампициллину и/или маркер зеоцин).

Для оценки экспрессии полипептида CAR или его участков экспрессирующий вектор, который необходимо вводить в клетку, также может содержать ген селективного маркера или репортерный ген, или оба для облегчения идентификации и селекции экспрессирующих клеток из популяции клеток, которую пытались трансфицировать или инфицировать вирусными векторами. В других аспектах селектируемый маркер может переноситься на отдельном участке ДНК, и его используют в процедуре совместной трансфекции. Селектируемые маркеры и репортерные гены можно фланкировать подходящими регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии в клетках-хозяевах. Пригодные селектируемые маркеры включают, например, гены устойчивости к антибиотику, такие как neo и т.п.

Репортерные гены используют для идентификации вероятно трансфицированных клеток и для оценки функциональности регуляторных последовательностей. В основном, репортерный ген представляет собой ген, который не содержится или не экспрессируется реципиентным организмом или тканью и который

кодирует полипептид, экспрессия которого проявляется посредством любого легко детектируемого свойства, например, ферментативной активности. Экспрессию репортерного гена оценивают в подходящий момент времени после введения ДНК в клетки-реципиенты. Подходящие репортерные гены могут включать гены, кодирующие ген люциферазы, бета-галактозидазы, хлорамфеникол-ацетилтрансферазы, секретируемой щелочной фосфатазы или зеленого флуоресцентного белка (например, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters, 479: 79-82). Подходящие экспрессирующие системы хорошо известны, и их можно получать известными способами или получать коммерчески. В основном, конструкцию с минимальной 5'-фланкирующей областью, для которой демонстрируют наиболее высокий уровень экспрессии репортерного гена, идентифицируют как промотор. Такие области промотора можно связывать с репортерным геном и использовать для оценки средств на способность модулировать направляемую промотором транскрипцию.

В одном из вариантов осуществления вектор может дополнительно содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую второй CAR, например, второй NKR-CAR, TCAR, или ингибирующий CAR. В одном из вариантов осуществления второй CAR содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с антигеном-мишенью, например, опухолевым антигеном, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления антиген, связанный первым CAR, представляет собой тот же антиген, который связывает второй CAR. Альтернативно, антиген, связываемый первым CAR, представляет собой антиген отличный от того, который связывает второй CAR. Например, первый CAR связывается с мезотелином, тогда как второй CAR связывается с другим опухолевым антигеном или антигеном, присутствующим на нормальной клетке.

В одном из вариантов осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую NKR-CAR, описываемый в настоящем описании, и нуклеиновую кислоту, кодирующую TCAR. В одном из вариантов осуществления TCAR содержит антигенсвязывающий домен, который связывает опухолевый антиген, например, опухолевый антиген, отличный от того, который связывает NKR-CAR. В одном из вариантов осуществления TCAR содержит антигенсвязывающий домен,

трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, где внутриклеточный сигнальный домен содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен, описываемый в настоящем описании, например, CD3-дзета или предоставленный в таблице 2, и необязательно один или более костимулирующих сигнальных домена, описываемых в настоящем описании, например, 4-1BB, CD28, CD27, ICOS или предоставленный в таблице 3.

В одном из вариантов осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую NKR-CAR, описываемый в настоящем описании, и нуклеиновую кислоту, кодирующую ингибирующий CAR. В одном из вариантов осуществления ингибирующий CAR содержит антигенсвязывающий домен, который связывает антиген, встречающийся на нормальных клетках, но не на злокачественных клетках, например, нормальных клетках, которые экспрессируют антиген, распознаваемый NKR-CAR. В одном из вариантов осуществления ингибирующий CAR содержит антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен ингибирующей молекулы. Например, внутриклеточный домен ингибирующего CAR может представлять собой внутриклеточный домен PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC I класса, MHC II класса, GAL9, аденозин и TGFR бета.

В вариантах осуществления вектор может содержать две или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, например, NKR-CAR, описываемый в настоящем описании, и второй CAR, например, второй NKR-CAR, ингибирующий CAR, или TCAR, который специфически связывается с антигеном, отличным от антигена, распознаваемого первым NKR-CAR. В таких вариантах осуществления две или более последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующие CAR, кодируются одной молекулой нуклеиновой кислоты в той же рамке считывания и в виде одной полипептидной цепи. В этом аспекте два или более CAR могу, например, быть разделенными одним или более участками расщепления пептида

(например, участком ауторасщепления или субстратом для внутриклеточной протеазы).

В вариантах осуществления вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую описываемый NKR-CAR, может дополнительно содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую адапторную молекулу. В таких вариантах осуществления две или более последовательности нуклеиновой кислоты, кодируются одной молекулой нуклеиновой кислоты в той же рамке считывания и в виде одной полипептидной цепи. В этом варианте осуществления NKR-CAR и адапторная молекула могут быть разделены одним или более участками расщепления пептида (например, участком ауторасщепления или субстратом для внутриклеточной протеазы), где NKR-CAR, адапторная молекула и участок расщепления пептида находятся в той же рамке считывания и кодируются в виде одной полипептидной цепи.

Примеры участков расщепления пептида включают следующие ниже, где остатки GSG являются необязательными:

T2A: (GSG) EGRGSLLTCGDVEENPGP (SEQ ID NO: 57)

P2A: (GSG) ATNFSLLKQAGDVEENPGP (SEQIDNO: 58)

E2A: (GSG) QCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQIDNO: 59)

F2A: (GSG) VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (SEQIDNO: 60)

Способы введения и экспрессии генов в клетке известны в данной области. В отношении экспрессирующего вектора вектор можно легко вводить в клетку-хозяина, например, клетку млекопитающего, бактериальную клетку, дрожжевую клетку или клетку насекомого любым способом в данной области. Например, экспрессирующий вектор можно переносить в клетку-хозяина физическими, химическими или биологическими способами.

Полинуклеотиды можно вводить в клетки-мишени любым из ряда разлиных способов, например, коммерчески доступными способами, которые включают, но не ограничиваются ими, электропорацию (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) или Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator (Eppendort, Hamburg Germany), опосредованную катионными липосомами

трансфекцию с использованием липофекции, инкапсуляции в полимеры, опосредованной пептидом трансфекции или системы доставки на основе биолистических частиц, таких как "генные пушки" (см., например, Nishikawa et al., Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001).

Физические способы введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают осаждение фосфатом кальция, липофекцию, бомбардировку частицами, микроинъекцию, электропорацию и т.п. Способы получения клетки, содержащей векторы и/или экзогенные нуклеиновые кислоты, хорошо известны в данной области. См., например, Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY).

Биологические способы введения представляющего интерес полинуклеотида в клетку-хозяина включают использование ДНК- и РНК-векторов. Вирусные векторы и особенно ретровирусные векторы стали наиболее широко используемым способом вставки генов в клетки млекопитающих, например, клетки человека. Другие вирусные векторы можно получать из лентивируса, поксвирусы, вирус простого герпеса I, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы и т.п. См., например, патенты США № 5350674 и 5585362.

Химические средства введения полинуклеотида в клетку-хозяина включают коллоидные дисперсные системы, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии "масло-в-воде", мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы. Иллюстративная коллоидная система для применения в качестве носителя для доставки *in vitro* и *in vivo* представляет собой липосому (например, искусственную мембранную везикулу).

В случае, когда используют систему доставки не на основе вируса, иллюстративный носитель для доставки представляет собой липосому. Для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*) предусматривают использование липидных составов. В другом аспекте нуклеиновая кислота может являться связанной с липидом. Нуклеиновую кислоту, связанную с липидом, можно инкапсулировать в водном содержимом липосомы, рассеянном в липидном бислое липосомы, связанном с липосомой

посредством связывающей молекулы, которая является связанной с липосомой и олигонуклеотидом, заключенном в липосоме, в комплексе, образуемым с липосомой, диспергированном в растворе, содержащем липид, смешанном с липидом, объединенным с липидом, содержащемся в виде суспензии в липиде, содержащемся или образующим комплекс с мицеллой, или иным образом связанным с липидом. Связанные с липидом, липидом/ДНК или липидом/экспрессирующим вектором композиции не ограничены какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут содержаться в бислойной структуре в виде мицелл или со "свернутой" структурой. Они также могут просто являться диспергированными в растворе, возможно, образуя агрегаты, которые не являются однородными по размеру или форме. Липиды представляют собой жировые вещества, которые могут являться природными или синтетическими липидами. Например, липиды включают жировые капли, которые естественным образом возникают в цитоплазме, а также класс соединений, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные, такие как жирные кислоты, спирты, амины, амино спирты и альдегиды.

Пригодные для использования липиды можно получать из коммерческих источников. Например, димиристилфосфатидилхолин ("DMPC") можно получать от Sigma, St. Louis, MO; дицетилфосфат ("DCP") можно получать от K and K Laboratories (Plainview, NY); холестерин ("Choi") можно получать от Calbiochem-Behring; димиристилфосфатидилглицерин ("DMPG") и другие липиды можно получать от Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL.). Исходные растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле можно хранить приблизительно при -20°C. В качестве растворителя используют только хлороформ, т.к. он намного быстрее испаряется, чем метанол. "Липосома" представляет собой общий термин, включающий ряд однослойных и многослойных липидных носителей, образованных поколением закрытых липидных бислойных структур или агрегатов. Липосомы можно характеризовать как имеющие везикулярные структуры с фосфолипидной бислойной мембраной и

внутренней водной средой. Многослойные липосомы содержат множественные липидные слои, разделенные водной средой. Они формируются спонтанно, когда фосфолипиды суспендируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты претерпевают перегруппировку перед тем, как образовывать закрытые структуры и захватывать воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991 Glycobiology, 5: 505-10). Однако также предусмотрены композиции, которые содержат различные структуры в растворе, отличные от обычной везикулярной структуры. Например, липиды могут допускать мицеллярную структуру или существовать только в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также предусматривают комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота.

Независимо от способа, используемого для введения экзогенных нуклеиновых кислот в клетку-хозяина или иным образом подвергание клетки действию ингибитора по настоящему изобретению, для подтверждения присутствия последовательности рекомбинантной ДНК в клетке-хозяине можно проводить ряд анализов. Такие анализы включают, например, "молекулярные биологические" анализы, хорошо известные специалистам в данной области, такие как "саузерн"- и "нозерн"-блоттинг, ОТ-ПЦР и ПЦР; "биохимические" анализы, такие как детектирование присутствия или отсутствия конкретного пептида, например, иммунологическими способами (виды ELISA и вестерн-блоттинг) или анализами, описываемыми в настоящем описании для идентификации средств, входящих в объем изобретения.

Настоящее изобретение дополнительно относится к вектору, содержащему кодирующую CAR молекулу нуклеиновой кислоты. В одном из аспектов вектор CAR можно непосредственно трансдуцировать в клетку, например, эффекторную клетку иммунной системы, например, Т-клетку или NK-клетку. В одном из аспектов вектор представляет собой клонирующий или экспрессирующий вектор, например, вектор, включая, но, не ограничиваясь ими, одну или более плазмидных (например, экспрессионных плазмид, клонирующих векторов, миниколец, минивекторов, двойных микрохромосом), ретровирусных и лентивирусных векторных конструкций. В одном из аспектов вектор

способен экспрессировать конструкцию CAR в эффекторных клетках иммунной системы млекопитающих, например, Т-клетках млекопитающих или NK-клетках млекопитающих. В одном из аспектов Т-клетка млекопитающего представляет собой Т-клетку человека.

Трансфекция РНК

В настоящем описании раскрыты способы получения транскрибируемой *in vitro* РНК CAR, например, РНК NKR-CAR. Настоящее изобретение также относится к конструкции РНК, кодирующей NKR-CAR, которую можно непосредственно трансфицировать в клетку. В одном из вариантов осуществления конструкция РНК, кодирующей NKR-CAR, дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей TCAR, описываемый в настоящем описании. Способ получения иРНК для применения в трансфекции может включать транскрипцию (IVT) матрицы *in vitro* со специально конструируемыми праймерами с последующим добавлением полиА с получением конструкции, содержащей нетранслируемую 3'- и 5'-последовательность ("UTR"), 5'-кэп и/или внутренний участок связывания рибосомы (IRES), нуклеиновую кислоту, которую необходимо экспрессировать, и хвост поли(А), как правило, длиной 50-2000 оснований (SEQ ID NO: 35). Получаемой таким образом РНК можно эффективно трансфицировать различные виды клеток. В одном из аспектов матрица содержат последовательности NKR-CAR.

В одном из аспектов NKR-CAR кодируется информационной РНК (иРНК). В одном из аспектов иРНК, кодирующую NKR-CAR, вводят в Т-клетку для получения NKR-CAR клетки. В одном из аспектов иРНК, кодирующую NKR-CAR, вводят в NK-клетку для получения NKR-CAR клетки.

В одном из вариантов осуществления транскрибируемую *in vitro* РНК NKR-CAR можно вводить в клетке в форме транзиторной трансфекции. РНК получают транскрипцией *in vitro* с использованием получаемой полимеразной цепной реакцией (ПЦР) матрицы. Представляющую интерес ДНК из любого источника можно непосредственно преобразовывать посредством ПЦР в матрицу для синтеза *in vitro* иРНК с использованием подходящих праймеров и РНК-полимеразы. Источник ДНК может представлять собой, например,

геномную ДНК, плазмидную ДНК, фаговую ДНК, кДНК, синтетическую последовательность ДНК или любой другой подходящий источник ДНК. В одном из вариантов осуществления желаемая матрица для транскрипции *in vitro* представляет собой NKR-CAR по настоящему изобретению. Например, матрица для РНК NKR-CAR содержит внеклеточную область, содержащую одноцепочечный вариабельный домен антитела против опухоли; шарнирную область, трансмембранный домен (например, трансмембранный домен KIR). В одном из вариантов осуществления желаемая матрица для транскрипции *in vitro* содержит KIR-CAR и DAP12 на отдельных матрицах. В одном из вариантов осуществления желаемая матрица для транскрипции *in vitro* содержит KIR-CAR и DAP12 на той же матрице. Матрица для DAP12 содержит трансмембранный домен и внутриклеточную область.

В одном из вариантов осуществления транскрибируемую *in vitro* РНК NKR-CAR можно вводить в клетке в форме транзиторной трансфекции. РНК получают транскрипцией *in vitro* с использованием получаемой полимеразной цепной реакцией (ПЦР) матрицы. Представляющую интерес ДНК из любого источника можно непосредственно преобразовывать посредством ПЦР в матрицу для синтеза *in vitro* иРНК с использованием подходящих праймеров и РНК-полимеразы. Источник ДНК может представлять собой, например, геномную ДНК, плазмидную ДНК, фаговую ДНК, кДНК, синтетическую последовательность ДНК или любой другой подходящий источник ДНК. В одном из вариантов осуществления желаемая матрица для транскрипции *in vitro* представляет собой NKR-CAR по настоящему изобретению. Например, матрица для РНК NKR-CAR содержит внеклеточную область, содержащую одноцепочечный вариабельный домен антитела против опухоли; шарнирную область, трансмембранный домен (например, трансмембранный домен KIR). В одном из вариантов осуществления желаемая матрица для транскрипции *in vitro* содержит KIR-CAR и DAP12 на отдельных матрицах. В одном из вариантов осуществления желаемая матрица для транскрипции *in vitro* содержит KIR-CAR и DAP12 на той же матрице. Матрица для DAP12 содержит трансмембранный домен и внутриклеточную область.

В одном из вариантов осуществления ДНК, которую необходимо использовать для ПЦР, содержит открытую рамку считывания. ДНК может являться из природной последовательности ДНК из генома организма. В одном из вариантов осуществления нуклеиновая кислота может содержать некоторые или все 5'- и/или 3'-нетранслируем области (UTR). Нуклеиновая кислота может содержать экзоны и интроны. В одном из вариантов осуществления ДНК, которую необходимо использовать для ПЦР, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты человека. В другом варианте осуществления ДНК, которую необходимо использовать в для ПЦР, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты человека, содержащую 5'- и 3'-UTR. Альтернативно, ДНК может представлять собой искусственную последовательность ДНК, которая обычно не экспрессируется в природном организме. Иллюстративная искусственная последовательность ДНК представляет собой последовательность ДНК, которая содержит участки генов, которые являются легированными друг с другом с образованием открытой рамки считывания, кодирующей слитый белок. Участки ДНК, которые являются легированными друг с другом могут происходить от одного организма или от более чем одного организма.

ПЦР используют для получения матрицы для транскрипции *in vitro* иРНК, которую используют для трансфекции. Способы проведения ПЦР хорошо известны в данной области. Праймеры для применения в ПЦР конструируют так, чтобы они содержали области, которые являются по существу комплементарными областям ДНК, которую необходимо использовать в качестве матрицы для ПЦР. "По существу комплементарная", как используют в настоящем описании, относится к последовательности нуклеотидов, где большая часть или все основания в последовательности праймера являются комплементарными, или одно или более оснований не являются комплементарными или несовпадающими. По существу комплементарные последовательности способны отжигаться или гибридизоваться с предполагаемой ДНК-мишенью в условиях отжига, используемых для ПЦР. Праймеры можно конструировать так, чтобы они являлись по существу комплементарными к любому участку ДНК-матрицы. Например, праймеры можно конструировать для амплификации участка

нуклеиновой кислоты, который обычно транскрибируется в клетках (открытая рамка считывания), включая 5'- и 3'-UTR. Праймеры также можно конструировать для амплификации участка нуклеиновой кислоты, кодирующего конкретный представляющий интерес домен. В одном из вариантов осуществления праймеры конструируют для амплификации кодирующей области кДНК человека, включая полностью или участки 5'- и 3'-UTR. Праймеры, пригодные для ПЦР, можно получать способами синтеза, которые хорошо известны в данной области. "Прямые праймеры" представляют собой праймеры, которые содержат область нуклеотидов, которые являются по существу комплементарными нуклеотидам на ДНК-матрице, которые располагаются в 3'-5' направлении последовательности ДНК, которую необходимо амплифицировать. "3'-5' направление" применяют в настоящем описании для обозначения участка 5 к последовательности ДНК, которую необходимо амплифицировать, относительно кодирующей нити. "Обратные праймеры" представляют собой праймеры, которые содержат область нуклеотидов, которые являются по существу комплементарными матрице двухцепочечной ДНК, которая располагается в 3'-5' направлении от последовательности ДНК, которую необходимо амплифицировать. "3'-5' направление" применяют в настоящем описании для обозначения участка 3' к последовательности ДНК, которую необходимо амплифицировать, относительно кодирующей нити.

В способах, описываемых в настоящем описании, можно использовать любую ДНК-полимеразу, пригодную для ПЦР. Реагенты и полимераза являются коммерчески доступными из ряда источников.

Также можно использовать химические структуры со способностью обеспечивать стабильность и/или эффективность трансляции. Предпочтительно РНК содержит 5'- и 3'-UTR. В одном из вариантов осуществления длина 5'-UTR составляет от одного до 3000 нуклеотидов. Длину последовательностей 5'- и 3'-UTR, которые необходимо добавлять к кодирующей области, можно изменять различными способами, включая, но, не ограничиваясь ими, конструирование праймеров для ПЦР, которые отжигаются на различных областях UTR. С использованием этого подхода, специалист в данной области может модифицировать длины 5'- и 3'-

UTR, необходимые для получения оптимальной эффективности трансляции после трансфекции нетранскрибируемой РНК.

5'- и 3'-UTR могут представлять собой природные, эндогенные 5'- и 3'-UTR для представляющих интерес нуклеиновых кислот. Альтернативно, последовательности UTR, которые не являются эндогенными по отношению к представляющей интерес нуклеиновой кислоте, можно добавлять введением последовательностей UTR в прямые и обратные праймеры или любой другой модификацией матрицы. Использование последовательностей UTR, которые не являются эндогенными по отношению к представляющей интерес нуклеиновой кислоте, могут являться пригодными для модификации стабильности и/или эффективности трансляции РНК. Например, известно, что богатые AU элементы в последовательностях 3'-UTR могут снижать стабильность иРНК. Таким образом, можно выбирать или конструировать 3'-UTR для повышения стабильности транскрибируемой РНК на основании свойств UTR, которые хорошо известны в данной области.

В одном из вариантов осуществления 5'-UTR могут содержать Последовательность Козак эндогенной нуклеиновой кислоты. Альтернативно, когда 5'-UTR, которая не является эндогенной по отношению к представляющей интерес нуклеиновой кислоте, добавляют в ПЦР, как описано выше, консенсусную последовательность Козак можно реконструировать добавлением последовательности 5'-UTR. Последовательности Козак могут увеличивать эффективность трансляции некоторых транскриптов РНК, но, по-видимому, не являются необходимыми для всех РНК для обеспечения эффективной трансляции. Требования к последовательности Козак для многих иРНК известны в данной области. В других вариантах осуществления 5'-UTR может представлять собой 5'-UTR РНК-вируса, РНК-геном которого является стабильным в клетках. В других вариантах осуществления можно использовать различные аналоги нуклеотидов в 3'- или 5'-UTR для блокирования эндонуклеазного разрушения иРНК.

Для обеспечения синтеза РНК из ДНК-матрицы без необходимости клонирования генов, промотор транскрипции необходимо присоединять к ДНК-матрице выше последовательностей,

которые необходимо транскрибировать. Когда последовательность, которая функционирует как промотор для РНК-полимеразы, добавляют к 5'-концу прямого праймера, промотор РНК-полимеразы становится включенным в продукт ПЦР выше открытой рамки считывания, которая должна транскрибироваться. В одном предпочтительном варианте осуществления промотор представляет собой промотор полимеразы T7, как описано в другом месте в настоящем описании. Другие пригодные промоторы включают, но не ограничиваются ими, промоторы РНК-полимеразы T3 и SP6. Консенсусные нуклеотидные последовательности для промоторов T7, T3 и SP6 известны в данной области.

В предпочтительном варианте осуществления иРНК содержит кэп на 5'-конце и 3'-хвост поли(A), которые определяет связывание рибосом, начало трансляции и стабильность иРНК в клетке. На циркулирующей ДНК-матрице, например, плазмидной ДНК РНК-полимераза продуцирует большой конкатамерный продукт, который не является подходящим для экспрессии в эукариотических клетках. Транскрипция плазмидной ДНК, линеризованной на конце 3'-UTR приводит к иРНК нормального размера, которая не является эффективной в эукариотической трансфекции, даже если она является полиаденилированной после транскрипции.

На линейной ДНК-матрице фаговая РНК-полимераза T7 может удлинять 3'-конец транскрипта после последнего основания матрицы (Schenborn and Mierendorf, Nuc. Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003).

Общепринятым способом исследования удлинений поли-A/T в ДНК-матрице является молекулярное клонирование. Однако последовательность поли-A/T, интегрированная в плазмидную ДНК, может вызывать нестабильность плазмиды, именно поэтому плазмидные ДНК-матрицы, получаемые из бактериальных клеток часто являются сильно загрязненными делециями и другими аберрациями. Это приводит к тому, что способы клонирования являются не только трудоемкими и времязатратными, но часто и ненадежными. Поэтому способ, который обеспечивает возможность конструирования ДНК-

матриц без 3'-удлинения поли-A/T без клонирования является очень желаемым.

Сегмент поли-A/T транскрипционной ДНК-матрицы можно получать во время ПЦР с использованием обратного праймера, содержащего хвост поли-T, такой как хвост 100T (SEQ ID NO: 31) (размер может составлять 50-5000T (SEQ ID NO: 32)), или после ПЦР любым другим способом, включая, но, не ограничиваясь ими, лигирование ДНК или рекомбинацию *in vitro*. Хвосты поли(A) также обеспечивают стабильность РНК и снижают ее разрушение. Как правило, длина хвоста поли(A) положительно коррелирует со стабильностью транскрибируемой РНК. В одном из вариантов осуществления хвост поли(A) составляет от 100 до 5000 аденозинов (SEQ ID NO: 33).

Хвосты поли(A) РНК можно дополнительно удлинять после транскрипции *in vitro* с использованием поли(A)-полимеразы, такой как поли(A)-полимераза *E. coli* (E-PAP). В одном из вариантов осуществления увеличение длины хвоста поли(A) из 100 нуклеотидов до от 300 до 400 нуклеотидов (SEQ ID NO: 34) приводит приблизительно к двукратному увеличению эффективности трансляции РНК. Кроме того, присоединение различных химических групп к 3'-концу может увеличивать стабильность иРНК. Такое присоединение может содержать модифицированные/искусственные нуклеотиды, аптамеры и другие соединения. Например, в хвост поли(A) можно вводит аналоги ATP с использованием поли(A)-полимеразы. Аналоги ATP могут дополнительно повышать стабильность РНК.

5'-кэпы также обеспечивают стабильность молекул РНК. В предпочтительном варианте осуществления РНК, получаемая способами, описываемыми в настоящем описании, содержит 5'-кэп. 5'-кэп получают известными в данной области и описываемыми в настоящем описании способами (Cougot et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

РНК, получаемая способами, описываемыми в настоящем описании, также может содержать последовательность внутреннего участка связывания рибосомы (IRES). Последовательность IRES

может представлять собой любую вирусную, хромосомную или искусственную последовательность, которая инициирует независимое от кэп связывание рибосомы с иРНК и облегчает начало трансляции. Можно включать любые растворенные вещества, подходящие для электропорации клетки, которые могут содержать факторы, облегчающие клеточную проницаемость и жизнеспособность, такие как сахара, пептиды, липиды, белки, антиоксиданты и поверхностно-активные вещества.

РНК можно вводить в клетки-мишени любым из ряда различных способов, например, коммерчески доступных способов, которые включают, но не ограничиваются ими, электропорацию (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) или Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator (Eppendort, Hamburg Germany), опосредованную катионными липосомами трансфекцию с использованием липофекции, инкапсуляции в полимеры, модифицированной пептидами трансфекции или систем доставки на основе биолистических частиц, такие как "генная пушка" (см., например, Nishikawa et al., Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001).

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие желаемые молекулы, можно получать рекомбинантными способами, известными в данной области, такими как, например, скринингом библиотек из клеток, экспрессирующих ген, получением гена из вектора, который, как известно, содержит его, или выделением непосредственно из клеток и тканей, содержащих его стандартными способами. Альтернативно, представляющий интерес ген можно получать синтезом, а не клонированием.

Способы доставки не на основе вирусов

В некоторых аспектах для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, например, NKR-CAR или TCAR, описываемый в настоящем описании, в клетку или ткань, или индивидууму можно использовать способы не на основе вирусов.

В некоторых вариантах осуществления способ не на основе вирусов включает использование транспозона (также называемого транспозируемого элемента). В некоторых вариантах осуществления транспозон представляет собой часть ДНК, которая может

встраиваться сама по себе в участок в геноме, например, часть ДНК, которая способна самореплицироваться и встраивать свою копию в геном, или часть ДНК, которая может вырезаться из более длинной нуклеиновой кислоты и встраиваться в другое место в геноме. Например, транспозон содержит последовательность ДНК, состоящую из инвертированных повторов, фланкирующих гены для транспозиции.

Иллюстративные способы доставки нуклеиновой кислоты с использованием транспозон включают систему транспозонов "Спящая красавица" (Sleeping Beauty) (SBTS) и систему транспозонов PiggyBac (PB). См., например, Aronovich et al., Hum. Mol. Genet., 20.R1(2011):R14-20; Singh et al., Cancer Res., 15(2008):2961-2971; Huang et al., Mol. Ther., 16(2008):580-589; Grabundzija et al., Mol. Ther., 18(2010):1200-1209; Kebriaei et al., Blood. 122.21(2013):166; Williams, Molecular Therapy, 16.9(2008):1515-16; Bell et al., Nat. Protoc., 2.12(2007):3153-65 и Ding et al., Cell, 122.3(2005):473-83, которые все включены в настоящее описание посредством ссылки.

SBTS включает два компонента: 1) транспозон, содержащий трансген, и 2) источник фермента транспозазы. Транспозаза может перемещать транспозон из плазмиды носителя (или другой донорной ДНК) в ДНК-мишень, такую как хромосома/геном клетки-хозяина. Например, транспозаза связывается с плазмидой носителем/донорной ДНК, вырезает транспозон (содержащий трансген(ы)) из плазмиды и вводит его в геном клетки-хозяин. См., например, Aronovich et al. выше.

Иллюстративные транспозоны включают транспозон на основе pT2. См., например, Grabundzija et al., Nucleic Acids Res., 41,3(2013):1829-47 и Singh et al., Cancer Res. 68,8(2008): 2961-2971, которые все включены в настоящее описание посредством ссылки. Иллюстративные транспозазы включают транспозазу типа Tc1/mariner, например, транспозазу SB10 или транспозазу SB11 (высокоактивную транспозазу, которую можно экспрессировать, например, из промотор цитомегаловируса). См., например, Aronovich et al.; Kebriaei et al. и Grabundzija et al., которые все включены в настоящее описание посредством ссылки.

Использование SBTS обеспечивает эффективную интеграцию и экспрессию трансгена, например, нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, описываемый в настоящем описании. В настоящем описании раскрыты способы получения клетки, например, Т-клетки или NK-клетки, которая стабильно экспрессирует CAR, описываемый в настоящем описании, например, с использованием системы транспозонов, такой как SBTS.

В соответствии со способами, описываемыми в настоящем описании, в некоторых вариантах осуществления одна или более нуклеиновых кислот, например, плазмид, содержащих компоненты SBTS, поставляют в клетку (например, Т- или NK-клетку). Например, нуклеиновая кислота(ы) доставляют стандартными способами доставки нуклеиновой кислоты (например, плазмидной ДНК), например, способами, описываемыми в настоящем описании, например, электропорацией, трансфекцией или липофекцией. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит транспозон, содержащий трансген, например, нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, описываемый в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота сдержит транспозон, содержащий трансген (например, нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, описываемый в настоящем описании), а также последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент транспозазу. Другие варианты осуществления относятся к системе с двумя нуклеиновыми кислотами, например, систему на основе двойных плазмид, например, где первая плазмида содержит транспозон, содержащий трансген, и вторая плазмида содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую фермент транспозазу. Например, первая и вторая нуклеиновые кислоты доставляют совместно в клетку-хозяина.

В некоторых вариантах осуществления получают клетки, например, Т- или NK-клетки, которые экспрессируют CAR, описываемый в настоящем описании, с использованием комбинации вставки гена с использованием SBTS и генного редактирования с использованием нуклеазы (например, нуклеаз цинковые пальцы (ZFN), эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции

(TALEN), системы CRISPR/Cas или сконструированных мегануклеаз реконструированных хоминг-эндонуклеаз).

В некоторых вариантах осуществления использование способа доставки не на основе вирусов позволяет репрограммировать клетки, например, Т- или NK-клетки, и непосредственно вводить клетки индивидууму. Преимущества невирусных векторов включают, но не ограничиваются ими, простоту и относительно низкую стоимость получения достаточных количеств, необходимых для соответствия популяции пациентов, стабильность во время хранения и отсутствие иммуногенности.

В случае, когда используют систему доставки не на основе вируса, иллюстративный носитель для доставки представляет собой липосому. Для введения нуклеиновых кислот в клетку-хозяина (*in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*) предусматривают использование липидных составов. В другом аспекте нуклеиновая кислота может являться связанной с липидом. Нуклеиновую кислоту, связанную с липидом, можно инкапсулировать в водном содержимом липосомы, рассеянном в липидном бислое липосомы, связанном с липосомой посредством связывающей молекулы, которая является связанной с липосомой и олигонуклеотидом, заключенном в липосоме, в комплексе, образуемым с липосомой, диспергированном в растворе, содержащем липид, смешанном с липидом, объединенным с липидом, содержащемся в виде суспензии в липиде, содержащемся или образующим комплекс с мицеллой, или иным образом связанным с липидом. Связанные с липидом, липидом/ДНК или липидом/экспрессирующим вектором композиции не ограничены какой-либо конкретной структурой в растворе. Например, они могут содержаться в бислойной структуре в виде мицелл или со "свернутой" структурой. Они также могут просто являться диспергированными в растворе, возможно, образуя агрегаты, которые не являются однородными по размеру или форме. Липиды представляют собой жировые вещества, которые могут являться природными или синтетическими липидами. Например, липиды включают жировые капли, которые естественным образом возникают в цитоплазме, а также класс соединений, которые содержат длинноцепочечные алифатические углеводороды и их производные,

такие как жирные кислоты, спирты, амины, амино спирты и альдегиды.

Пригодные для использования липиды можно получать из коммерческих источников. Например, димиристилфосфатидилхолин ("DMPC") можно получать от Sigma, St. Louis, MO; дицетилфосфат ("DCP") можно получать от K and K Laboratories (Plainview, NY); холестерин ("Choi") можно получать от Calbiochem-Behring; димиристилфосфатидилглицерин ("DMPG") и другие липиды можно получать от Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL.). Исходные растворы липидов в хлороформе или хлороформе/метаноле можно хранить приблизительно при -20°C. В качестве растворителя используют только хлороформ, т.к. он намного быстрее испаряется, чем метанол. "Липосома" представляет собой общий термин, включающий ряд однослойных и многослойных липидных носителей, образованных поколением закрытых липидных бислойных структур или агрегатов. Липосомы можно характеризовать как имеющие везикулярные структуры с фосфолипидной бислойной мембраной и внутренней водной средой. Многослойные липосомы содержат множественные липидные слои, разделенные водной средой. Они формируются спонтанно, когда фосфолипиды суспендируют в избытке водного раствора. Липидные компоненты претерпевают перегруппировку перед тем, как образовывать закрытые структуры и захватывать воду и растворенные вещества между липидными бислоями (Ghosh et al., 1991 Glycobiology, 5: 505-10). Однако также предусмотрены композиции, которые содержат различные структуры в растворе, отличные от обычной везикулярной структуры. Например, липиды могут допускать мицеллярную структуру или существовать только в виде неоднородных агрегатов липидных молекул. Также предусматривают комплексы липофектамин-нуклеиновая кислота.

Источники клеток

Перед размножением и генетической модификацией от индивидуума получают источник клеток (например, эффекторных клеток иммунной системы, например, Т-клеток или NK-клеток). Термин "индивидуум" предназначен включать живые организмы, у

которых можно вызывать иммунный ответ, (например, млекопитающих). Примеры индивидуумов включают людей, собак, кошек, мышей, крыс и их трансгенные виды. Т-клетки можно получать из ряда источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови, костный мозг, ткань лимфоузла, пуповинную кровь, ткань тимуса, ткань из участка инфекции, асцит, плевральный выпот, ткань селезенки и опухоли.

В определенных вариантах настоящего изобретения можно использовать любое число линий эффекторных клеток иммунной системы (например, Т-клеток или NK-клеток), доступных в данной области. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения Т-клетки можно получать из единицы крови, собираемой у индивидуума с использованием любого количества техник, известных специалисту в данной области, таких как разделение Ficoll™. В одном из предпочтительных вариантов оссуществления клетки из циркулирующей крови индивидуума получают посредством афереза. Продукт афереза, как правило, содержит лимфоциты, включая Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. В одном из вариантов осуществления клетки, собираемые аферезом, можно промывать для удаления фракции плазмы и помещать клетки в подходящий буфер или среду для последующих этапов обработки. В одном из аспектов изобретения клетки промывают фосфатно-солевым буфером (PBS). В альтернативном варианте осуществления промывной раствор не содержит кальций и может не содержать магний, или может не содержать многие, если не все двухвалентные катионы. Начальные этапы активации при отсутствии кальция приводят к увеличенной активации. Как будет легко понять специалистам в данной области этап промывания можно проводить способами, известными специалистам в данной области, такими как с использованием полуавтоматический "проточной" центрифуги (например, устройства для обработки клеток Cobe 2991, Baxter CytoMate или Haemonetics Cell Saver 5) по инструкциям производителя. После промывания клетки можно ресуспендировать в различных биосовместимых буферах, таких как, например, не

содержащих Ca, не содержащих Mg PBS, PlasmaLyte A или другой физиологический раствор с буфером или без него. Альтернативно, можно удалять нежелательные компоненты образца афереза и непосредственно ресуспендировать клетки в средах для культивирования.

Установлено, что в способах применения можно использовать условия среды для культивирования, предусматривающие 5% или менее, например, 2%, сыворотки AB человека и применять известные условия среды для культивирования и композиции, например, такие, как описанные у Smith et al., "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement", Clinical and Translational Immunology (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31.

В другом варианте осуществления Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови посредством лизиса эритроцитов и истощения моноцитов, например, центрифугированием в градиенте PERCOLLTM или проточным элютриационным центрифугированием. Можно дополнительно выделять конкретную подпопуляцию Т-клеток, таких как CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+ и CD45RO+ Т-клетки, способами положительной или отрицательной секлекции. Например, в одном из вариантов осуществления Т-клетки выделяют посредством инкубации с конъюгированными с антителом против CD3/против CD28 (например, 3×28) гранулами, такими как DYNABEADS® M-450 CD3/CD28T, в течение периода времени, достаточного для положительной селекции желаемых Т-клеток. В одном из вариантов осуществления период времени составляет приблизительно 30 минут. В дополнительном варианте осуществления период времени находится в диапазоне от 30 минут до 36 часов или больше и всех целочисленных значений в этом диапазоне. В дополнительном варианте осуществления период времени составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 6 часов. В еще одном другом предпочтительном варианте осуществления период времени составляет от 10 до 24 часов. В одном из аспектов период времени инкубации составляет 24 часа. Для выделения Т-клеток у пациентов с лейкозом использование более продолжительных периодов инкубации, таких

как 24 часа, может повышать выход клеток. Можно использовать большее время инкубации для выделения Т-клеток в любой ситуации, когда существует несколько Т-клеток по сравнению с другими типами клеток, как при выделении проникающих в опухоль лимфоцитов (TIL) из опухолевой ткани или у индивидуумов с ослабленным иммунитетом. Кроме того, использование большего времени инкубации может увеличивать эффективность захвата CD8+Т-клеток. Таким образом, простым сокращением или увеличением времени можно обеспечивать связывание Т-клеток с гранулами CD3/CD28 и/или увеличением или уменьшением отношения гранул к Т-клеткам (как описано дополнительно в настоящем описании) подпопуляции Т-клеток можно предпочтительно отбирать на или против в момент начала культивирования или в любые другие моменты времени во время процесса. Кроме того, увеличением или уменьшением отношения антитела против CD3 и/или антитела против CD28 на гранулах или другой поверхности подпопуляции Т-клеток можно предпочтительно отбирать на или против в момент начала культивирования или в другие желаемые моменты времени. Специалисту в данной области будет понятно, что в контексте настоящего изобретения также можно использовать многие этапы селекции. В определенных вариантах осуществления желательным может являться проведение способа селекции и использование "неотобранных" клеток в способе активации и размножении. "Неотобранные" клетки также можно подвергать дополнительным этапам селекции.

Обогащение популяции Т-клеток отрицательной селекцией можно проводить с использованием комбинации антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для отрицательно селектируемых клеток. Один из способов представляет собой сортировку и/или селекцию клеток посредством отрицательной магнитной иммунной адгезии или проточной цитометрии, в которой используют смесь моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на клетках, подвергаемых отрицательной селекции. Например, для обогащения $CD4^+$-клетками отрицательной селекцией смесь моноклональных антител, как правило, содержит антитела против CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-

DR и CD8. В определенных вариантах осуществления желательным может являться обогащение или положительная селекция регуляторных Т-клеток, которые, как правило, экспрессируют $CD4^+$, $CD25^+$, $CD62L^{hi}$, $GITR^+$ и $FoxP3^+$. Альтернативно, в определенных вариантах осуществления регуляторные Т-клетки истощают посредством гранул, конъюгированных с антителами против C25, или другим аналогичным способом селекции.

Способы, описываемые в настоящем описании, могут включать, например, селекцию конкретной подпопуляции эффекторных клеток иммунной системы, например, Т-клеток, которые представляют собой популяция истощенных Т-регуляторных клеток, CD25+ истощенных клеток, с использованием, например, способа отрицательной селекции, например, описываемого в настоящем описании. Предпочтительно популяция истощенных регуляторных Т-клеток содержит менее 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% CD25+ клеток.

В одном из вариантов осуществления регуляторные Т-клетки, например, CD25+ Т-клетки удаляют из популяции с использованием антитела против CD25 или его фрагмента, или CD25-связывающего лиганда, IL-2. В одном из вариантов осуществления антитело против CD25 или его фрагмент, или CD25-связывающий лиганд является конъюгированным с субстратом, например, гранулой, или иным образом нанесен на субстрат, например, гранулу. В одном из вариантов осуществления антитело против CD25 или его фрагмент является конъюгированным с субстратом, как описано в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления регуляторные Т-клетки, например, CD25+ Т-клетки удаляют из популяции с использованием реагент для истощения для истощения CD25 от Miltenyi™. В одном из вариантов осуществления отношение клеток к реагенту для истощения CD25 составляет от 1e7 клеток до 20 мкл, или от 1e7 клеток до 15 мкл, или от 1e7 клеток до 10 мкл, или от 1e7 клеток до 5 мкл, или от 1e7 клеток до 2,5 мкл, или от 1e7 клеток до 1,25 мкл. В одном из вариантов осуществления, например, для регуляторных Т-клеток, например, используют истощение CD25+

более 500 миллионов клеток/мл. В дополнительном аспекте используют концентрацию клеток 600, 700, 800 или 900 миллионов клеток/мл.

В одном из вариантов осуществления популяция эффекторных клеток иммунной системы, которую необходимо подвергать истощению, содержит приблизительно 6×10^9 CD25+ Т-клеток. В других аспектах популяция эффекторных клеток иммунной системы, которую необходимо подвергать истощению, содержит приблизительно от 1×10^9 до 1×10^{10} CD25+ Т-клеток и любое целочисленное значение в этом диапазоне. В одном из вариантов осуществления получаемая популяция истощенных регуляторных Т-клеток содержит 2×10^9 регуляторных Т-клеток, например, CD25+ клеток или менее (например, 1×10^9, 5×10^8, 1×10^8, 5×10^7, 1×10^7 или менее CD25+ клеток).

В одном из вариантов осуществления регуляторные Т-клетки, например, CD25+ клетки, удаляют из популяции с использованием системы CliniMAC с набором трубок для истощения, таком как, например, трубка 162-01. В одном из вариантов осуществления система CliniMAC работает с установленным параметром для истощения, таким как, например, DEPLETION2.1.

Без желания быть связанными конкретной теорией, снижение уровня отрицательных регуляторов иммунных клеток (например, снижение числа нежелательных иммунных клеток, например, T_{REG}-клеток) у индивидуума до афереза или во время получения продукта экспрессирующей CAR клетки может снижать риск рецидива у индивидуума. Например, способы истощения T_{REG}-клеток известны в данной области. Способы снижения уровня T_{REG}-клеток включают, но не ограничиваются ими, циклофосфамид, антитело против GITR (антитело против GITR, описываемое в настоящем описании), истощение CD25 и их сочетания.

В некоторых вариантах осуществления способы получения включают снижение числа (например, истощение) T_{REG}-клеток до получения экспрессирующей CAR клетки. Например, способы получения включают приведение образца, например, образец после афереза в контакт с антителом против GITR и/или антителом против

CD25 (или его фрагментом, или CD25-связывающим лигандом), например, для истощения T_{REG}-клеток до получения продукта экспрессирующей CAR клетки (например, Т-клетки, NK-клетки).

В одном из вариантов осуществления индивидуум получает предварительное лечение одним или более видами терапии, которая снижает T_{REG}-клетки до сбора клеток для получения продукта экспрессирующей CAR клетки, таким образом, снижая риск рецидива у индивидуума при лечении экспрессирующими CAR клетками. В одном из вариантов осуществления способы снижения T_{REG}-клеток включают, но не ограничиваются ими, введение индивидууму одного или более из циклофосфамида, антитела против GITR, истощения CD25 или их сочетания. Введение одного или более из циклофосфамида, антитела против GITR, истощения CD25 или их сочетания может происходить во время или после инфузии продукта экспрессирующей CAR клетки.

В одном из вариантов осуществления индивидуум получает предварительное лечение циклофосфамидом до сбора клеток для получения продукта экспрессирующей CAR клетки, таким образом, снижая риск рецидива у индивидуума при лечении экспрессирующим CAR клетками. В одном из вариантов осуществления индивидуум получает предварительное лечение антителом против GITR до сбора клеток для получения продукта экспрессирующей CAR клетки, таким образом, снижая риск рецидива у индивидуума при лечении экспрессирующим CAR клетками.

В одном из вариантов осуществления популяция клеток, которую следует удалять, не представляет собой регуляторные Т-клетки или опухолевые клетки, а клетки, которые иным образом отрицательно влияют на размножение и/или функцию CART-клеток, например, клетки, экспрессирующие CD14, CD11b, CD33, CD15 или другие маркеры, экспрессируемые возможными иммуносупрессивными клетками. В одном из вариантов осуществления предусматривают удалять такие клетки одновременно с регуляторными Т-клетками и/или опухолевыми клетки или после указанного истощения или в другом порядке.

Способы, описываемые в настоящем описании, могут включают более одного этапа селекции, например, более одного этапа истощения. Обогащение популяции Т-клеток посредством

отрицательной селекции можно проводить, например, комбинацией антител, направленных на поверхностные маркеры, уникальные для подвергаемых отрицательной селекции клеток. Один из способов представляет собой сортировка и/или селекция клеток посредством отрицательной магнитной иммунной адгезии или проточной цитометрии, в которой используют смесь моноклональных антител, направленных на маркеры клеточной поверхности, присутствующие на клетках, подвергаемых отрицательной селекции. Например, для обогащения CD4+-клеток посредством отрицательной селекции смесь моноклональных антител может содержать антитела против CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR и CD8.

Описываемые в настоящем описании способы могут дополнительно включают удаление клеток из популяции, которая экспрессирует опухолевый антиген, например, опухолевый антиген, которые не содержит CD25, например, CD19, CD30, CD38, CD123, CD20, CD14 или CD11b, таким образом, обеспечивая популяцию истощенных регуляторных Т-клеток, например, истощенных по CD25+ и истощенных по опухолевому антигену клеток, которые являются подходящими для экспрессии CAR, например, CAR, описываемого в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления экспрессирующие опухолевый антиген клетки удаляют одновременно с регуляторными Т-клетками, например, CD25+ клетками. Например, антитело против CD25 или его фрагмент, и антитело против опухолевого антигена, или его фрагмент можно присоединять к тому же субстрату, например, грануле, которую можно использовать для удаления клеток, или антитело против CD25 или его фрагмент, или антитело против опухолевого антигена, или его фрагмент можно присоединять к отдельным гранулам, смесь которых можно использовать для удаления клеток. В других вариантах осуществления удаление регуляторных Т-клеток, например, CD25+ клеток и удаление экспрессирующих опухолевый антиген клеток является последовательным и может происходить, например, в любом порядке.

Также раскрыты способы, которые включают удаление клеток из популяции, которые экспрессируют ингибитор контрольных точек, например, ингибитор контрольных точек, описываемых в настоящем

описании, например, одной или более PD1+ клеток, LAG3+ клеток и TIM3+ клеток, чтобы таким образом обеспечивать популяцию истощенных регуляторных Т-клеток, например, истощенных CD25+ клеток и истощенных по ингибитору контрольных точек клеток, например, истощенных PD1+, LAG3+ и/или TIM3+ клеток. Иллюстративные ингибиторы контрольных точек включают B7-H1, B7-1, CD160, P1H, 2B4, PD1, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, TIGIT, CTLA-4, BTLA и LAIR1. В одном из вариантов осуществления экспрессирующие ингибитор контрольных точек клетки удаляют одновременно с регуляторными Т-клетками, например, CD25+ клетками. Например, антитело против CD25 или его фрагмент, и антитело против ингибитора контрольных точек или его фрагмент можно связывать с одной и той же гранулой, которую можно использовать для удаления клеток, или антитело против CD25 или его фрагмент и антитело против ингибитора контрольных точек или его фрагмент можно связывать с отдельными гранулами, смесь которых можно использовать для удаления клеток. В других вариантах осуществления удаление регуляторных Т-клеток, например, CD25+ клеток и удаление экспрессирующих ингибитор контрольных точек клеток является последовательным и может происходить, например, в любом порядке.

В одном из вариантов осуществления можно выбирать популяцию Т-клеток, которая экспрессирует один или более из IFN-γ, TNFα, IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, гранзим B и перфорин или других подходящих молекул, например, других цитокинов. Можно определять способы скрининга экспрессии клеток, например, способами, описанными в публикации PCT № WO 2013/126712.

Для выделения желаемой популяции клеток положительной или отрицательной селекцией концентрацию клеток и поверхность (например, частиц, таких как гранулы) можно изменять. В определенных вариантах осуществления желательным может являться значительное уменьшение объема, в котором гранулы и клетки смешивают друг с другом (например, увеличение концентрации клеток), для обеспечения максимального контактирования клеток и

гранул. Например, в одном из вариантов осуществления используют концентрацию 2 миллиарда клеток/мл. В одном из вариантов осуществления используют концентрацию 1 миллиард клеток/мл. В дополнительном варианте осуществления используют более 100 миллионов клеток/мл. В дополнительном варианте осуществления используют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В еще одном другом варианте осуществления используют концентрацию клеток 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных вариантах осуществления можно использовать концентрации 125 или 150 миллионов клеток/мл. Использование высоких концентраций может приводить к увеличенному выходу клеток, активации клеток и размножению клеток. Кроме того, использование высоких концентраций клеток обеспечивает более эффективный захват клеток, которые могут слабо экспрессировать представляющие интерес антигены-мишени, такие как CD28-отрицательные Т-клетки, или из образцов, в которых содержится много опухолевых клеток (т.е. лейкозная кровь, опухолевая ткань и т.д.). Такие популяции клеток могут иметь терапевтическую ценность, и их получение является желательным. Например, использование высокой концентрации клеток обеспечивает более эффективную селекцию CD8+ Т-клеток, которые обычно характеризуются более слабой экспрессией CD28.

В родственном варианте осуществления желательным может являться использование более низких концентраций клеток. Путем значительного разбавления смеси Т-клеток и поверхности (например, частиц, таких как гранулы) можно сводить к минимуму взаимодействия между частицами и клетками. Это приводит к селекции клеток, которые экспрессируют высокие количества желаемых антигенов, которые должны связываться с частицами. Например, CD4+ Т-клетки экспрессируют более высокие уровни CD28 и более эффективно захватываются по сравнению с CD8+ Т-клетками в разбавленных концентрациях. В одном из вариантов осуществления используемая концентрация клеток составляет 5×10^6/мл. В других вариантах осуществления используемая концентрация может

составлять приблизительно от 1×10^5/мл до 1×10^6/мл и любое целочисленное значение в этом диапазоне.

В других вариантах осуществления клетки можно инкубировать на шейкере в течение различных периодов времени при различных скоростях при 2-10°C или при комнатной температуре.

Т-клетки для стимуляции также можно замораживать после этапа промывания. Без желания быть связанными теорией, этап замораживания последующего размораживания обеспечивает более однородный продукт в результате удаления гранулоцитов и в некоторой степени моноцитов в популяции клеток. После этапа промывания, который удаляет плазму и тромбоциты, клетки можно суспендировать в замораживающем растворе. Несмотря на то, что многие замораживающие растворы и параметры известны в данной области и являются пригодными в этом контексте, один из способов включает использование PBS, содержащего 20% DMSO и 8% сывороточного альбумина человека, или среды для культивирования, содержащей 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% сывороточного альбумина человека и 7,5% DMSO или 31,25% Plasmalyte A, 31,25% декстрозы 5%, 0,45% NaCl, 10% декстрана 40 и 5% декстрозы, 20% сывороточного альбумина человека и 7,5% DMSO или других подходящих замораживающих сред для культивирования клеток, содержащих например, Hespan и PlasmaLyte A, затем клетки замораживают до -80°C со скоростью 1° в минуту и хранят в газовой фазе в резервуаре для хранения с жидким азотом. Можно использовать другие способы контролируемого замораживания, а также неконтролируемое моментальное замораживание при -20°C или в жидком азоте.

В определенных вариантах осуществления криоконсервированные клетки размораживают и промывают, как описано в настоящем описании, и оставляют уравновешиваться в течение одного часа при комнатной температуре перед активацией способами по настоящему изобретению.

Также в контексте изобретения предусматривают сбор образцов крови или афереза у индивидуума в момент времени до того, как размноженные клетки, как описано в настоящем описании, могут

понадобиться. Таким образом, источник клеток, которые необходимо размножать, можно собирать в любой необходимый момент времени и желаемые клетки, такие как Т-клетки, выделять и замораживать для дальнейшего использования в Т-клеточной терапии для любых возможных заболеваний или состояний, для которых Т-клеточная терапия будет являться эффективной, такая как Т-клеточная терапия, описываемая в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления отбирают образец крови или проводят аферез в основном у здорового индивидуума. В определенных вариантах осуществления отбирают образец крови или проводят аферез в основном у здорового индивидуума, который подвергается риску развития заболевания, но у которого заболевание еще не развилось, и представляющие интерес клетки выделяют и замораживают для дальнейшего использования. В определенных вариантах осуществления Т-клетки можно размножать, замораживать и использовать позже. В определенных вариантах осуществления образцы собирают у пациента сразу же после диагностики конкурентного заболевания, как описано в настоящем описании, но до любых видов лечения. В дополнительном варианте осуществления клетки выделяют из образца крови или в результате афереза у индивидуума до любых возможных соответствующих способов лечения, включая, но, не ограничиваясь ими, лечение средствами, такими как натализумаб, эфализумаб, противовирусные средства, химиотерапия, радиация, иммуносупрессирующие средства, такие как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антитела или другие иммунодеструктивные средства, такие как CAMPATH, антитела против CD3, цитоксан, флударабин, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофеноловая кислота, стероиды, FR901228 и облучение. Эти лекарственные средства ингибируют кальций-зависимую фосфатазу кальциневрин (циклоспорин и FK506) или ингибируют киназу p70S6, которая является важной для индуцируемой фактором роста передачи сигналов (рапамицин). (Liu et al., Cell, 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun., 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun., 5:763-773, 1993). В дополнительном варианте осуществления клетки выделяют у пациента и замораживают для использования в последующие моменты

времени в сочетании с (например, до, одномоментно или после) трансплантацией костного мозга или стволовых клеток, Т-клеточной аблятивной терапией с использованием химиотерапевтических средств, таких как, флударабин, дистанционная лучевая терапия (XRT), циклофосфамид или антитела, такие как OKT3 или CAMPATH. В другом варианте осуществления клетки выделяют перед использованием и их можно замораживать для использования в последующие моменты времени для лечения после В-клеточной аблятивной терапии, такой как средствами, которые взаимодействуют с CD20, например, ритуксан.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения Т-клетки получают от пациента непосредственно после лечения, которое оставляет у индивидуума функциональные Т-клетки. В отношении этого наблюдали, что после определенных видов лечения злокачественных опухолей, в частности видов лечения лекарственными средствами, которые повреждают иммунную систему, сразу же после лечения во время периода, когда пациенты, как правило, восстанавливаются после лечения, качество получаемых Т-клеток может являться оптимальным или улучшенным в отношении их способности размножаться *ex vivo*. Аналогично, после манипуляции *ex vivo* способами, описываемыми в настоящем описании, эти клетки могут находиться в предпочтительном состоянии для повышенного приживления и размножения *in vivo*. Таким образом, в контексте настоящего изобретения предусматривают сбор клеток крови, включая Т-клетки, дендритные клетки или другие клетки ростка кроветворения во время фазы восстановления. Кроме того, в определенных вариантах осуществления можно использовать режим мобилизации (например, мобилизации GM-CSF) и кондиционирования для создания условий у индивидуума, при которых благоприятной является репопуляция, рециркуляция, регенерация и/или размножение конкретных типов клеток, особенно в течение определенного временного окна после терапии. Иллюстративные типы клеток включают Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки и другие клетки иммунной системы.

В одном из вариантов осуществления эффекторные клетки иммунной системы, экспрессирующие молекулу CAR, например,

молекулу CAR, описываемую в настоящем описании, получают от индивидуума, который получал низкую иммуностимулирующую дозу ингибитора mTOR. В одном из вариантов осуществления популяцию эффекторных клеток иммунной системы, например, Т-клетки, которые необходимо конструировать для экспрессии CAR, собирают через достаточный период времени или после достаточного дозирования низкой иммуностимулирующей дозой ингибитора mTOR, таким образом, что уровень PD1-отрицательных эффекторных клеток иммунной системы, например, Т-клеток или отношение PD1-отрицательных эффекторных клеток иммунной системы, например, Т-клеток/PD1-положительных эффекторных клеток иммунной системы, например, Т-клеток, у индивидуума или в собираемых от индивидуума по меньшей мере временно увеличивалось.

В других вариантах осуществления популяцию эффекторных клеток иммунной системы, например, Т-клеток, которые конструировали или будут конструировать для экспрессии CAR, можно обрабатывать *ex vivo* посредством приведения в контакт с определенным количеством ингибитора mTOR, который увеличивает число PD1-отрицательных эффекторных клеток иммунной системы, например, Т-клеток или увеличивает отношение PD1-отрицательных эффекторных клеток иммунной системы, например, Т-клеток/PD1-положительных эффекторных клетки иммунной системы, например, Т-клеток.

В одном из вариантов осуществления популяция Т-клеток является дефицитной по диаглицеролкиназе (DGK). DGK-дефицитные клетки включают клетки, которые не экспрессируют РНК DGK или белок DGK или обладают сниженной или ингибированной активностью DGK. DGK-дефицитные клетки можно получать посредством генетических подходов, например, введением РНК-интерферирующих средств, например, миРНК, кшРНК, мкРНК для снижения или предотвращения экспрессии DGK. Альтернативно, DGK-дефицитные клетки можно получать обработкой ингибиторами DGK, описываемыми в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления популяция Т-клеток является Ikaros-дефицитной. Ikaros-дефицитные клетки включают клетки, которые не экспрессируют РНК Ikaros РНК или белок Ikaros

или обладают сниженной или ингибированной активностью Ikaros, Ikaros-дефицитные клетки можно получать посредством генетических подходов, например, введением РНК-интерферирующих средств, например, миРНК, кшРНК, мкРНК для снижения или предотвращения экспрессии Ikaros. Альтернативно, Ikaros-дефицитные клетки можно получать обработкой ингибиторами Ikaros, например, леналидомидом.

В вариантах осуществления популяция Т-клеток является DGK-дефицитной и Ikaros-дефицитной, например, не экспрессирует DGK и Ikaros или обладает сниженной или ингибированной активностью DGK и Ikaros. Такие DGK- и Ikaros-дефицитные клетки можно получать любым способом, описываемым в настоящем описании.

В одном из вариантов осуществления NK-клетки получают от индивидуума. В другом варианте осуществления NK-клетки представляют собой линию NK-клеток, например, линию клеток NK-92 (Conkwest).

Аллогенные эффекторные клетки иммунной системы с CAR

В вариантах осуществления, описываемых в настоящем описании, эффекторная клетка иммунной системы может представлять собой аллогенную эффекторную клетку иммунной системы, например, Т-клетку или NK-клетку. Например, клетка может представлять собой аллогенную Т-клетку, например, аллогенную Т-клетку, в которой отсутствует экспрессия функционального Т-клеточного рецептора (TCR) и/или лейкоцитарного антигена человека (HLA), например, HLA I класса и/или HLA II класса.

Т-клетку, не содержащую функциональный TCR, можно, например, конструировать таким образом, чтобы она не экспрессировала какой-либо функциональный TCR на своей поверхности, конструировать таким образом, чтобы она не экспрессировала одну или более субъединиц, которые содержат функциональный TCR (например, конструировать таким образом, что она не экспрессирует (или обладает сниженной экспрессией) TCR-альфа, TCR-бета, TCR-гамма, TCR-дельта, TCR-эпсилон и/или TCR-дзета), или конструировать таким образом, что она продуцирует очень мало функционального TCR на своей поверхности. Альтернативно, Т-клетка может экспрессировать по существу

поврежденный TCR, например, в результате экспрессии мутантных или усеченных форм одной или более из субъединиц TCR. Термин "по существу поврежденный TCR" означает, что такой TCR не вызывает неблагоприятный иммунный ответ у хозяина.

Т-клетку, описываемую в настоящем описании, можно, например, конструировать таким образом, чтобы она не экспрессировала функциональный HLA на своей поверхности. Например, Т-клетку, описываемую в настоящем описании, можно конструировать таким образом, чтобы экспрессия HLA на клеточной поверхности, например, HLA I класса и/или HLA II класса являлась сниженной. В некоторых аспектах подавление HLA можно проводить путем снижения или устранения экспрессии бета-2-микроглобулина (B2M).

В некоторых вариантах осуществления Т-клетка может не содержать функциональный TCR и функциональный HLA, например, HLA I класса и/или HLA II класса.

Модифицированные Т-клетки, в которых отсутствует экспрессия функционального TCR и/или HLA, можно получать любыми подходящими способами, включая нокаут или нокдаун одной или более субъединиц TCR или HLA. Например, Т-клетка может включают нокдаун TCR и/или HLA с использованием миРНК, кшРНК, коротких палиндромных повторов, расположенных группами, равномерно удаленными друг от друга (CRISPR), эффекторной нуклеазы, подобной активаторам транскрипции (TALEN) или эндонуклеазы цинковые пальцы (ZFN).

В некоторых вариантах осуществления аллогенная клетка может представлять собой клетку, которая не экспрессирует или экспрессирует ингибирующую молекулу на низких уровнях, например, любым методом, описываемым в настоящем описании. Например, клетка может представлять собой клетку, которая не экспрессирует или экспрессирует ингибирующую молекулу на низких уровнях, например, которая может снижать способность экспрессирующей CAR клетки повышать ответ иммунного эффектора. Примеры ингибирующих молекул включают PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC I класса, MHC

II класса, GAL9, аденозин и TGFR бета. Ингибирование ингибирующей молекулы, например, путем ингибирования уровня ДНК, РНК или белка может оптимизировать характеристики экспрессирующей CAR клетки. В вариантах осуществления можно использовать ингибирующую нуклеиновую кислоту, например, ингибирующую нуклеиновую кислоту, например, дцРНК, например, миРНК или кшРНК, короткие палиндромные повторы, расположенные группами, равномерно удаленными друг от друга (CRISPR), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN) или эндонуклеазу цинковые пальцы (ZFN), например, как описано в настоящем описании.

миРНК и кшРНК для ингибирования TCR или HLA

В некоторых вариантах осуществления экспрессию TCR и/или экспрессию HLA можно ингибировать с использованием миРНК или кшРНК, которые направленно воздействуют на нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR и/или HLA, и/или ингибирующей молекулы, описываемой в настоящем описании (например, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC I класса, MHC II класса, GAL9, аденозина и TGFR бета) в клетке.

Экспрессию миРНК и кшРНК в Т-клетках можно получать с использованием любой общепринятой экспрессирующей система, например, такой как экспрессирующая система на основе лентивируса.

Иллюстративные кшРНК, которые подавляют экспрессию одного или более компонентов TCR, описаны, например, в публикации US № 2012/0321667. Иллюстративные миРНК и кшРНК, которые подавляют экспрессию генов HLA I класса и/или HLA II класса, описаны, например, в публикации US № 2007/0036773.

CRISPR для ингибирования TCR или HLA

"CRISPR" или "CRISPR к TCR и/или HLA" или "CRISPR для ингибирования TCR и/или HLA", как используют в настоящем описании, относится к группе короткие палиндромные повторы, расположенные группами, равномерно удаленными друг от друга, или

системе, содержащей такую группу повторов. Как используют в настоящем описании, "Cas" относится к CRISPR-ассоциированному белку. Система "CRISPR/Cas" относится к системе, получаемой из CRISPR и Cas, которые можно использовать для сайленсинга или мутации гена TCR и/или HLA, и/или ингибирующей молекуле, описываемой в настоящем описании, (например, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC I класса, MHC II класса, GAL9, аденозину и TGFR бета).

Природные системы CRISPR/Cas встречаются приблизительно в 40% секвенированных геномах эубактерий и 90% секвенированных архебактерий. Grissa et al., (2007) BMC Bioinformatics, 8: 172. Эта система представляет собой тип прокариотической иммунной системы, которая обеспечивает устойчивость к чужеродным генетическим элементам, таким как плазмиды и фаги, и обеспечивает форму приобретенного иммунитета. Barrangou et al., (2007) Science, 315: 1709-1712; Marragini et al., (2008) Science, 322: 1843-1845.

Система CRISPR/Cas была модифицирована для применения в редактировании генома (сайленсинге, усилении или изменении конкретных генов) у эукариот, таких как мыши или приматы. Wiedenheft et al., (2012) Nature, 482: 331-8. Это проводят введением в эукариотическую клетку плазмиды, содержащей конкретным образом сконструированные CRISPR и один или более подходящих Cas.

Последовательность CRISPR, в некоторых случаях называемая локусом CRISPR, содержит чередующиеся повторы и спейсеры. В природных CRISPR спейсеры, как правило, содержат последовательности, чужеродные для бактерий, такие как плазмидная или фаговая последовательность; в TCR и/или системе HLA CRISPR/Cas спейсеры получают из последовательности гена TCR или HLA.

РНК из локуса CRISPR конститутивно экспрессируется и процессируется белками Cas до малых РНК. Они содержат спейсер, фланкированный последовательностью повтора. РНК направляет

другие белки Cas на сайленсинг экзогенных генетических элементов на уровне РНК или ДНК. Horvath et al., (2010) Science, 327: 167-170; Makarova et al., (2006) Biology Direct, 1:7. Таким образом, спейсеры служат в качестве матриц для молекул РНК, аналогично миРНК. Pennisi, (2013) Science, 341: 833-836.

Вследствие того, что они естественным образом встречаются во многих различных типах бактерий, точные расположения CRISPR и структура, функция и число генов Cas и их продукт немного отличаются у разных видов. Haft et al., (2005) PLoS Comput. Biol., 1: e60; Kunin et al., (2007) Genome Biol., 8: R61; Mojica et al., (2005) J. Mol. Evol., 60: 174-182; Bolotin et al., (2005) Microbiol., 151: 2551-2561; Pourcel et al., (2005) Microbiol., 151: 653-663 и Stern et al., (2010) Trends. Genet., 28: 335-340. Например, белки Cse (подтип Cas, *E. coli*) (например, CasA) образуют функциональный комплекс, Cascade, который процессирует транскрипты РНК CRISPR в единицах спейсер-повтор, которые содержит Cascade. Brouns et al., (2008) Science, 321: 960-964. У других прокариот Cas6 процессирует транскрипт CRISPR. Для инактивации фага на основе CRISPR у *E. coli* необходимыми являются Cascade и Cas3, но не Cas1 или Cas2. Белки Cmr (модуль Cas RAMP) у *Pyrococcus furiosus* и других прокариот образуют функциональный комплекс с малыми РНК CRISPR, который распознает и расщепляет комплементарные РНК-мишени. Простейшая система CRISPR основана на белке Cas9, который представляет собой нуклеазу с двумя активными участками рестрикции, один для каждой цепи двойной спирали. Комбинацию Cas9 и модифицированной РНК локуса CRISPR можно использовать в системе для редактирования генома. Pennisi, (2013) Science, 341: 833-836.

Таким образом, систему CRISPR/Cas можно использовать для редактирования гена TCR и/или HLA (добавления или удаления пары нуклеотидов) или введения преждевременного стоп-кодона, что, таким образом, снижает экспрессию TCR и/или HLA. Систему CRISPR/Cas можно альтернативно использовать как РНК-интерференцию, выключение гена TCR и/или HLA обратимым способом. В клетке млекопитающего, например, РНК может направлять белок

Cas к промотору TCR и/или HLA, стерически блокируя РНК-полимеразы.

Можно получать искусственные системы CRISPR/Cas, которые ингибируют TCR и/или HLA, с использованием технологии, известной в данной области, например, которая описана в публикации U.S. № 20140068797 и у Cong (2013), Science, 339: 819-823. Также можно получать другие искусственные системы CRISPR/Cas, которые известны в данной области, которые ингибируют TCR и/или HLA, например, которые описаны у Tsai (2014), Nature Biotechnol., 32:6 569-576, в патенте США № 8871445, 8865406, 8795965, 8771945 и 8697359.

TALEN для ингибирования TCR и/или HLA

"TALEN" или "TALEN к HLA и/или TCR" или "TALEN для ингибирования HLA и/или TCR" относится к эффекторной нуклеазе, подобной активатору транскрипции, искусственной нуклеазе, которую можно использовать для редактирования гена HLA и/или TCR, и/или ингибирующей молекулы, описываемой в настоящем описании (например, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC I класса, MHC II класса, GAL9, аденозина и TGFR бета).

TALEN получают искусственным образом слиянием связывающего домена ДНК эффектора TAL с расщепляющим ДНК доменом. Эффекторы, подобные активаторам транскрипции (TALE), можно конструировать для связывания с любой желаемой последовательностью ДНК, включая участок гена HLA или TCR. Объединением сконструированного TALE с расщепляющим ДНК доменом можно получать рестрикционный фермент, который является специфическим для любой желаемой последовательности ДНК, включая последовательность HLA или TCR. Затем их можно вводить в клетку, где их можно использовать для редактирования генома. Boch (2011), Nature Biotech., 29: 135-6 и Boch et al., (2009) Science, 326: 1509-12; Moscou et al., (2009) Science, 326: 3501.

TALE представляют собой белки, секретируемые бактериями *Xanthomonas*. ДНК-связывающий домен содержит повторяющуюся

высококонсервативную последовательность длиной 33-34 аминокислоты за исключением 12-й и 13-й аминокислот. Эти два положения являются высоко вариабельными, демонстрируя сильную корреляцию с распознаванием конкретного нуклеотида. Таким образом, их можно конструировать для связывания с желаемой последовательностью ДНК.

Для получения TALEN белок TALE сливают с нуклеазой (N), которая представляет собой эндонуклеазу дикого типа или мутантную по FokI эндонуклеазу. Несколько мутаций было сделано в FokI для их использования в TALEN; например, они улучшают специфичность или активность расщепления. Cermak et al., (2011) Nucl. Acids Res., 39: e82; Miller et al., (2011) Nature Biotech., 29: 143-8; Hockemeyer et al., (2011) Nature Biotech., 29: 731-734; Wood et al., (2011) Science, 333: 307; Doyon et al., (2010) Nature Methods, 8: 74-79; Szczepek et al., (2007) Nature Biotech.? 25: 786-793? и Guo et al., (2010) J. Mol. Biol., 200: 96.

Домен FokI функционирует как димер, для которого необходимыми являются две конструкции с уникальными ДНК-связывающими доменами к участкам в геноме-мишени с правильной ориентацией и расстоянием. Число аминокислотных остатков между ДНК-связывающим доменом TALE и расщепляющим доменом FokI и число оснований между двумя отдельными участками связывания TALEN, по-видимому, являются важными параметрами для получения высоких уровней активности. Miller et al., (2011) Nature Biotech., 29: 143-8.

TALEN HLA или TCR можно использовать внутри клетки для получения двухцепочечного разрыва (DSB). Мутация может возникать на участке разрыва, если механизмы репарации ошибочно препарируют разрыв посредством присоединения негомологичных концов. Например, ошибочная репарация может вводить мутацию сдвига рамки считывания. Альтернативно, в клетку можно вводить чужеродную ДНК наряду с TALEN; в зависимости от последовательностей чужеродной ДНК и хромосомной последовательности, этот процесс можно использовать для создания дефекта в гене HLA или TCR или вводить такой дефект в ген HLA

или TCR дикого типа, таким образом, понижая экспрессию HLA или TCR.

Можно конструировать TALEN, специфичные к последовательностям в HLA или TCR любым известным в данной области способом, включая различные схемы с использованием модульных компонентов. Zhang et al., (2011) Nature Biotech.. 29: 149-53; Geibler et al., (2011) PLoS ONE 6: e19509.

Нуклеаза цинковые пальцы для ингибирования HLA и/или TCR

"ZFN" или "нуклеаза цинковые пальцы" или "ZFN к HLA и/или TCR" или "ZFN для ингибирования HLA и/или TCR" относится к нуклеазе цинковые пальцы, искусственной нуклеазе, которую можно использовать для редактирования гена HLA и/или TCR и/или ингибирующей молекулы, описываемой в настоящем описании (например, PD1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, CEACAM (например, CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 или CD270), KIR, A2aR, MHC I класса, MHC II класса, GAL9, аденозина и TGFR бета).

Аналогично TALEN, ZFN содержит нуклеазный домен FokI (или его производное), слитый с ДНК-связывающим доменом. В случае ZFN ДНК-связывающий домен содержит один или более цинковых пальцев. Carroll et al., (2011) Genetics Society of America, 188: 773-782, и Kim et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 1156-1160.

Цинковый палец представляет собой небольшой белковый структурный мотив, стабилизированный одним или более цинковыми ионами. Цинковый палец может содержать, например, Cys2His2 и может распознавать приблизительно последовательность 3 п.н. Можно комбинировать различные цинковые пальцы известной специфичности для получения много пальцевых полипептидов, которые распознают последовательности длиной приблизительно 6, 9, 12, 15 или 18 п.н. Доступны различные способы селекции и сборки модулей для получения цинковых пальцев (и их сочетаний), распознающих конкретные последовательности, включая фаговый дисплей, дрожжевые одногибридные системы, бактериальные одногибридные и двугибридные системы и клетки млекопитающих.

Аналогично TALEN, ZFN должен димеризоваться для расщепления ДНК. Таким образом, необходимо, чтобы пара ZFN направленно воздействовала на непалиндромные участки ДНК. Два индивидуальных ZFN должны связывать противоположные цепи ДНК с их нуклеазами, находящимися на правильном расстоянии друг от друга. Bitinaite et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 10570-5.

Также аналогично TALEN ZFN может создавать двухцепочечный разрыв в ДНК, что может создавать мутацию сдвига рамки считывания, при ошибочной репарации, что приводит к понижению экспрессии и количества HLA и/или TCR в клетке. ZFN также можно использовать с гомологичной рекомбинацией для мутации в гене HLA или TCR.

ZFN, специфичные к последовательностям в HLA и/или TCR можно конструировать любым известным в данной области способом. Cathomen et al., (2008) Mol. Ther., 16: 1200-7; Guo et al., (2010) J. Mol. Biol., 400: 96; патентная публикация U.S. 2011/0158957 и патентная публикация U.S. 2012/0060230.

Экспрессия теломеразы

Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, в некоторых вариантах осуществления терапевтическая Т-клетка характеризуется коротким сроком сохранения у пациента, вследствие укороченных теломераз в Т-клетке; таким образом, трансфекция геном теломеразы может удлинять теломеры Т-клетки и улучшать сохранение Т-клетки у пациента. См. Carl June, "Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic", Journal of Clinical Investigation, 117:1466-1476 (2007). Таким образом, в одном из вариантов осуществления эффекторная клетка иммунной системы, например, Т-клетка, эктопически экспрессирует субъединицу теломеразы, например, каталитическую субъединицу теломеразы, например, TERT, например, hTERT. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способу получения экспрессирующей CAR клетки, включающему приведение клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей субъединицу теломеразы, например, каталитическую субъединицу теломеразы, например, TERT, например, hTERT. Клетку можно приводить в

контакт с нуклеиновой кислотой до, одномоментно или после контактирования с конструкцией, кодирующей CAR.

В одном из аспектов изобретение относится к способу получения популяции эффекторных клеток иммунной системы (например, Т-клеток, NK-клеток). В одном из вариантов осуществления способ включает: предоставление популяции эффекторных клеток иммунной системы (например, Т-клеток или NK-клеток), приведение популяции эффекторных клеток иммунной системы в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR, и приведение популяции эффекторных клеток иммунной системы в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей субъединицу теломеразы, например, hTERT в условиях, которые обеспечивают экспрессию CAR и теломеразы.

В одном из вариантов осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая субъединицу теломеразы, представляет собой ДНК. В одном из вариантов осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая субъединицу теломеразы, содержит промотор, способный направлять экспрессию субъединицы теломеразы.

В одном из вариантов осуществления hTERT содержит аминокислотную последовательность белка ID GenBank AAC51724.1 (Meyerson et al., hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization", Cell Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795), как указано ниже:

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVP
WDARPPPAAPSFRQVSCLKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYL
PNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPP
PHASGPRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASRSLPLPKRPRRGAAPEPERTPV
GQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPR
PWDTPCPPVYAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRL
PRLPQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPEEEDT
DPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRHNERRFLRNTKKFISLGKHAKLSLQE
LTWKMSVRGCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFQKN
RLFFYRKSVWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVN
MDYVVGARTFRREKRAAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHRAWRTFVLRVRA
QDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHV

STLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQ CQGIPQGSILSTLLCSLCYGDMENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGV PEYGCVVNLRKTVVNFPVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIR ASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGVLRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLLQAYRFHACVLQL PFHQQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLT RHRVTYVPLLGSLRTAQTQLSRKLPGTTLTALEAAANPALPSDFKTILD (SEQ ID NO: 61)

В одном из вариантов осуществления hTERT содержит последовательность по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 61. В одном из вариантов осуществления hTERT содержит последовательность SEQ ID NO: 61. В одном из вариантов осуществления hTERT содержит делецию (например, не более чем 5, 10, 15, 20 или 30 аминокислот) на N-конце, C-конце или обоих. В одном из вариантов осуществления hTERT содержит трансгенную аминокислотную последовательность (например, не более чем 5, 10, 15, 20 или 30 аминокислот) на N-конце, C-конце или обоих.

В одном из вариантов осуществления hTERT кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты с номером доступа GeneBank AF018167 (Meyerson et al., "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization", Cell Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795):

1 caggcagcgt ggtcctgctg cgcacgtggg aagccctggc cccggccacc cccgcgatgc

61 cgcgcgctcc ccgctgccga gccgtgcgct ccctgctgcg cagccactac cgcgaggtgc

121 tgccgctggc cacgttcgtg cggcgcctgg ggccccaggg ctggcggctg gtgcagcgcg

181 gggacccggc ggctttccgc gcgctggtgg cccagtgcct ggtgtgcgtg ccctgggacg

241 cacggccgcc ccccgccgcc ccctccttcc gccaggtgtc ctgcctgaag gagctggtgg

301 cccgagtgct gcagaggctg tgcgagcgcg gcgcgaagaa cgtgctggcc ttcggcttcg

361 cgctgctgga cggggcccgc gggggccccc ccgaggcctt caccaccagc gtgcgcagct

421 acctgcccaa cacggtgacc gacgcactgc gggggagcgg ggcgtggggg ctgctgttgc

481 gccgcgtggg cgacgacgtg ctggttcacc tgctggcacg ctgcgcgctc tttgtgctgg

541 tggctcccag ctgcgcctac caggtgtgcg ggccgccgct gtaccagctc ggcgctgcca

601 ctcaggcccg gcccccgcca cacgctagtg gaccccgaag gcgtctggga tgcgaacggg

661 cctggaacca tagcgtcagg gaggccgggg tccccctggg cctgccagcc ccgggtgcga

721 ggaggcgcgg gggcagtgcc agccgaagtc tgccgttgcc caagaggccc aggcgtggcg

781 ctgcccctga gccggagcgg acgcccgttg ggcaggggtc ctgggcccac ccgggcagga

841 cgcgtggacc gagtgaccgt ggtttctgtg tggtgtcacc tgccagaccc gccgaagaag

901 ccacctcttt ggagggtgcg ctctctggca cgcgccactc ccacccatcc gtgggccgcc

961 agcaccacgc gggccccccа tccacatcgc ggccaccacg tccctgggac acgccttgtc

1021 ccccggtgta cgccgagacc aagcacttcc tctactcctc aggcgacaag gagcagctgc

1081 ggccctcctt cctactcagc tctctgaggc ccagcctgac tggcgctcgg aggctcgtgg

1141 agaccatctt tctgggttcc aggccctgga tgccagggac tccccgcagg ttgccccgcc

1201 tgccccagcg ctactggcaa atgcggcccc tgtttctgga gctgcttggg aaccacgcgc

1261 agtgccccta cggggtgctc ctcaagacgc actgcccgct gcgagctgcg gtcaccccag

1321 cagccggtgt ctgtgcccgg gagaagcccc agggctctgt ggcggccccc gaggaggagg

1381 acacagaccc ccgtcgcctg gtgcagctgc tccgccagca cagcagcccc tggcaggtgt

1441 acggcttcgt gcgggcctgc ctgcgccggc tggtgccccc aggcctctgg ggctccaggc

1501 acaacgaacg ccgcttcctc aggaacacca agaagttcat ctccctgggg aagcatgcca

1561 agctctcgct gcaggagctg acgtggaaga tgagcgtgcg gggctgcgct tggctgcgca

1621 ggagcccagg ggttggctgt gttccggccg cagagcaccg tctgcgtgag gagatcctgg

1681 ccaagttcct gcactggctg atgagtgtgt acgtcgtcga gctgctcagg tctttctttt

1741 atgtcacgga gaccacgttt caaaagaaca ggctcttttt ctaccggaag agtgtctgga

1801 gcaagttgca aagcattgga atcagacagc acttgaagag ggtgcagctg cgggagctgt

1861 cggaagcaga ggtcaggcag catcgggaag ccaggcccgc cctgctgacg tccagactcc

1921 gcttcatccc caagcctgac gggctgcggc cgattgtgaa catggactac gtcgtgggag

1981 ccagaacgtt ccgcagagaa aagagggccg agcgtctcac ctcgagggtg aaggcactgt

2041 tcagcgtgct caactacgag cgggcgcggc gccccggcct cctgggcgcc tctgtgctgg

2101 gcctggacga tatccacagg gcctggcgca ccttcgtgct gcgtgtgcgg gcccaggacc

2161 cgccgcctga gctgtacttt gtcaaggtgg atgtgacggg cgcgtacgac accatccccc

2221 aggacaggct cacggaggtc atcgccagca tcatcaaacc ccagaacacg tactgcgtgc

2281 gtcggtatgc cgtggtccag aaggccgccc atgggcacgt ccgcaaggcc ttcaagagcc

2341 acgtctctac cttgacagac ctccagccgt acatgcgaca gttcgtggct cacctgcagg

2401 agaccagccc gctgagggat gccgtcgtca tcgagcagag ctcctccctg aatgaggcca

2461 gcagtggcct cttcgacgtc ttcctacgct tcatgtgcca ccacgccgtg cgcatcaggg

2521 gcaagtccta cgtccagtgc caggggatcc cgcagggctc catcctctcc acgctgctct

2581 gcagcctgtg ctacggcgac atggagaaca agctgtttgc ggggattcgg cgggacgggc

2641 tgctcctgcg tttggtggat gatttcttgt tggtgacacc tcacctcacc cacgcgaaaa

2701 ccttcctcag gaccctggtc cgaggtgtcc ctgagtatgg ctgcgtggtg aacttgcgga

2761 agacagtggt gaacttccct gtagaagacg aggccctggg tggcacggct tttgttcaga

2821 tgccggccca cggcctattc ccctggtgcg gcctgctgct ggatacccgg accctggagg

2881 tgcagagcga ctactccagc tatgcccgga cctccatcag agccagtctc accttcaacc

2941 gcggcttcaa ggctgggagg aacatgcgtc gcaaactctt tggggtcttg cggctgaagt

3001 gtcacagcct gtttctggat ttgcaggtga acagcctcca gacggtgtgc accaacatct

3061 acaagatcct cctgctgcag gcgtacaggt ttcacgcatg tgtgctgcag ctcccatttc

3121 atcagcaagt ttggaagaac cccacatttt tcctgcgcgt catctctgac acggcctccc

3181 tctgctactc catcctgaaa gccaagaacg cagggatgtc gctgggggcc aagggcgccg

3241 ccggccctct gccctccgag gccgtgcagt ggctgtgcca ccaagcattc ctgctcaagc

3301 tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tcctggggtc actcaggaca gcccagacgc

3361 agctgagtcg gaagctcccg gggacgacgc tgactgccct ggaggccgca gccaacccgg

3421 cactgccctc agacttcaag accatcctgg actgatggcc acccgcccac agccaggccg

3481 agagcagaca ccagcagccc tgtcacgccg ggctctacgt cccagggagg gaggggcggc

3541 ccacacccag gcccgcaccg ctgggagtct gaggcctgag tgagtgtttg gccgaggcct

3601 gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaagggc

3661 tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttcact tccccacagg ctggcgctcg gctccacccc

3721 agggccagct tttcctcacc aggagcccgg cttccactcc ccacatagga atagtccatc

3781 cccagattcg ccattgttca cccctcgccc tgccctcctt tgccttccac ccccaccatc

3841 caggtggaga ccctgagaag gaccctggga gctctgggaa tttggagtga ccaaaggtgt

3901 gccctgtaca caggcgagga ccctgcacct ggatgggggt ccctgtgggt caaattgggg

3961 ggaggtgctg tgggagtaaa atactgaata tatgagtttt tcagttttga aaaaaaaaaa

4021 aaaaaaa (SEQ ID NO: 62)

В одном из вариантов осуществления hTERT кодируется нуклеиновой кислотой с последовательностью по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности SEQ ID NO: 62. В одном из вариантов осуществления hTERT кодируется нуклеиновой кислотой SEQ ID NO: 62.

Активация и размножение клеток

Клетки можно активировать и размножать, как правило, способами, как описано, например, в патентах США 6352694, 6534055, 6905680, 6692964, 5858358, 6887466, 6905681, 7144575, 7067318, 7172869, 7232566, 7175843, 5883223, 6905874, 6797514, 6867041 и в публикации патентной заявки США № 20060121005.

Как правило, Т-клетки по изобретению размножают приведением в контакт с поверхностью с прикрепленном к ней средством, которое стимулирует ассоциированный с комплексом CD3/TCR сигнал, и лигандом, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В частности, популяции Т-клеток можно стимулировать, как описано в настоящем описании, таким способом как приведением в контакт с антителом против CD3 или его антигенсвязывающим фрагментом, или антителом против CD2, иммобилизованным на поверхности, или приведением в контакт с

активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в сочетании с ионофором кальция. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток, используют лиганд, который связывается с вспомогательной молекулой. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с антителом против CD3 и антителом против CD28 в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток. Для стимуляции пролиферации CD4+ Т-клеток или CD8+ Т-клеток можно использовать антитело против CD3 и антитело против CD28. Примеры антитела против CD28 включают 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besançon, France), которые можно использовать как и другие способы, широко известные в данной области (Berg et al., Transplant Proc., 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med., 190(9):13191328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth., 227(1-2):53-63, 1999).

В определенных вариантах осуществления первичный стимулирующий сигнал и костимулирующий сигнал для Т-клетки можно обеспечивать различными протоколами. Например, средства, обеспечивающие каждый сигнал, могут находиться в растворе или являться связанными с поверхностью. В случае связывания с поверхностью средства можно связывать с одной и той же поверхностью (т.е. в "*цис*"-конфигурации) или с отдельными поверхностями (т.е. в "*транс*"-конформации). Альтернативно, одно средство можно связывать с поверхностью и другим средством в растворе. В одном из вариантов осуществления средство, обеспечивающее костимулирующий сигнал, является связанным с клеточной поверхностью, а средство, обеспечивающее первичный сигнал активации, находится в растворе или является связанным с поверхностью. В определенных аспектах оба средства могут находиться в растворе. В другом варианте осуществления средства могут находиться в растворимой форме, а затем их можно сшивать с поверхностью, такой как клетка, экспрессирующая Fc-рецепторы, или антитело, или другое связывающее средство, которое будет связываться со средствами. В этом отношении см., например, публикации патентных заявок США № 20040101519 и 20060034810 для искусственных антигенпрезентирующих клеток (aAPC), которые

предусматривают для применения в активации и размножении Т-клеток в настоящем изобретении.

В одном из вариантов осуществления два средства иммобилизуют на гранулах, на одной и той же грануле, т.е. "*цис*" или на отдельных гранулах, т.е. "*транс*". В качестве примера средство, обеспечивающее первичный сигнал активации, представляет собой антитело против CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, и средство, обеспечивающее костимулирующий сигнал, представляет собой антитело против CD28 или его антигенсвязывающий фрагмент; и оба средства являются совместно иммобилизованными на одной и той же грануле в эквимолярных количествах. В одном из вариантов осуществления для размножения CD4+ Т-клеток и роста Т-клеток используют отношение 1:1 каждого антитела, связанного с гранулами. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения используют отношение антител против CD3:CD28, связанных с гранулами, таким образом, что наблюдают увеличение размножения Т-клеток по сравнению с размножением, наблюдаемым с использованием отношения 1:1. В одном из конкретных вариантов осуществления наблюдают увеличение приблизительно от 1 приблизительно до 3 раз по сравнению с размножением, наблюдаемым с использованием отношения 1:1. В одном из вариантов осуществления отношение антитела CD3:CD28, связанного с гранулами, находится в диапазоне от 100:1 до 1:100 и всех целочисленных значений в этом диапазоне. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения больше антитела против CD28 связано с частицами по сравнению с антителом против CD3, т.е. отношение CD3:CD28 является меньше одного. В определенных вариантах осуществления изобретения отношение антитела против CD28 к антителу против CD3, связанному с гранулами, составляет более 2:1. В одном конкретном варианте осуществления используют отношение 1:100 CD3:CD28 антитела, связанного с гранулами. В другом варианте осуществления используют отношение CD3:CD28 1:75 антитела, связанного с гранулами. В дополнительном варианте осуществления используют отношение CD3:CD28 1:50 антитела, связанного с гранулами. В другом варианте осуществления используют отношение CD3:CD28 1:30

антитела, связанного с гранулами. В одном из предпочтительных вариантов осуществления, используют отношение CD3:CD28 1:10 антитела, связанного с гранулами. В другом варианте осуществления используют отношение CD3:CD28 1:3 антитела, связанного с гранулами. В еще одном варианте осуществления используют отношение CD3:CD28 3:1 антитела, связанного с гранулами.

Для стимуляции Т-клеток или других клеток-мишеней можно использовать отношения частиц к клеткам от 1:500 до 500:1 и любые целочисленные значения в этом диапазоне. Как специалисты в данной области могут легко понять, отношение частиц к клеткам может зависеть от размера частиц относительно клетки-мишени. Например, гранулы небольшого размера могут связывать только несколько клеток, тогда как гранулы большего размера могут связывать много клеток. В определенных вариантах осуществления для стимуляции Т-клеток также можно использовать отношение клеток к частицам находится в диапазоне от 1:100 до 100:1 и любых целочисленных значений в данном диапазоне, и в дополнительных вариантах осуществления отношение составляет от 1:9 до 9:1 и любые целочисленные значения в этом диапазоне. Отношение частиц, связанных с антителом против CD3 и антитело против CD2, к Т-клеткам, которое приводит к стимуляция Т-клетки, может изменяться, как указано выше, однако определенные предпочтительные значения включают 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 и 15:1, где одно из предпочтительных отношений составляет по меньшей мере 1:1 частиц на Т-клетку. В одном из вариантов осуществления используют отношение частиц к клеткам 1:1 или менее. В одном конкретном варианте осуществления предпочтительное отношение частица:клетка составляет 1:5. В дополнительных вариантах осуществления отношение частиц к клеткам может изменяться в зависимости от суток стимуляции. Например, в одном из вариантов осуществления отношение частиц к клеткам составляет от 1:1 до 10:1 на первые сутки, и к клеткам добавляют дополнительные частицы каждые сутки или через сутки в дальнейшем в течение периода до 10 суток в

конечных отношениях от 1:1 до 1:10 (на основании подсчетов клеток на сутки добавления). В одном конкретном варианте осуществления отношение частиц к клеткам составляет 1:1 на первые сутки стимуляции, и его доводят до 1:5 на третьи и пятые сутки стимуляции. В другом варианте осуществления частицы добавляют каждые сутки или через сутки до конечного отношения 1:1 на первые сутки и 1:5 на третьи и пятые сутки стимуляции. В другом варианте осуществления отношение частиц к клеткам составляет 2:1 на первые сутки стимуляции, и его доводят до 1:10 на третьи и пятые сутки стимуляции. В другом варианте осуществления частицы добавляют каждые сутки или через сутки до конечного отношения 1:1 на первые сутки, и 1:10 на третьи и пятые сутки стимуляции. Специалисту в данной области понятно, что ряд других отношений может являться пригодным для использования в настоящем изобретении. В частности, отношения изменяются в зависимости от размера частиц и размера и типа клетки. В одном из вариантов осуществления наиболее характерные отношения для использования составляют приблизительно 1:1, 2:1 и 3:1 на первые сутки.

В дополнительных вариантах осуществления по настоящему изобретению клетки, такие как Т-клетки, объединяют с покрытыми средством гранулами, затем гранулы и клетки разделяют, а затем культивируют клетки. В альтернативном варианте осуществления перед культивированием покрытые средством гранулы и клетки не разделяют, а культивируют совместно. В дополнительном варианте осуществления гранулы и клетки сначала концентрируют путем применения силы, такой как сила магнитного поля, что приводит к увеличенному лигированию маркеров клеточной поверхности, таким образом, индуцируя стимуляцию клеток.

В качестве примера, белки клеточной поверхности можно лигировать приведением парамагнитных гранул, к которыми присоединены антитела против CD3 и антитела против CD28 (3×28 гранул), в контакт с Т-клетками. В одном из вариантов осуществления клетки (например, от 10^4 до 10^9 Т-клеток) и гранулы (например, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 Т парамагнитные гранулы в

отношении 1:1) объединяют в буфере, например, PBS (без двухвалентных катионов, таких как, кальций и магний). Вновь специалисты в данной области смогут легко понять, что можно использовать любую концентрацию клеток. Например, клетка-мишень может очень редко встречаться в образце и составлять только 0,01% образца, или весь образец (т.е. 100%) может представлять собой клетку-мишень, представляющую интерес. Таким образом, в контексте настоящего изобретения предусматривается любое число клеток. В определенных вариантов осуществления желательным может являться значительное уменьшение объема, в котором частицы и клетки смешивают друг с другом, (т.е. увеличение концентрации клеток) для обеспечения максимального контакта клеток и частиц. Например, в одном из аспектов используют концентрацию приблизительно 2 миллиарда клеток/мл. В другом варианте осуществления используют более 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных вариантах осуществления используют концентрацию клеток 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 миллионов клеток/мл. В еще одном другом аспекте используют концентрацию клеток от 75, 80, 85, 90, 95 или 100 миллионов клеток/мл. В дополнительных аспектах можно использовать концентрации 125 или 150 миллионов клеток/мл. Использование высоких концентраций может приводить к повышенным выходу клеток, активации клеток и размножению клеток. Кроме того, использование высоких концентраций клеток обеспечивает более эффективный захват клеток, которые могут слабо экспрессировать представляющие интерес антигены-мишени, такие как CD28-отрицательн Т-клетки. Такие популяции клеток могут иметь терапевтическую ценность, и в определенных вариантах осуществления их получение является желательным. Например, использование высокой концентрации клеток обеспечивает более эффективную селекцию CD8+ Т-клеток, которые обычно характеризуются более слабой экспрессией CD28.

В одном из вариантов осуществления клетки, трансдуцированные нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR, например, NKR-CAR, описываемый в настоящем описании, размножают, например, способом, описываемым в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления клетки размножают в культуре в течение

периода от нескольких часов (например, приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 21 час) приблизительно до 14 суток (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 суток). В одном из вариантов осуществления клетки размножают в течение периода от 4 до 9 суток. В одном из вариантов осуществления клетки размножают в течение периода продолжительностью 8 суток или менее, например, 7, 6 или 5 суток. В одном из вариантов осуществления клетки, например, NKR-CAR клетку, описываемую в настоящем описании, размножают в культуре в течение 5 суток, и получаемые клетки являются более активными по сравнению с теми же клетками, размножаемыми в культуре в течение 9 суток в тех же условиях культивирования. Активность можно определять, например, по различным функциям Т-клеток, например, пролиферации, цитолизу клетки-мишени, продукции цитокинов, активации, миграции или их сочетаниям. В одном из вариантов осуществления для клеток, например, NKR-CAR клетки, описываемой в настоящем описании, которые размножали в течение 5 суток, демонстрируют по меньшей мере увеличение в один, два, три или четыре раза удвоения клеток при стимуляции антигеном по сравнению с теми же клетками, которые размножали в культуре в течение 9 суток в тех же условиях культивирования. В одном из вариантов осуществления клетки, например, клетки, экспрессирующие NKR-CAR, описываемый в настоящем описании, размножают в культуре в течение 5 суток, и получаемые клетки характеризуются более высокой продукцией провоспалительных цитокинов, например, уровнями IFN-γ и/или GM-CSF по сравнению с такими же клетками, которые размножали в культуре в течение 9 суток в тех же условиях культивирования. В одном из вариантов осуществления для клеток, например, NKR-CAR клетки, описываемой в настоящем описании, которые размножали в течение 5 суток, демонстрируют увеличение по меньшей мере в один, два, три, четыре, пять, десять раз или более пг/мл продукции провоспалительных цитокинов, например, уровней IFN-γ и/или GM-CSF по сравнению с такими же клетками, которые размножали в культуре в течение 9 суток в тех же условиях культивирования.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения смесь можно культивировать в течение нескольких часов (приблизительно от 3 часов) приблизительно до 14 суток или любой целочисленное значение времени в данном интервале. В другом варианте осуществления смесь можно культивировать в течение 21 суток. В другом варианте осуществления изобретения гранулы и Т-клетки культивируют совместно в течение приблизительно восьми суток. В другом варианте осуществления гранулы и Т-клетки культивируют совместно в течение 2-3 суток. Также желательными могут являться несколько циклов стимуляции, таким образом, что время культивирования Т-клеток может составлять 60 суток или более. Условия, подходящие для культивирования Т-клеток включают подходящую среду (например, минимальные питательные среды или среда RPMI 1640 или X-vivo 15, (Lonza)), которые могут содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, эмбриональную телячью сыворотку или сыворотку человека), интерлейкин 2 (IL-2), инсулин, IFN-γ, IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGFβ и TNF-α или любые другие добавки для роста клеток, известные специалисту в данной области. Другие добавки для роста клеток включают, но не ограничиваются ими, поверхностно-активное вещество, плазманат и восстановители, такие как N-ацетилцистеин и 2-меркаптоэтанол. Среды могут включают RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α-MEM, F-12, X-Vivo 15 и X-Vivo 20, Optimizer с добавленными аминокислотами, пируватом натрия и витаминами, или не содержащие сыворотку, или дополненные подходящим количеством сыворотки (или плазмы), или определенным набором гормонов и/или количеством цитокина(ов), достаточным для роста и размножения Т-клеток. Антибиотики, например, пенициллин и стрептомицин вводят только в экспериментальные культуры, а не в культуры клеток, которые следует вливать индивидууму. Клетки-мишени поддерживают в условиях, необходимых для поддержания роста, например, при определенной температуре (например, 37°C) и атмосфере (например, воздух плюс 5% CO_2).

В одном из вариантов осуществления клетки размножают в подходящей среде (например, среде, описываемой в настоящем описании), которая содержит один или более интерлейкинов, что приводит по меньшей мере к увеличению в 200 раз (например, 200 раз, 250 раз, 300 раз, 350 раз) клеток в течение периода размножения 14 суток, например, как измеряют способом, описываемым в настоящем описании, таким как проточная цитометрия. В одном из вариантов осуществления клетки размножают в присутствии IL-15 и/или IL-7 (например, IL-15 и IL-7).

В вариантах осуществления способы, описываемые в настоящем описании, например, способы получения экспрессирующей CAR клетки, включают удаление регуляторных Т-клеток, например, CD25+ Т-клеток из популяции клеток, например, с использованием антитела против CD25 или его фрагмента, или CD25-связывающего лиганда, IL-2. Способы удаления регуляторных Т-клеток, например, CD25+ Т-клеток из популяции клеток описаны в настоящем описании. В вариантах осуществления способы, например, способы получения дополнительно включают приведение популяции клеток (например, популяции клеток, в которой регуляторные Т-клетки, такие как CD25+ Т-клетки, были истощены, или популяции клеток, которую ранее приводили в контакт с антителом против CD25, его фрагментом или CD25-связывающим лигандом) в контакт с IL-15 и/или IL-7. Например, популяцию клеток (например, которую ранее приводили в контакт с антителом против CD25, его фрагментом или CD25-связывающим лигандом) размножают в присутствии IL-15 и/или IL-7.

В некоторых вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, приводят в контакт с композицией, содержащей полипептид интерлейкина 15 (IL-15), полипептид рецептора альфа интерлейкина 15 (IL-15Ra) или комбинацией полипептида IL-15 и полипептида IL-15Ra, например, hetIL-15, во время получения экспрессирующей CAR клетки, например, *ex vivo*. В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, приводят в контакт с композицией, содержащей полипептид IL-15, во время получения экспрессирующей CAR клетки, например, *ex vivo*. В вариантах

осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, приводят в контакт с композицией, содержащей комбинацию полипептида IL-15 и полипептида IL-15 Ra, во время получения экспрессирующей CAR клетки, например, *ex vivo*. В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, приводят в контакт с композицией, содержащей hetIL-15, во время получения экспрессирующей CAR клетки, например, *ex vivo*.

В одном из вариантов осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, приводят в контакт с композицией, содержащей hetIL-15, во время размножение *ex vivo*. В одном из вариантов осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, приводят в контакт с композицией, содержащей an IL-15 полипептид, во время размножение *ex vivo*. В одном из вариантов осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, приводят в контакт с композицией, содержащей полипептид IL-15 и полипептид IL-15Ra, во время размножение *ex vivo*. В одном из вариантов осуществления приведение в контакт приводит к выживаемости и пролиферации популяции лимфоцитов, например, CD8+ Т-клеток.

Т-клетки, которые подвергали стимуляции в течение различного времени, могут обладать различными характеристиками. Например, характерные продукты мононуклеарных клеток крови или периферической крови после афереза содержат популяцию хелперных Т-клеток (TH, CD4+), которая представляет собой популяцию более цитотоксических или супрессорных Т-клеток (TC, CD8+). Размножение *ex vivo* Т-клеток путем стимуляции рецепторов CD3 и CD28 приводит к популяции Т-клеток, которая приблизительно до суток 8-9 состоит преимущественно из TH-клеток, при этом приблизительно через 8-9 суток, популяция Т-клеток содержит все больше увеличивающуюся популяцию TC-клеток. Таким образом, в зависимости от цели лечения преимущественным может являться инфузия индивидууму популяции Т-клеток, содержащей преимущественно TH-клетки. Аналогично, если выделяли

подпопуляцию ТС-клеток, специфичных к антигену, предпочтительным может являться размножение этой подпопуляции в большей степени.

Кроме того, в дополнение к маркерам CD4 и CD8 значительно изменяются другие фенотипические маркеры, но в значительной степени воспроизводимо во время процесса размножения клеток клетки expansion process. Таким образом, такая воспроизводимость обеспечивает возможность подбирать продукт активированных Т-клеток для конкретных целей.

Альтернативно или в комбинации со способами, описываемыми в настоящем описании, описаны способы и композиции для одного один или более из: детекции и/или количественного определения экспрессирующих CAR клеток (например, *in vitro* или *in vivo* (например, клинический мониторинг)); размножения и/или активации иммунных клеток и/или направленной на CAR селекции, которые включают использование лиганда CAR. В одном иллюстративном варианте осуществления лиганд CAR представляет собой антитело, которое связывается с молекулой CAR, например, связывается с внеклеточным антигенсвязывающим доменом CAR (например, антитело, которое связывается с антигенсвязывающим доменом, например, антиидиотипическое антитело, или антитело, которое связывается с константной областью внеклеточного связывающего домена). В других вариантах осуществления лиганд CAR представляет собой антигенную молекула CAR (например, антигенную молекулу CAR, как описано в настоящем описании).

В одном из аспектов описан способ детекции и/или количественного определения экспрессирующих CAR клеток. Например, лиганд CAR можно использовать для детекции и/или количественного определения экспрессирующих CAR клеток *in vitro* или *in vivo* (например, клинический мониторинг экспрессирующих CAR клеток у пациента или режим дозирования пациента). Способ включает:

- предоставление CAR лиганда (необязательно меченого лиганда CAR, например, лиганда CAR, который содержит метку, гранулу, радиоактивную или флуоресцентную метку);

- приобретение экспрессирующей CAR клетки (например, приобретение образца, содержащего экспрессирующие CAR клетки, такого как промышленный образец или клинический образец);

- приведение экспрессирующей CAR клетка в контакт лигандом CAR в условиях, когда связывание происходит, таким образом, детектируя уровень (например, количество) присутствующих экспрессирующих CAR клеток. Связывание экспрессирующей CAR клетки с лигандом CAR можно детектировать стандартными способами, такими как FACS, ELISA и т.п.

В другом аспекте описан способ размножения и/или активации клеток (например, эффекторных клеток иммунной системы). Способ включает:

- предоставление экспрессирующей CAR клетки (например, первой экспрессирующей CAR клетки или транзиторно экспрессирующей CAR клетки);

- приведение указанной экспрессирующей CAR клетка в контакт с лигандом CAR, например, лигандом CAR, как описано в настоящем описании) в условиях, когда происходит размножение и/или пролиферация иммунных клеток, таким образом, получая активированную и/или размноженную популяцию клеток.

В определенных вариантах осуществления присутствует лиганд CAR (например, является иммобилизованным или прикрепленным к субстрату, например, неприродному субстрату). В некоторых вариантах осуществления субстрат представляет собой неклеточный субстрат. Неклеточный субстрат может представлять собой твердую подложку, выбираемую, например, из планшета (например, планшета для микротитрования), мембраны (например, нитроцеллюлозной мембраны), матрицы, чипа или гранулы. В вариантах осуществления лиганд CAR содержится в субстрате (например, на поверхности субстрата). Лиганд CAR можно иммобилизовать, присоединять или связывать ковалентно или нековалентно (например, сшивать) с субстратом. В одном из вариантов осуществления лиганд CAR является присоединенным (например, ковалентно) к грануле. В указанных выше вариантах осуществления популяцию иммунных клеток можно размножать *in vitro* или *ex vivo*. Способ может дополнительно включают культивирование популяции иммунных клеток

в присутствии лиганда молекулы CAR, например, любым из способов, описываемых в настоящем описании.

В других вариантах осуществления способ размножения и/или активации клетки дополнительно включает добавление второй стимулирующей молекулы, например, CD28. Например, лиганд CAR и вторую стимулирующую молекулу можно иммобилизовать на субстрате, например, одной или более гранул, таким образом, обеспечивая повышенное размножение и/или активацию клеток.

В еще одном аспекте предоставлен способ отбора или обогащения экспрессирующей CAR клетки. Способ включает приведение экспрессирующей CAR клетка в контакт с лигандом CAR, как описано в настоящем описании, и отбор клетки на основании связывания лиганда CAR.

Другие варианты осуществления относятся к способу истощения, снижения и/или цитолиза экспрессирующей CAR клетки. Способ включает приведение экспрессирующей CAR клетка в контакт с лигандом CAR, как описано в настоящем описании, и направленное воздействие на клетку на основании связывания лиганда CAR, таким образом, снижая число и/или уничтожая экспрессирующую CAR клетку. В одном из вариантов осуществления лиганд CAR связывают с токсическим средством (например, токсином или разрушающим клетку лекарственным средством). В другом варианте осуществления антиидиотипическое антитело может вызывать активность эффекторной клетки, например, виды активности ADCC или ADC.

Иллюстративные антитела к CAR, которые можно использовать в способах, описываемых в настоящем описании, описаны, например, в WO 2014/190273 и Jena et al., "Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T cells in Clinical Trials", PLOS March 2013 8:3 e57838, содержание которых включено посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления молекула антиидиотипического антитела распознает молекулу антитела против CD19, например, scFv против CD19. Например, молекула антиидиотипического антитела может конкурировать за связывание с клоном №136.20.1 mAb CAR, специфического к CD19, описанным в Jena et al., PLOS March 2013 8:3 e57838; может содержать такие же CDR (например, один или более, например, все

из CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 CH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL с использованием определения по Kabat, определения по Chothia или комбинации определений по Kabat и Chothia) как клон №136.20.1 mAb CAR, специфического к CD19; может содержать одну или более (например, 2) вариабельных областей как клон №136.20.1 mAb CAR, специфического к CD19, или может содержать клон №136.20.1 mAb CAR, специфического к CD19. В некоторых вариантах осуществления антиидиотипическое антитело получали способом, описанным у Jena et al. В другом варианте осуществления молекула антиидиотипического антитела представляет собой молекулу антиидиотипического антитела, описанную в WO 2014/190273. В некоторых вариантах осуществления молекула антиидиотипического антитела содержит такие же CDR (например, одну или более, например, все из CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 CH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL) как молекула антитела из WO 2014/190273, такая как 136.20.1; может содержать одну или более (например, 2) вариабельных областей молекулы антитела из WO 2014/190273, или может содержать молекулу антитела из WO 2014/190273, такую как 136.20.1. В других вариантах осуществления антитело к CAR связывается с константной областью внеклеточного связывающего домена молекулы CAR, например, как описано в WO 2014/190273. В некоторых вариантах осуществления антитело к CAR связывается с константной областью внеклеточного связывающего домена молекулы CAR, например, константной областью тяжелой цепи (например, шарнирной областью CH2-CH3) или константной областью легкой цепи. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело к CAR конкурирует за связывание с моноклональным антителом 2D3, описанным в WO 2014/190273, содержит такие же CDR (например, одну или более, например, все из CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 CH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL) как 2D3, или содержит одну или более (например, 2) вариабельных областей 2D3, или содержит 2D3, как описано в WO 2014/190273.

В некоторых аспектах и вариантах осуществления композиции и способы в настоящем описании являются оптимизированными для конкретной подпопуляции Т-клеток, например, как описано в US серийный № 62/031699, зарегистрированной 31 июля 2014 года,

содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления оптимизированные подпопуляции Т-клеток характеризуются повышенной устойчивостью по сравнению с контрольной Т-клеткой, например, Т-клеткой другого типа (например, $CD8^+$ или $CD4^+$), экспрессирующей ту же конструкцию.

В некоторых вариантах осуществления $CD4^+$ Т-клетка содержит CAR, описываемый в настоящем описании, где CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, подходящих для (например, оптимизированный для, например, приводящий к повышенной устойчивости) $CD4^+$ Т-клетки, например, домен ICOS. В некоторых вариантах осуществления $CD8^+$ Т-клетка содержит CAR, описываемый в настоящем описании, где CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, подходящий для (например, оптимизированный для, например, приводящий к повышенной устойчивости) $CD8^+$ Т-клетки, например, домен 4-1BB, домен CD28 или другой костимулирующий домен, отличный от домена ICOS. В некоторых вариантах осуществления CAR, описываемый в настоящем описании, содержит антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, CAR, содержащий антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с опухолевым антигеном, описываемы в настоящем описании.

В одном из аспектов в настоящем описании описан способ лечения индивидуума, например, индивидуума, страдающего злокачественной опухолью. Способ включает введение указанному индивидууму эффективного количества:

1) $CD4^+$ Т-клетки, содержащей CAR (CAR^{CD4+})

содержащей:

антигенсвязывающий домен, например, антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с опухолевым антигеном, описываемым в настоящем описании;

трансмембранный домен, и

внутриклеточный сигнальный домен, например, первый костимулирующий домен, например, домен ICOS; и

2) $CD8^+$ Т-клетки, содержащей CAR (CAR^{CD8+}), содержащий:

антигенсвязывающий домен, например, антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с опухолевым антигеном, описываемым в настоящем описании;

трансмембранный домен, и

внутриклеточный сигнальный домен, например, второй костимулирующий домен, например, домен 4-1BB, домен CD28 или другой костимулирующий домен, отличный от домена ICOS;

где CAR^{CD4+} и CAR^{CD8+} отличаются друга от друга.

Необязательно способ дополнительно включает введение:

3) второй CD8+ Т-клетки, содержащей CAR (второй CAR^{CD8+}), содержащий:

антигенсвязывающий домен, например, антигенсвязывающий домен, описываемый в настоящем описании, например, антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с опухолевым антигеном, описываемым в настоящем описании;

трансмембранный домен, и

внутриклеточный сигнальный домен, где второй CAR^{CD8+} содержит внутриклеточный сигнальный домен, например, костимулирующий сигнальный домен, не содержащийся на CAR^{CD8+}, и, необязательно, не содержит сигнальный домен ICOS.

Анализы активности CAR

После того, как CAR, например, NKR-CAR, описываемые в настоящем описании конструируют, можно использовать различные анализы для оценки активности молекулы, такие как, но, не ограничиваясь ими, способность размножаться Т-клеток после стимуляции антигеном, длительное размножение Т-клеток при отсутствии повторной стимуляции и виды активности против злокачественной опухоли на подходящих моделях *in vitro* и моделях на животных. Анализы для оценки эффектов NKR-CAR более подробно описаны ниже.

Анализ вестерн-блоттинга экспрессии NKR-CAR в первичных Т-клетках можно использовать для детекции наличия мономеров и димеров. См., например, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). В очень кратком изложении, Т-клетки (смесь $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток 1:1), экспрессирующие CAR, размножают *in vitro* в

течение более 10 суток с последующим лизисом и SDS-PAGE в восстановительных условиях. CAR детектируют вестерн-блоттингом с использованием антитела, специфического к компонентам CAR, например, компоненту NKR, например, компоненту KIR. Те же подпопуляции Т-клеток используют для анализа SDS-PAGE в невосстановительных условиях для обеспечения оценки ковалентного образования димеров.

Размножение *in vitro* CAR^+ Т-клеток после стимуляции антигеном можно измерять проточной цитометрией. Например, смесь $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток стимулируют aAPC αCD3/αCD28 с последующей трансдукцией лентивирусными векторами, экспрессирующими GFP под контролем промоторов, который необходимо анализировать. Иллюстративные промоторы включают промоторы гена CMV IE, EF-1α, убиквитина С или фосфоглицерокиназы (PGK). Флуоресценцию GFP оценивают на сутки 6 культивирования в подпопуляциях $CD4^+$ и/или $CD8^+$ Т-клеток проточной цитометрией. См., например, Milone et al., Molecular Therapy, 17(8): 1453-1464 (2009). Альтернативно, смесь $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток стимулируют покрытыми αCD3/αCD28 магнитными гранулами на сутки 0 и трансдуцируют CAR на сутки 1 с использованием бицистронного лентивирусного вектора, экспрессирующего CAR наряду с eGFP, с использованием последовательности, вызывающей пропуски рибосомой, 2A. Культуры повторно стимулируют экспрессирующими антиген клетками K562, клетками K562 дикого типа (K562 дикого типа) или клетками отрицательного контроля, которые не экспрессируют опухолевый антиген. Через сутки к культурам добавляют экзогенный IL-2 в концентрации 100 МЕд./мл. GFP^+ Т-клетки подсчитывают проточной цитометрией с использованием подсчета на основе гранул. См., например, Milone et al., Molecular Therapy, 17(8): 1453-1464 (2009).

Также можно измерять поддерживаемое размножение CAR^+ Т-клеток при отсутствии повторной стимуляции. См., например, Milone et al., Molecular Therapy, 17(8): 1453-1464 (2009). В кратком изложении, средний объем Т-клеток (фл) измеряют на сутки 8 культивирования с использованием счетчика частиц Coulter

Multisizer III, Nexcelom Cellometer Vision или Millipore Scepter после стимуляции покрытыми αCD3/αCD28 магнитными гранулами на сутки 0, и трансдукции указанным CAR на сутки 1.

Для измерения активности экспрессирующей CAR клетки также можно использовать модели на животных. Например, можно использовать модель ксенотрансплантатов с использованием специфических к мезотелину человека KIR-CAR$^+$ Т-клеток для лечения первичной злокачественной опухоли человека, которая экспрессирует мезотелин, например, мезотелиомы или рака яичника, на иммунодефицитных мышах. См., например, Milone et al., Molecular Therapy, 17(8): 1453-1464 (2009). В очень кратком изложении, после установления опухоли мышей случайным образом распределяют по группам обработки. Вводят различные количества экспрессирующих CAR Т-клеток. В различных временных точках можно проводить мониторинг экспрессии CAR и пролиферации/устойчивости экспрессирующих CAR клеток. Животных оценивают на прогрессирование опухоли с интервалами продолжительностью неделя. Кривые выживаемости для групп сравнивают с использованием логарифмического рангового критерия. Можно оценивать зависящий от дозы ответ на обработку CAR. См., например, Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009).

Оценка клеточной пролиферации и продукции цитокинов экспрессирующих CAR клеток была описана ранее, например, у Milone et al., Molecular Therapy, 17(8): 1453-1464 (2009). В кратком изложении, оценку опосредованной CAR пролиферации проводят на планшетах для микротитрования смешиванием промытых Т-клеток с клетками K562, экспрессирующим CD19 (K19) или CD32 и CD137 (KT32-BBL) до конечного отношения Т-клетка:K562 2:1. Перед использованием клетки K562 облучают гамма-излучением. Моноклональные антитела против CD3 (клон OKT3) и против CD28 (клон 9.3) добавляют к культурам с клетками KT32-BBL для того, чтобы служить в качестве положительного контроля стимуляции пролиферации Т-клеток, т.к. эти сигналы поддерживают длительное размножение CD8$^+$ Т-клеток *ex vivo*. Т-клетки подсчитывают в

культурах с использованием флуоресцентных гранул CountBright™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) и проточной цитометрии, как описано производителем. CAR+ Т-клетки идентифицируют по экспрессии GFP с использованием Т-клеток, которые конструируют с использованием лентивирусных векторов, экспрессирующих CAR, связанный с eGFP-2A. Для CAR+ Т-клеток, не экспрессирующих GFP, CAR+ Т-клетки детектируют с использованием биотинилированного рекомбинантного белка опухолевого антигена и вторичного конъюгата авидин-PE. Также можно одновременно детектировать экспрессию CD4+ и CD8+ на Т-клетках специфическими моноклональными антителами (BD Biosciences). Измерения цитокинов проводят в супернатантах, собираемых через 24 часа после повторной стимуляции с использованием набора human TH1/TH2 cytokine cytometric bead array (BD Biosciences, San Diego, CA) по инструкциям производителей или с использованием набора Luminex 30-plex (Invitrogen). Флуоресценцию оценивают с использованием проточного цитометра BD Fortessa и анализируют данные по инструкциям производителя. Аналогичные эксперименты можно проводить с CD123S CART.

Цитотоксичность можно оценивать стандартным анализом высвобождения 51Cr. См., например, Milone et al., Molecular Therapy., 17(8): 1453-1464 (2009). В кратком изложении, клетки-мишени (линии K562, экспрессирующие опухолевый антиген, и первичные опухолевые клетки) нагружают 51Cr (в виде $NaCrO_4$, New England Nuclear, Boston, MA) при 37°C в течение 2 часов при частом перемешивании, промывают дважды в полной RPMI и высевают на планшеты для микротитрования. Эффекторные Т-клетки смешивают с клетками-мишени в лунках в полной RPMI в различных отношениях эффекторная клетка:клетка-мишень (E:T). Также подготавливают дополнительные лунки, содержащие только среду (спонтанное высвобождение, SR) или 1% раствор детергента Triton-X 100 (полное высвобождение, TR). Через 4 часа инкубации при 37°C собирают супернатант из каждой лунки. Затем измеряют высвобождаемый 51Cr с использованием счетчика гамма-частиц (Packard Instrument Co., Waltham, MA). Каждое условие проводят

по меньшей мере в тех повторениях и рассчитывают процент лизиса с использованием формулы: % лизиса=(ER-SR)/(TR-SR), где ER представляет собой средний 51Cr, высвобождаемый при каждом экспериментальном условии.

Для оценки специфической миграция и пролиферации CAR на модели на животных, несущих опухоль, можно использовать способы визуализации. Такие анализы были описаны, например, у Barrett et al., Human Gene Therapy, 22:1575-1586 (2011). В кратком изложении, мышей NOD/SCID/$\gamma c^{-/-}$ (NSG) инъецируют в/в клетками Nalm-6 с последующей инъекцией через 7 суток Т-клетками через 4 часа после электропорации конструкциями CAR. Т-клетки стабильно трансфицируют лентивирусной конструкцией для экспрессии люциферазы светляков и проводят визуализацию биолюминесценции у мышей. Альтернативно, можно измерять терапевтическую эффективность и специфичность однократной инъекции CAR^+ Т-клеток на модели ксенотрансплантата Nalm-6 так, как указано ниже: мышей NSG инъецируют Nalm-6, трансдуцированными для стабильной экспрессии люциферазы светляков с последующей однократной инъекцией в хвостовую вену Т-клеток, электропорированных CAR, через 7 суток. Визуализацию у животных проводили в различные моменты времени после инъекции. Например, можно получать тепловые карты плотности фотонов лейкоза положительного по люциферазе светляков у репрезентативных мышей на сутки 5 (за 2 суток до обработки) и сутки 8 (через 24 часа после CAR^+ PBL).

Для оценки конструкции CAR по изобретению также можно использовать другие анализы, включая анализы, описанные в разделе примеры в настоящем описании, а также анализы, которые известны в данной области.

Терапевтическое применение

Настоящее изобретение относится к клетке (например, Т-клетке или NK-клетке), модифицированной так, чтобы экспрессировать NKR-CAR, например, KIR-CAR, или к совокупности типов NKR-CAR, например, KIR-CAR, где каждый NKR-CAR, например, KIR-CAR объединяет антигенраспознающий домен специфического антитела с компонентом NKR, например, KIR.

В одном из вариантов осуществления KIR-CAR по изобретению содержат активирующий KIR, который доставляет свой сигнал через взаимодействие с иммунорецепторным тирозиновым активирующим мотивом (ITAM), содержащим мембранный белок DAP12, которое опосредовано остатками в трансмембранных доменах этих белков.

В одном из вариантов осуществления KIR-CAR по изобретению содержат ингибирующий KIR, который доставляет свой сигнал через один или более иммунорецепторных тирозиновых ингибирующих мотивов (ITIM), которые взаимодействуют непосредственно или опосредованно с цитоплазматическими сигнальными белками, такими как SHP-1, SHP-2 и семейство белков Vav. KIR, несущие цитоплазматические домены, которые содержат (ITIM), отменяют активирующий сигнал, что приводит к ингибированию цитолитической активности и активности продукции цитокинов NK. В некоторых случаях модифицированная Т-клетка, экспрессирующая KIR-CAR по изобретению, может вызывать опосредованный KIR-CAR Т-клеточный ответ. В одном из вариантов осуществления зависимость связывания более чем одного типа антигена обеспечивает возможность модифицированной Т-клетке обладать повышенной специфичностью вызывать ответ при связывании опухолевой клетки, а не при связывании нормальной не вовлеченной в процесс клетки.

Изобретение относится к использованию совокупности типов KIR- CAR для направления специфичности первичной Т-клетки к опухолевому антигену. Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу стимуляции опосредованного Т-клетками иммунного ответа на популяцию клеток-мишеней или ткани у млекопитающего, включающему этап введения млекопитающему Т-клетки, которая экспрессирует совокупность типов KIR-CAR, где каждый тип KIR-CAR содержит связывающую молекулу, которая специфически взаимодействует с предопределенной мишенью. В одном из вариантов осуществления клетка содержит первый KIR-CAR, содержащий активирующий KIR (actKIR-CAR), и второй KIR-CAR, содержащий ингибирующий KIR (inhKIR-CAR).

Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, противоопухолевый иммунный ответ, вызываемый модифицированными KIR-CAR Т-клетками, может представлять собой активный или

пассивный иммунный ответ. Кроме того, опосредованный KIR-CAR иммунный ответ может являться частью подхода адоптивной иммунотерапии, в котором модифицированные KIR-CAR Т-клетки индуцируют иммунный ответ, специфический к антигенсвязывающему домену в KIR-CAR.

Злокачественные опухоли, которые можно лечить, включают опухоли, которые не являются васкуляризированными или не являются еще по существу васкуляризированными, а также васкуляризированные опухоли. Злокачественные опухоли могут включать несолидные опухоли (такие как гематологические опухоли, например, лейкозы и лимфомы) или могут включать солидные опухоли. Типы злокачественных опухолей, которые лечат CAR по изобретению, включают, но не ограничиваются ими, карциному, бластому и саркому и определенные типы лейкоза или лимфоидные злокачественны новообразования, доброкачественные и злокачественные опухоли и злокачественные новообразования например, саркомы, карциномы и меланомы. Также включают опухоли/злокачественные опухоли взрослых и опухоли/злокачественные опухоли детей. В одном из вариантов осуществления злокачественная опухоль, которую необходимо лечить, представляет собой солидную опухоль, например, солидную опухоль, описываемую в настоящем описании.

Гематологические злокачественные опухоли представляют собой злокачественные опухоли крови или костного мозга. Примеры гематологических (или гематогенных) злокачественных опухолей включают лейкозы, включая острые лейкозы (такие как острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз и миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный лейкоз и эритролейкоз), хронические лейкозы (такие как хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический миелогенный лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз), истинную полицитемию, лимфому, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому (индолентные формы и формы высокой степени), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей,

миелодиспластический синдром, волосатоклеточный лейкоз и миелодисплазию.

Солидные опухоли представляют собой аномальные массы ткани, которая, как правило, не содержит кист или жидких областей. Солидные опухоли могут являться доброкачественными или злокачественными. Различные типы солидных опухолей называют по типу клеток, которые их образуют (такие саркомы, карциномы и лимфомы). Примеры солидных опухолей, таких как саркомы и карциномы, включают фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеосаркому и другие саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному толстой кишки, лимфоидное злокачественное новообразование, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак легких, рак яичника, рак предстательной железы, печеночноклеточную карциному, плоскоклеточную карциному, базально-клеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, медуллярную карциному щитовидной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, феохромоцитомы, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечноклеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль семенников, семиному, карциному мочевого пузыря, меланому и опухоли ЦНС (такие как глиома (такую как глиома ствола головного мозга и смешанные глиомы), глиобластому (также известную как мультиформная глиобластома) астроцитому, лимфому ЦНС, герминому, медуллобластому, шванному, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, неврому слухового нерва, олигодендроглиому, менингиому, нейробластому, ретинобластому и метастазы в головном мозге).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли путем предоставления индивидууму, нуждающемуся в этом, эффекторных клеток иммунной системы (например, Т-клеток, NK-клеток), которые конструируют так, чтобы они экспрессировали CD19 CAR, например, со связывающим доменом против CD19, описываемым в настоящем

описании, где злокачественные клетки экспрессируют CD19. В одном из вариантов осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой ALL (острый лимфобластный лейкоз), CLL (хронический лимфоцитарный лейкоз), DLBCL (диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому), MCL (лимфому мантийных клеток) или ММ (множественную миелому).

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли путем предоставления индивидууму, нуждающемуся в этом, эффекторных клеток иммунной системы (например, Т-клеток, NK-клеток), которые конструировали так, чтобы они экспрессировали EGFRvIIICAR, например, со связывающим доменом против EGRFvIII, описываемым в настоящем описании, где злокачественные клетки экспрессируют EGFRvIII. В одном из вариантов осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой глиобластому.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли путем предоставления индивидууму, нуждающемуся в этом, эффекторных клеток иммунной системы (например, Т-клеток, NK-клеток), которые конструировали так, чтобы они экспрессировали CAR к мезотелину, например, со связывающим доменом против мезотелина, описываемым в настоящем описании, где злокачественные клетки экспрессируют мезотелин. В одном из вариантов осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой солидную опухоль, например, солидную опухоль, описываемую в настоящем описании, например, мезотелиому, рак поджелудочной железы, рак легких или рак яичника.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли путем предоставления индивидууму, нуждающемуся в этом, эффекторных клеток иммунной системы (например, Т-клеток, NK-клеток), которые конструировали так, чтобы они экспрессировали CD123CAR, например, со связывающим доменом против CD123, описываемым в настоящем описании, где злокачественные клетки экспрессируют CD123. В одном из вариантов осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой AML.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли путем предоставления индивидууму, нуждающемуся в этом, эффекторных клеток иммунной системы (например, Т-клеток, NK-клеток), которые конструировали так, чтобы они экспрессировали CLL-1CAR, например, со связывающим доменом против CLL-1, описываемым в настоящем описании, где злокачественные клетки экспрессируют CLL-1. В одном из вариантов осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой AML.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли путем предоставления индивидууму, нуждающемуся в этом, эффекторных клеток иммунной системы (например, Т-клеток, NK-клеток), которые конструировали так, чтобы они экспрессировали CD33CAR, например, со связывающим доменом против CD33, описываемым в настоящем описании, где злокачественные клетки экспрессируют CD33. В одном из вариантов осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой AML.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли путем предоставления индивидууму, нуждающемуся в этом, эффекторных клеток иммунной системы (например, Т-клеток, NK-клеток), которые конструировали так, чтобы они экспрессировали GD2CAR, например, со связывающим домен против GD2, описываемым в настоящем описании, где злокачественные клетки экспрессируют GD2. В одном из вариантов осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой нейробластому.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли путем предоставления индивидууму, нуждающемуся в этом, эффекторных клеток иммунной системы (например, Т-клеток, NK-клеток), которые конструировали так, чтобы они экспрессировали о-ацетил-GD2CAR, где злокачественные клетки экспрессируют о-ацетил-GD2. В одном из вариантов осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой нейробластому или меланому.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли путем предоставления индивидууму, нуждающемуся в этом, эффекторных клеток иммунной системы (например, Т-клеток, NK-клеток), которые конструировали так, чтобы они экспрессировали BCMACAR, например, со связывающим доменом против BCMA, описываемым в настоящем описании, где злокачественные клетки экспрессируют BCMA. В одном из вариантов осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой множественную миелому.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли путем предоставления индивидууму, нуждающемуся в этом, эффекторных клеток иммунной системы (например, Т-клеток, NK-клеток), которые конструировали так, чтобы они экспрессировали CLDN6CAR, например, со связывающим доменом против CLDN6, описываемым в настоящем описании, где злокачественные клетки экспрессируют CLDN6. В одном из вариантов осуществления злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой солидную опухоль, например, солидную опухоль, описываемую в настоящем описании, например, рак яичника, рак легких или рак молочной железы.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли путем предоставления индивидууму, нуждающемуся в этом, эффекторных клеток иммунной системы (например, Т-клеток, NK-клеток), которые конструировали так, чтобы они экспрессировали WT1CAR, например, со связывающим доменом против WT1, описываемым в настоящем описании, где злокачественные клетки экспрессируют WT1.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающий домен KIR-CAR клеток, например, Т-клеток или NK-клеток по изобретению предназначены для лечения конкретной злокачественной опухоли. В одном из вариантов осуществления KIR-CAR клетки, например, Т-клетки или NK-клетки по изобретению модифицируют так, чтобы они экспрессировали первый actKIR-CAR, нацеленный на первый антиген, и второй inhKIR-CAR, нацеленный на второй антиген, где первый антиген экспрессируется на конкретной опухоли или злокачественной опухоли, и второй антиген не экспрессируется на

конкретной опухоли или злокачественной опухоли. Таким образом, получают условную активацию Т-клеток в результате участия actKIR-CAR (или стандартного TCR-дзета CAR, несущего scFv к антигену на представляющей интерес злокачественной клетке) и inhKIR-CAR, несущего, например, scFv, направленный против антигена, который присутствует на нормальной, но не злокачественной ткани, что обеспечивает ингибирование активирующего сигнала от actKIR-CAR, когда KIR-CAR Т-клетка встречает нормальные клетки. Примеры антигенов, которые служат в качестве пригодных мишеней для ингибирующих CAR, включают рецепторы эфринов (Pasquale, 2010, Nat. Rev. Cancer, 10(3):165-80) и клаудины (Singh et al., 2010, J. Oncol., 2010:541957), которые экспрессируются эпителиальными клетками из нормальных тканей, но часто селективно утрачены злокачественными опухолями (например, EPHA7).

Терапевтические применения для заболеваний и нарушений, при которых экспрессируется мезотелин

Настоящее изобретение относится к композициям и способам лечения заболеваний и нарушений, связанных с экспрессией мезотелина. Примеры заболевания или нарушения, связанного с экспрессией мезотелина, включают мезотелиому (например, мезотелиому плевры, перитонеальную мезотелиому, перикардиальную мезотелиому), рак поджелудочной железы или рак яичника. Заболевание или нарушение, связанное с экспрессией мезотелина, представляет собой солидную опухоль, описываемую в настоящем описании.

Злокачественная мезотелиома представляет собой тип злокачественной опухоли, которая возникает в тонком слое клеток, выстилающих внутренние органы организма, известном как мезотелий. Существует три установленных типа мезотелиомы. Мезотелиома плевры (например, злокачественная мезотелиома плевры или MPM) является наиболее распространенной формой заболевания, составляя приблизительно 70% случаев, и встречается в выстилке легкого, известной как плевра. Перитонеальная мезотелиома возникает в выстилке брюшной полости, известной как брюшина.

Перикардиальный мезотелиома образуется в перикарде, который выстилает сердце.

Индивидуум может подвергаться риску развития мезотелиомы, если индивидуум подвергался воздействию асбеста. Воздействие асбеста и ингаляция частиц асбеста может вызывать мезотелиому. В большинстве случаев симптомы мезотелиомы не появляются у индивидуума, подвергавшемуся воздействию асбеста, на протяжении многих лет после подвержения воздействию асбеста.

Симптомы мезотелиомы плевры включают, например, боль в пояснице или боль в груди сбоку и затрудненное дыхание. Другие симптомы включают затруднение при глотании, устойчивый кашель, лихорадку, потерю массы тела или усталость. Дополнительные симптомы, которые некоторые пациенты испытывают, представляют собой мышечную слабость, потерю сенсорной способности, откашливание крови, отек лица и рук и охриплость голоса. На ранних стадиях заболевания, таких как мезотелиома 1 стадии, симптомы могут являться умеренными. Пациенты, как правило, жалуются на боль в одной области грудной клетки, которая никогда не проходит, потерю массы тела и лихорадку.

Перитонеальная мезотелиома возникает в брюшной полости, и в результате симптомы часто включают боль в животе, потерю массы тела, тошноту и рвоту. Может происходить накопление жидкости в брюшной полости, а также в результате злокачественной опухоли. Перитонеальная мезотелиома возникает в брюшной полости и часто распространяется на другие органы в области, включающей печень, селезенку или кишечник. Тяжелая боль в животе является наиболее распространенной жалобой, с которой пациенты сначала обращаются. Также может присутствовать дискомфортный уровень с накоплением жидкости в брюшной полости. Другие симптомы перитонеальной мезотелиомы могут включать затруднение при опорожнении кишечника, тошноту и рвоту, лихорадку и отекшие ноги.

Мезотелиома перикарда является наименее распространенной формой мезотелиомы. Мезотелиома перикарда, как видно из названия, поражает сердце. Этот редкий тип злокачественной опухоли типа мезотелиомы поражает перикард, оболочку, которая окружает сердце. По мере прогрессирования злокачественной

опухоли сердце становится неспособным доставлять кислород также эффективно в организме, что вызывает дальнейшее снижение уровня здоровья с возрастающей скоростью. Симптомы, наиболее часто ассоциированные с мезотелиомой перикарда, имитируют симптомы инфаркта миокарда: тошнота, боль в грудной клетке и затрудненное дыхание.

Индивидуумы, для которых лечение по изобретению является эффективным, включают индивидуумов с мезотелиомой или индивидуумов, у которых подозревают мезотелиому, например, о чем свидетельствует наличие одного или более симптомов, описываемых в настоящем описании, и/или подвержение воздействию асбеста. В конкретных вариантах осуществления мезотелиома представляет собой мезотелиому плевры (например, злокачественную мезотелиому плевры). В других аспектах можно лечить индивидуума, который страдает предраковым состоянием, таким как, например, плевральные бляшки, доброкачественная мезотелиома или мезотелиальная гиперплазия.

Другой пример заболевания или нарушения, связанного с мезотелином, представляет собой рак поджелудочной железы. Виды рака поджелудочной железы, которые можно лечить способами, описываемыми в настоящем описании, включают, но не ограничиваются ими, экзокринные виды рака поджелудочной железы и эндокринные виды рака поджелудочной железы. Экзокринные вида рака поджелудочной железы включают, но не ограничиваются ими, аденокарциномы, карциномы ацинозных клеток, аденосквамозные карциномы, коллоидные карциномы, недифференцированные карциномы с остеокласт-подобными гигантским клетками, гепатоидные карциномы, внутрипротоковые папиллярно-муцинозные неоплазии, муцинозные кистозные неоплазии, панкреатобластомы, серозные цистаденомы, перстневидноклеточные карциномы, солидные и псевдопапиллярные опухоли, карциномы поджелудочной железы и недифференцированные карциномы. В некоторых вариантах осуществления экзокринная рак поджелудочной железы представляет собой карциному поджелудочной железы. Эндокринные виды рака поджелудочной железы включают, но не ограничиваются ими, инсулиномы и глюкагономы.

В некоторых вариантах осуществления рак поджелудочной железы представляет собой любой рак поджелудочной железы на ранней стадии, неметастатический рак поджелудочной железы, первичный рак поджелудочной железы, рак резецированной поджелудочной железы, рак поджелудочной железы на поздней стадии, местно-распространенный рак поджелудочной железы, метастатический рак поджелудочной железы, нерезектабельный рак поджелудочной железы, рак поджелудочной железы в состоянии ремиссии, рецидивирующий рак поджелудочной железы, рак поджелудочной железы при адъювантной терапии или рак поджелудочной железы при неадювантной терапии. В некоторых вариантах осуществления рак поджелудочной железы представляет собой местно-распространенный рак поджелудочной железы, нерезектабельный рак поджелудочной железы или метастатическую карциному поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак поджелудочной железы является резистентным к терапии на основе гемцитабина. В некоторых вариантах осуществления рак поджелудочной железы является рефрактерным к is терапии на основе гемцитабина.

В других аспектах нарушение, связанное с экспрессией мезотелина, представляет собой рак яичника. Рак яичника классифицируют в соответствии с гистологией опухоли. Поверхностная эпителиально-стромальная опухоль, также известная как эпителиальная карцинома яичника, является наиболее распространенным типом рака яичника. Он включает серозную опухоль (включая серозные папиллярные цистаденокарцинома), эндометриоидную опухоль и слизеобразующую цистаденокарциному.

Способы, описываемые в настоящем описании, можно использовать для лечения различных стадий рака яичника, например, стадии I, стадии II, стадии III или стадии IV. Определение стадии можно проводить, например, когда удаляют рак яичника. Стадию рака яичника определяют так, как указано ниже:

Злокачественная опухоль I стадии ограничена одним или обоями яичниками. Злокачественная опухоль соответствует II стадии, если вовлечены один или оба яичника, и она распространяется на матку и/или фаллопиевые трубы или другие

участки таза. Злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль III стадии, если вовлечены один или оба яичника, и она распространяется в лимфоузлы или другие участки вне таза, но все еще находится в брюшной полость, такой как поверхность кишечника или печень. Злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль IV стадии, если вовлечены один или оба яичники, и злокачественная опухоль распространилась за пределы брюшной полости или внутрь печени.

В некоторых вариантах осуществления рак яичника является резистентным к одному или более химиотерапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления рак яичника является рефрактерным к одному или более химиотерапевтических средств.

Другие злокачественные опухоли, которые можно лечить композициями CAR, описываемыми в настоящем описании, включают, например, злокачественную опухоль головного мозга, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак печени, рак почки, лимфома, лейкоз, рак легких (например, аденокарциному легких), меланому, метастатическую меланому, мезотелиому, нейробластому, рак яичника, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, злокачественную опухоль почки, рак кожи, тиому, саркому, неходжкинскую лимфому, лимфома Ходжкина, рак матки и любое их сочетание.

Настоящее изобретение относится к способам ингибирования пролиферации или уменьшения популяции экспрессирующих мезотелин клеток, где способы включают приведение популяции клеток, содержащей экспрессирующую мезотелин клетку, в контакт с экспрессирующей CAR к мезотелину клеткой по изобретению, которая связывается с экспрессирующей мезотелин клеткой. В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способам ингибирования пролиферации или уменьшения популяции злокачественных клеток, экспрессирующих мезотелин, где способы включают приведение популяции клеток, содержащей экспрессирующую мезотелин клетку, в контакт с экспрессирующей CAR к мезотелину клеткой, по изобретению, которая связывается с экспрессирующей мезотелин клеткой. В другом варианте осуществления изобретение относится к способам ингибирования пролиферации или уменьшения

популяции злокачественных клеток, экспрессирующих мезотелин, где способы включают приведение популяции экспрессирующих мезотелин злокачественных клеток с экспрессирующей CAR к мезотелину клеткой по изобретению, которая связывается с экспрессирующей мезотелин клеткой. В определенных вариантах осуществления экспрессирующая CAR к мезотелину клетка по изобретению снижает содержание, число, количество или процент клеток и/или злокачественных клеток по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% у индивидуума с мезотелиомой или другой злокачественной опухолью, связанной с экспрессирующими мезотелин клетками, или на модели на животных мезотелиомы или другой злокачественной опухоли, связанной с экспрессирующими мезотелин клетками, относительно отрицательного контроля. В одном из аспектов индивидуум является человеком.

Изобретение также относится к способам профилактики, лечения и/или ведения нарушения, связанного с экспрессирующими мезотелин клетками (например, мезотелиомы), где способы включают введение индивидууму, нуждающемуся в этом, экспрессирующей CAR к мезотелиоме клетки по изобретению, которая связывается с экспрессирующей мезотелин клеткой. В одном из аспектов индивидуум является человеком.

Изобретение относится к способам профилактики рецидива злокачественной опухоли, связанной с экспрессирующими мезотелин клетками, где способы включают введение нуждающемуся в этом индивидууму экспрессирующей CAR к мезотелину клетки по изобретению, которая связывается с экспрессирующей мезотелин клеткой. В другом варианте осуществления способы включают введение нуждающемуся в этом индивидууму эффективного количества экспрессирующей CAR к мезотелину клетки по изобретению, которая связывается с экспрессирующей мезотелин клеткой, в комбинации с эффективным количеством другой терапии.

В одном из аспектов изобретение относится к вектору, содержащему последовательность, кодирующую CAR к мезотелину,

функционально связанную с промотором для экспрессии в эффекторных клетках иммунной системы млекопитающих. В одном из аспектов изобретение относится к рекомбинантной эффекторной клетке иммунной системы, экспрессирующей CAR к мезотелину, для применения в лечении экспрессирующих мезотелин опухолей. В одном из аспектов экспрессирующая CAR к мезотелину клетка по изобретению способна контактировать с опухолевой клеткой по меньшей мере одним CAR к мезотелину по изобретению, экспрессируемым на ее поверхности, таким образом, что экспрессирующая CAR к мезотелину клетка активируется в ответ на антиген, и экспрессирующая CAR клетка направленно воздействует на злокачественную клетку, и рост злокачественной опухоли ингибируется.

В одном из аспектов изобретение относится к способу ингибирования роста экспрессирующей мезотелин злокачественной клетки, включающему приведение опухолевой клетки в контакт с экспрессирующей CAR к мезотелину клеткой, таким образом, что экспрессирующая CAR клетка активируется в ответ на антиген и направленно воздействует на злокачественную клетку, где рост злокачественной опухоли ингибируется. В одном из аспектов активированный CART направленно воздействует и вызывает гибель злокачественной клетки.

В одном из аспектов изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у индивидуума. Способ включает введение индивидууму экспрессирующей CAR к мезотелину клетки, таким образом, проводят лечение злокачественной опухоли у индивидуума. Примером злокачественной опухоли, которую можно лечить экспрессирующей CAR к мезотелину клеткой по изобретению, является злокачественная опухоль, связанная с экспрессией мезотелина. В одном из аспектов злокачественная опухоль, связанная с экспрессией мезотелина, выбрана из мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака яичника и рака легких.

Изобретение относится к типу клеточной терапии, где эффекторные клетки иммунной системы, например, Т-клетки или NK-клетки, генетически модифицируют так, чтобы они экспрессировали химерный антигенный рецептор (CAR), и экспрессирующую CAR клетку

вводят инфузией нуждающемуся в этом реципиенту. Инфузируемая клетка способна вызывать цитолиз опухолевых клеток у реципиента. В отличие от видов терапии антителами, модифицированные CAR эффекторные клетки иммунной системы способны реплицироваться *in vivo*, что приводит к длительному сохранению, что может приводить к постоянному подавлению опухоли. В различных аспектах клетки, вводимые пациенту или их потомство сохраняется у пациента по меньшей мере в течение четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцы, семь месяцы, восемь месяцы, девять месяцы, десять месяцы, одиннадцать месяцы, двенадцать месяцы, тринадцать месяцы, четырнадцать месяц, пятнадцати месяцев, шестнадцати месяцев, семнадцати месяцев, восемнадцати месяцев, девятнадцати месяцев, двадцати месяцев, двадцати одного месяца, двадцати двух месяцев, двадцати трех месяцев, двух лет, трех лет, четырех лет или пяти лет после введения клетки пациенту.

Изобретение также относится к типу клеточной терапии, где эффекторные клетки иммунной системы модифицируют, например, транскрибируемой *in vitro* РНК для транзиторной экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), и вводят инфузией экспрессирующую CAR клетку нуждающемуся в этом реципиенту. Инфузируемая клетка способна вызывать цитолиз злокачественных клеток у реципиента. Таким образом, в различных аспектах вводимые пациенту клетки присутствуют в течение менее чем одного месяца, например, трех недель, двух недель, одной недели после введения клетки пациенту.

Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, противораковый иммунный ответ, вызываемый модифицированными CAR эффекторными клетками иммунной системы, может представлять собой активный или пассивный иммунный ответ или, альтернативно, может быть обусловлен прямым и косвенным иммунным ответом. В одном из аспектов трансдуцированные CAR Т-клетки характеризуются секрецией специфических провоспалительных цитокинов и высокой цитолитической активностью в ответ на злокачественные клетки человека, экспрессирующие мезотелин, и опосредуют неспецифический цитолиз, и опосредуют регрессию установившейся опухоли человека. Например, утратившие антиген опухолевые клетки

в гетерогенном поле экспрессирующей мезотелин опухоли могут являться чувствительными к непрямому разрушению перенаправленными к мезотелину Т-клетками, которые ранее действовали против смежных антиген-положительных злокачественных клеток.

В одном из аспектов несущие полностью принадлежащий человеку scFv, модифицированные CAR эффекторные клетки иммунной системы по изобретению могут представлять собой тип вакцины для иммунизации *ex vivo* и/или терапии *in vivo* у млекопитающего. В одном из аспектов млекопитающее является человеком.

В отношении иммунизации *ex vivo*, по меньшей мере один из следующих ниже этапов проводят *in vitro* перед введением клетки млекопитающему: i) размножение клеток, ii) введение нуклеиновой кислоты, кодирующей KIR-CAR, в клетки и/или iii) криоконсервацию клеток.

Способы *ex vivo* хорошо известны в данной области и более подробно описаны ниже. В кратком изложении, клетки выделяют у млекопитающего (предпочтительно человека) и генетически модифицируют (т.е. трансдуцируют или трансфицируют *in vitro*) вектором, экспрессирующим KIR-CAR, описываемый в настоящем описании. Модифицированную KIR-CAR клетку можно вводить являющемуся млекопитающим реципиенту для обеспечения терапевтического действия. Являющийся млекопитающим реципиент может представлять собой человека, и модифицированная KIR-CAR клетка может являться аутологичной по отношению к реципиенту. Альтернативно, клетки могут являться аллогенными, изогенными или ксеногенными по отношению к реципиенту.

Способ размножения *ex vivo* гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников, описанный в патенте США № 5199942, включенном в настоящее описание посредством ссылки, можно применять по отношению к клеткам по настоящему изобретению. Другие подходящие способы известны в данной области, таким образом, настоящее изобретение не ограничено каким-либо конкретным способом размножения клеток *ex vivo*. В кратком изложении культивирование *ex vivo* и размножение Т-клеток включает: (1) сбор CD34+ гемопоэтических стволовых клеток и

клеток-предшественников от млекопитающего из образца периферической крови или эксплантатов костного мозга; и (2) размножение таких клеток *ex vivo*. Для культивирования и размножения клеток в дополнение к факторам роста клеток, описанным в патенте США № 5199942, можно использовать другие факторы, такие как flt3-L, IL-1, IL-3 и лиганд c-kit.

В дополнение к использованию вакцины на основе клеток в отношении иммунизации *ex vivo* настоящее изобретение также относится к композициям и способам иммунизации *in vivo* для взывания иммунного ответа, направленного против антигена, у пациента.

Как правило, клетки, активированные и размноженные, как описано в настоящем описании, можно использовать в лечении и профилактике заболеваний, которые возникают у индивидуумов, у которых ослаблена иммунная система. В частности, модифицированные KIR-CAR Т-клетки по изобретению используют для лечения злокачественной опухоли. В определенных вариантах осуществления клетки по изобретению используют для лечения пациентов, подвергающихся риску развития злокачественной опухоли. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам для лечения или профилактики злокачественной опухоли, включающему введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества модифицированных KIR-CAR Т-клеток по изобретению.

Модифицированные KIR-CAR Т-клетки по настоящему изобретению можно вводить отдельно или в виде фармацевтической композиции в комбинации с разбавителями и/или другими компонентами, такими как IL-2 или другие цитокины, или популяции клеток. В кратком изложении, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать популяцию клеток-мишеней, как описано в настоящем описании, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки;

полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как EDTA или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Композиции по настоящему изобретению предпочтительно формулируют для внутривенного введения.

Настоящее изобретение также относится к способам ингибирования пролиферации или уменьшения популяции экспрессирующих мезотелин клеток, где способы включают приведение популяции клеток, содержащей экспрессирующую мезотелин клетку, в контакт с экспрессирующей CAR к мезотелину клеткой (например, NKR-CAR по изобретению, которая связывается с экспрессирующей мезотелин клеткой). В конкретном аспекте изобретение относится к способам ингибирования пролиферации или уменьшения популяции злокачественных клеток, экспрессирующих мезотелин, где способы включают приведение популяции экспрессирующих мезотелин злокачественных клеток в контакт с экспрессирующей CAR к мезотелину клеткой по изобретению, которая связывается с экспрессирующей мезотелин клеткой. В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способам ингибирования пролиферации или уменьшения популяции злокачественных клеток, экспрессирующих мезотелин, где способы включают приведение популяции экспрессирующих мезотелин злокачественных клеток в контакт с экспрессирующей CAR к мезотелину клеткой по изобретению, которая связывается с экспрессирующей мезотелин клеткой. В определенных аспектах экспрессирующая CAR к мезотелину клетка по изобретению уменьшает содержание, число, количество или процент клеток и/или злокачественных клеток по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% у индивидуума с мезотелиомой или другой злокачественной опухолью, связанной с экспрессирующими мезотелин клетками, или на модели на животных мезотелиомы или другой злокачественной опухоли, связанной с экспрессирующими мезотелин клетками, относительно

отрицательного контроля. В одном из аспектов индивидуум является человеком.

Настоящее изобретение также относится к способам профилактики, лечения и/или ведения заболевания, связанного с экспрессирующими мезотелин клетками (например, мезотелиомы), где способы включает введение нуждающемуся в этом индивидууму экспрессирующей CAR к мезотелину клетки по изобретению, которая связывается с экспрессирующей мезотелин клеткой. В одном из аспектов индивидуум является человеком.

Настоящее изобретение относится к способам профилактики рецидива злокачественной опухоли, связанной с экспрессирующими мезотелин клетками, где способы включают введение нуждающемуся в этом индивидууму экспрессирующей CAR к мезотелину клетки по изобретению, которая связывается с экспрессирующей мезотелин клеткой. В одном из аспектов способы включают введение нуждающемуся в этом индивидууму эффективного количества экспрессирующей CAR к мезотелину клетки по изобретению, которая связывается с экспрессирующей мезотелин клеткой, в комбинации с эффективным количеством другой терапии.

Способы комбинированного лечения

Экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, можно использовать в комбинации с другими известными средствами и видами терапии. Вводимый "в комбинации", как используют в настоящем описании, означает, что два (или более) различных лекарственных препаратов доставляют индивидууму во время течения заболевания у индивидуума, например, два или более лекарственных препаратов доставляют после того, как у индивидуума диагностировали нарушение и до того, как прошло или было устранено нарушение, или было прекращено лечение по другим причинам. В некоторых вариантах осуществления доставку одного лекарственного препарата все еще сохраняют, когда начинают проводить доставку второго лекарственного препарата, таким образом, существует перекрытие введения. В некоторых случаях это обозначают в настоящем описании как "одномоментная" или "сопутствующая доставка". В других вариантах осуществления доставка одного лекарственного препарата заканчивается до того,

как начинается доставка другого лекарственного препарата. В некоторых вариантах осуществления этого случая лекарственный препарат является более эффективным вследствие комбинированного введения. Например, второй лекарственный препарат является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдают при меньшей количестве второго лекарственного препарата, или второй лекарственный препарат уменьшает симптомы в большей степени, чем в том, случае, когда второй лекарственный препарат вводят в отсутствие первого лекарственного препарата, или аналогичную ситуацию наблюдают для первого лекарственного препарата. В некоторых вариантах осуществления доставка является такой, что уменьшение симптома или другого параметра, связанного с нарушением, является больше, чем можно было бы наблюдать для одного лекарственного препарата, доставляемого при отсутствии другого. Эффект двух лекарственных препаратов может являться частично аддитивным, полностью аддитивным или больше чем аддитивным. Доставка может являться такой, что эффект первого доставляемого лекарственного препарата являлся все еще детектируемым, когда доставляют второй лекарственный препарат.

Экспрессирующая CAR клетка, описываемая в настоящем описании, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство можно вводить одномоментно в той же или раздельных композициях или последовательно. Для последовательного введения экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, можно вводить первой, а дополнительное средство можно вводить вторым или можно изменять порядок введения.

Терапию CAR и/или другие терапевтические средства, процедуры или способы можно проводить во время периода активного нарушения или во время периода ремиссии или менее активного заболевания. Терапию CAR можно проводить до другого лечения, одновременно с лечением, после лечения или во время ремиссии нарушения.

При введении в комбинации терапию CAR и дополнительное средство (например, второе или третье средство) или все можно вводить в количестве или дозе, которая является выше, ниже или такой же как количество или доза каждого средства, используемого

отдельно, например, в виде монотерапии. В определенных вариантах осуществления вводимое количество или доза терапии CAR, дополнительного средства (например, второго или третьего средства) или всех является ниже (например, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 50%) по сравнению с количеством или дозой каждого средства, используемого отдельно, например, в виде монотерапии. В других вариантах осуществления количество или доза терапии CAR, дополнительного средства (например, второго или третьего средства) или всех, которая приводит к желаемому действию (например, лечению злокачественной опухоли) является ниже (например, ниже по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 50%) по сравнению с количеством или дозой каждого средства, используемого отдельно, например, в виде монотерапии, необходимой для получения того же терапевтического эффекта.

В дополнительных аспектах экспрессирующую CAR клетка, описываемую в настоящем описании, можно использовать в схеме лечения в комбинации с хирургической операцией, цитокинами, облучением или химиотерапией, такой как цитоксан, флударабин, ингибиторы гистондеацетилазы, деметилирующие средства или пептидная вакцина, такой как вакцина, описанная у Izumoto et al., 2008 J. Neurosurg., 108:963-971.

В некоторых случаях соединения по настоящему изобретению комбинируют с другими терапевтическими средствами, такими как другие средства против злокачественных опухолей, противоаллергические средства, средства против тошноты (или противорвотные средства), обезболивающие, цитопротекторные средства и их сочетания.

В одном из вариантов осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, можно использовать в комбинации с химиотерапевтическим средством. Иллюстративные химиотерапевтические средства включают антрациклин (например, доксорубицин (например, липосомальный доксорубицин)), алкалоид барвинка (например, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин), алкилирующее средство (например, циклофосфамид,

декарбазин, мелфалан, ифосфамид, темозоломид), антитело против иммунной клетки (например, алемтузамаб, гемтузумаб, ритуксимаб, офатумумаб, тозитумомаб, брентуксимаб), антиметаболит (включая, например, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и ингибиторы аденозиндеаминазы (например, флударабин)), ингибитор mTOR, агонист индуцируемого TNFR глюкокортикоидом родственного TNFR белка (GITR), ингибитор протеасомы (например, аклациномицин A, глиотоксин или бортезомиб), иммуномодулятор, такой как талидомид или производное талидомида (например, леналидомид).

Основные химиотерапевтические средства, предусматриваемые для применения в способах комбинированного лечения, включают анастрозол (Arimidex®), бикалутамид (Casodex®), блеомицина сульфат (Blenoxane®), бусульфан (Myleran®), инъекцию бусульфана (Busulfex®), капецитабин (Xeloda®), N4-пентоксикарбонил-5-дезокси-5-фторцитидин, карбоплатин (Paraplatin®), кармустин (BiCNU®), хлорамбуцил (Leukeran®), цисплатин (Platinol®), кладрибин (Leustatin®), циклофосфамид (Cytoxan® или Neosar®), цитарабин, цитозинарабинозид (Цитозар-U®), липосомальную инъекцию цитарабина (DepoCyt®), дакарбазин (DTIC-Dome®), дактиномицин (актиномицин D, космеген), даунорубицина гидрохлорид (Cerubidine®), липосомальную инъекцию даунорубицина цитрата (DaunoXome®), дексаметазон, доцетаксел (Taxotere®), доксорубицина гидрохлорид (Adriamycin®, Rubex®), этопозид (Vepesid®), флударабина фосфат (Fludara®), 5-фторурацил (Adrucil®, Efudex®), флутамид (Eulexin®), тезацитибин, гемцитабин (дифтордезоксицитидин), гидроксимочевину (Hydrea®), идарубицин (Idamycin®), ифосфамид (IFEX®), иринотекан (Camptosar®), L-аспарагиназу (ELSPAR®), лейковорин кальция, мелфалан (Alkeran®), 6-меркаптопурин (Purinethol®), метотрексат (Folex®), митоксантрон (Novantrone®), милотарг, паклитаксел (Taxol®), феникс (Yttrium90/MX-DTPA), пентостатин, полифепросан 20 с имплантатом кармустина (Gliadel®), тамоксифена цитрат

(Nolvadex®), тенипозид (Vumon®), 6-тиогуанин, тиотепу, тирапазамин (Tirazone®), топотекана гидрохлорид для инъекции (Hycamptin®), винбластин (Velban®), винкристин (Oncovin®) и винорелбин (Navelbine®).

Средства против злокачественной опухоли, представляющие особый интерес для комбинаций с соединениями по настоящему изобретению, включают: антрациклины; алкилирующие средства; антиметаболиты; лекарственные средства, которые ингибируют кальций-зависимую фосфатазу кальциневрин или киназу p70S6 (FK506) или ингибируют киназу p70S6; ингибиторы mTOR; иммуномодуляторы; антрациклины; алкалоиды барвинка; ингибиторы протеасомы; агонисты GITR; ингибиторы белковой тирозинфосфатазы; ингибитор киназы CDK4; ингибитор BTK; ингибитор киназы MKN; ингибитор киназы DGK или онколитический вирус.

Иллюстративные антиметаболиты включают, но не ограничиваются ими, аналоги пиримидина, аналоги пурина и ингибиторы аденозиндеаминазы: метотрексат (Rheumatrex®, Trexall®), 5-фторурацил (Adrucil®, Efudex®, Fluoroplex®), флоксуридин (FUDF®), цитарабин (Cytosar-U®, Tarabine PFS), 6-меркаптопурин (Puri-Nethol®)), 6-тиогуанин (тиогуанин Tabloid®), фосфат флударабина (Fludara®), пентостатин (Nipent®), пеметрексед (Alimta®), ралтитрексед (Tomudex®), кладрибин (Leustatin®), клофарабин (Clofarex®, Clolar®), азацитидин (Vidaza®), децитабин и гемцитабин (Gemzar®). Предпочтительные антиметаболиты включают, цитарабин, клофарабин и флударабин.

Иллюстративные алкилирующие средства включают, но не ограничиваются ими, азотистые иприты, производные этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены): урамустин (Aminouracil Mustard®, Chlorethaminacil®, Demethyldopan®, Desmethyldopan®, Haemanthamine®, Nordopan®, Uracil nitrogen mustard®, Uracillost®, Uracilmostaza®, Uramustin®, Uramustine®), хлорметин (Mustargen®), циклофосфамид (Cytoxan®, Neosar®, Clafen®, Endoxan®, Procytox®, Revimmune™), ифосфамид

(Mitoxana®), мелфалан (Alkeran®), хлорамбуцил (Leukeran®), пипоброман (Amedel®, Vercyte®), триэтиленмеламин (Hemel®, Hexalen®, Hexastat®), триэтилентиофосфорамин, темозоломид (Temodar®), тиотепа (Thioplex®), бусульфан (Busilvex®, Myleran®), кармустин (BiCNU®), ломустин (CeeNU®), стрептозоцин (Zanosar®) и дакарбазин (DTIC-Dome®). Дополнительные иллюстративные алкилирующие средства включают, но не ограничиваются ими, оксалиплатин (Eloxatin®); темозоломид (Temodar® и Temodal®); дактиномицин (также известный как актиномицин-D, Cosmegen®); мелфалан (также известный как L-PAM, L-сарколизин и фенилаланина мустин, Alkeran®); алтретамин (также известный как гексаметилмеламин (HMM), Hexalen®); кармустин (BiCNU®); бендамустин (Treanda®); бусульфан (Busulfex® и Myleran®); карбоплатин (Paraplatin®); ломустин (также известный как CCNU, CeeNU®); цисплатин (также известный как CDDP, Platinol® и Platinol®-AQ); хлорамбуцил (Leukeran®); циклофосфамид (Cytoxan® и Neosar®); дакарбазин (также известный как DTIC, DIC и имидазола карбоксамид, DTIC-Dome®); алтретамин (также известный как гексаметилмеламин (HMM), Hexalen®); ифосфамид (Ifex®); преднумустин; прокарбазин (Matulane®); мехлоретамин (также известный как азотистый иприт, мустин и мехлорэтамина гидрохлорид, Mustargen®); стрептозоцин (Zanosar®); тиотепа (также известный как тиофосфоамид, TESPA и TSPA, Thioplex®); циклофосфамид (Endoxan®, Cytoxan®, Neosar®, Procytox®, Revimmune®) и бендамустин HCl (Treanda®).

В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с флударабином, циклофосфамидом и/или ритуксимабом. В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с флударабином, циклофосфамидом и ритуксимабом (FCR). В вариантах осуществления индивидуум страдает CLL. Например, индивидуум имеет делецию в коротком плече хромосомы 17 (del(17p), например,

в лейкозной клетке). В других примерах индивидуум не имеет del(17p). В вариантах осуществления у индивидуума содержится лейкозная клетка, содержащая мутацию в гене вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина (*IgV*$_H$). В других вариантах осуществления у индивидуума не содержится лейкозная клетка, содержащая мутацию в гене вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина (*IgV*$_H$). В вариантах осуществления флударабин вводят в дозе приблизительно 10-50 мг/м^2 (например, приблизительно 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45 или 45-50 мг/м^2), например, внутривенно. В вариантах осуществления циклофосфамид вводят в дозе приблизительно 200-300 мг/м^2 (например, приблизительно 200-225, 225-250, 250-275 или 275-300 мг/м^2), например, внутривенно. В вариантах осуществления ритуксимаб вводят в дозе приблизительно 400-600 мг/м^2 (например, 400-450, 450-500, 500-550 или 550-600 мг/м^2), например, внутривенно.

В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с бендамустином и ритуксимабом. В вариантах осуществления индивидуум страдает CLL. Например, индивидуум имеет делецию в коротком плече хромосомы 17 (del(17p), например, в лейкозной клетке). В других примерах индивидуум не имеет делецию del(17p). В вариантах осуществления у индивидуума содержится лейкозная клетка, содержащая мутацию в гене вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина (*IgV*$_H$). В других вариантах осуществления у индивидуума не содержится лейкозная клетка, содержащая мутацию в гене вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина (*IgV*$_H$). В вариантах осуществления бендамустин вводят в дозе приблизительно 70-110 мг/м^2 (например, 70-80, 80-90, 90-100 или 100-110 мг/м^2), например, внутривенно. В вариантах осуществления ритуксимаб вводят в дозе приблизительно 400-600 мг/м^2 (например, 400-450, 450-500, 500-550 или 550-600 мг/м^2), например, внутривенно.

В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с ритуксимабом, циклофосфамидом, доксорубицином,

винкристином и/или кортикостероидом (например, преднизоном). В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с ритуксимабом, циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизоном (R-CHOP). В вариантах осуществления индивидуум страдает диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой (DLBCL). В вариантах осуществления индивидуум страдает негенрализованной DLBCL с локализованной стадией (например, имеет опухоль с размером/диаметром менее 7 см). В вариантах осуществления индивидуум получает лечение облучением в комбинации с R-CHOP. Например, индивидууму вводят R-CHOP (например, 1-6 циклов, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 циклов R-CHOP) с последующим облучением. В некоторых случаях индивидууму вводят R-CHOP (например, 1-6 циклов, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 циклов R-CHOP) после облучения.

В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с этопозидом, преднизоном, винкристином, циклофосфамидом, доксорубицином и/или ритуксимабом. В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с этопозидом, преднизоном, винкристином, циклофосфамидом, доксорубицином и ритуксимабом (EPOCH-R). В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с EPOCH-R со скорректированной дозой(DA-EPOCH-R). В вариантах осуществления индивидуум страдает В-клеточной лимфомой, например, агрессивной В-клеточной лимфомой с перестройкой Myc.

В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с ритуксимабом и/или леналидомидом. Леналидомид ((*RS*)-3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидро-2*H*-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-дион) представляет собой иммуномодулятор. В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с ритуксимабом и леналидомидом. В вариантах осуществления

индивидуум страдает фолликулярной лимфомой (FL) или лимфомой мантийных клеток (MCL). В вариантах осуществления индивидуум страдает FL и ранее не получал лечение терапией против злокачественной опухоли. В вариантах осуществления леналидомид вводят в дозе приблизительно 10-20 мг (например, 10-15 или 15-20 мг), например, каждые сутки. В вариантах осуществления ритуксимаб вводят в дозе приблизительно 350-550 мг/м^2 (например, 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475 или 475-500 мг/м^2), например, внутривенно.

Иллюстративные ингибиторы mTOR включают, например, темсиролимус; ридафоролимус (ранее известный как деферолимус, (1*R*,2*R*,4*S*)-4-[(2*R*)-2[(1*R*,9*S*,12*S*,15*R*,16*E*,18*R*,19*R*,21*R*, 23*S*,24*E*,26*E*,28*Z*,30*S*,32*S*,35*R*)-1,18-дигидрокси-19,30-диметокси-15,17,21,23,29,35-гексаметил-2,3,10,14,20-пентаоксо-11,36-диокса-4-азатрицикло[30.3.1.0^{4,9}]-гексатриаконта-16,24,26,28-тетраен-12-ил]пропил]-2-метоксициклогексилдиметилфосфинат, также известный как AP23573 и MK8669 и описанный в публикация PCT № WO 03/064383); эверолимус (Afinitor® или RAD001); рапамицин (AY22989, Sirolimus®); симапимод (CAS 164301-51-3); емсиролимус, (5-{2,4-бис[(3*S*)-3-метилморфолин-4-ил]пиридо[2,3-*d*]пиримидин-7-ил}-2-метоксифенил)метанол (AZD8055); 2-амино-8-[*транс*--4-(2-гидроксиэтокси)циклогексил]-6-(6-метокси-3-пиридинил)-4-метил-пиридо[2,3-*d*]пиримидин-7(8*H*)-он (PF04691502, CAS 1013101-36-4) и *N*^{2}-[1,4-диоксо-4-[[4-(4-оксо-8-фенил-4*H*-1-бензопиран-2-ил)морфолиний-4-ил]метокси]бутил]-L-аргинилглицил-L-α-аспартил-L-серин- (SEQ ID NO: 64), внутренняя соль (SF1126, CAS 936487-67-1) и XL765.

Иллюстративные иммуномодуляторы включают, например, афутузумаб (доступный от Roche®); пэгфилграстим (Neulasta®); леналидомид (CC-5013, Revlimid®); талидомид (Thalomid®), актимид (CC4047) и IRX-2 (смесь цитокинов человека, включая интерлейкин 1, интерлейкин 2 и интерферон γ, CAS 951209-71-5, доступный от IRX Therapeutics).

Иллюстративные антрациклины включают, например, доксорубицин (Adriamycin® и Rubex®); блеомицин (Lenoxane®);

даунорубицин (даунорубицина гидрохлорид, дауномицин и рубидомицина гидрохлорид, Cerubidine®); липосомальный даунорубицин (липосомальный даунорубицина цитрат, DaunoXome®); митоксантрон (DHAD, Novantrone®); эпирубицин (Ellence™); идарубицин (Idamycin®, Idamycin PFS®); митомицин C (Mutamycin®); гелданамицин; гербимицин; равидомицин и дезацетилравидомицин.

Иллюстративные алкалоиды барвинка включают, например, винорелбин тартрат (Navelbine®), винкристин (Oncovin®) и виндезин (Eldisine®)); винбластин (также известный как винбластина сульфат, винкалейкобластин и VLB, Alkaban-AQ® и Velban®) и винорелбин (Navelbine®).

Иллюстративные ингибиторы протеасомы включают бортезомиб (Velcade®); карфилзомиб (PX-171-007, (*S*)-4-метил-*N*-((*S*)-1-(((*S*)-4-метил-1-((*R*)-2-метилоксиран-2-ил)-1-оксопентан-2-ил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)-2-((*S*)-2-(2-морфолиноацетамидо)-4-фенилбутанамидо)пентанамид); маризомиб (NPI-0052); иксазомиба цитрат (MLN-9708); деланзомиб (CEP-18770) и *O*-метил-*N*-[(2-метил-5-тиазолил)карбонил]-L-серил-*O*-метил-*N*-[(1*S*)-2-[(2*R*)-2-метил-2-оксиранмл]-2-оксо-1-(фенилметил)этил]-L-серинамид (ONX-0912).

В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с брентуксимабом. Брентуксимаб представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство антитела против CD30 и монометилауристатина E. В вариантах осуществления индивидуум страдает лимфомой Ходжкина (HL), например, рецидивирующей или рефрактерной HL. В вариантах осуществления индивидуум страдает CD30+ HL. В вариантах осуществления индивидуум подвергался аутологичной трансплантации стволовых клеток (ASCT). В вариантах осуществления индивидуум не подвергался ASCT. В вариантах осуществления брентуксимаб вводят в дозе приблизительно 1-3 мг/кг (например, приблизительно 1-1,5, 1,5-2, 2-2,5 или 2,5-3 мг/кг), например, внутривенно, например, каждые 3 недели.

В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в

комбинации с брентуксимабом и дакарбазином или в комбинации с брентуксимабом и бендамустином. Дакарбазин представляет собой алкилирующее средство с химическим названием 5-(3,3-диметил-1-триазенил)имидазол-4-карбоксамид. Бендамустин представляет собой алкилирующее средство с химическим названием 4-[5-[бис(2-хлорэтил)амино]-1-метилбензимидазол-2-ил]бутановая кислота. В вариантах осуществления индивидуум страдает лимфомой Ходжкина (HL). В вариантах осуществления индивидуум ранее не получал лечение терапией против злокачественной опухоли. В вариантах осуществления возраст индивидуума составляет по меньшей мере 60 лет, например, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или более. В вариантах осуществления дакарбазин вводят в дозе приблизительно 300-450 мг/м^2 (например, приблизительно 300-325, 325-350, 350-375, 375-400, 400-425 или 425-450 мг/м^2), например, внутривенно. В вариантах осуществления бендамустин вводят в дозе приблизительно 75-125 мг/м^2 (например, 75-100 или 100-125 мг/м^2, например, приблизительно 90 мг/м^2), например, внутривенно. В вариантах осуществления брентуксимаб вводят в дозе приблизительно 1-3 мг/кг (например, приблизительно 1-1,5, 1,5-2, 2-2,5 или 2,5-3 мг/кг), например, внутривенно, например, каждые 3 недели.

В некоторых вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с ингибитором CD20, например, антителом против CD20 (например, моно- или биспецифическим антителом против CD20) или его фрагментом. Иллюстративные антитела к CD20 включают, но не ограничиваются ими, ритуксимаб, офатумумаб, окрелизумаб, велтузумаб, обинутузумаб, TRU-015 (Trubion Pharmaceuticals), окаратузумаб и Pro131921 (Genentech). См., например, Lim et al., Haematologica., 95,1(2010):135-43.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD20 включает ритуксимаб. Ритуксимаб представляет собой IgG1 каппа химерного моноклонального антитела мыши/человека, который связывается с CD20 и вызывает цитолиз экспрессирующей CD20 клетки, например, как описано в www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103705s5311lbl.pdf. В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку,

описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с ритуксимабом. В вариантах осуществления индивидуум страдает CLL или SLL.

В некоторых вариантах осуществления ритуксимаб вводят внутривенно, например, в виде внутривенной инфузии. Например, каждая инфузия обеспечивает приблизительно 500-2000 мг (например, приблизительно 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000, 1000-1100, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400, 1400-1500, 1500-1600, 1600-1700, 1700-1800, 1800-1900 или 1900-2000 мг) ритуксимаба. В некоторых вариантах осуществления ритуксимаб вводят в дозе от 150 мг/м^2 до 750 мг/м^2, например, приблизительно 150-175 мг/м^2, 175-200 мг/м^2, 200-225 мг/м^2, 225-250 мг/м^2, 250-300 мг/м^2, 300-325 мг/м^2, 325-350 мг/м^2, 350-375 мг/м^2, 375-400 мг/м^2, 400-425 мг/м^2, 425-450 мг/м^2, 450-475 мг/м^2, 475-500 мг/м^2, 500-525 мг/м^2, 525-550 мг/м^2, 550-575 мг/м^2, 575-600 мг/м^2, 600-625 мг/м^2, 625-650 мг/м^2, 650-675 мг/м^2 или 675-700 мг/м^2, где м^2 означает площадь поверхности тела индивидуума. В некоторых вариантах осуществления ритуксимаб вводят с интервалом дозирования по меньшей мере 4 суток, например, 4, 7, 14, 21, 28, 35 суток или более. Например, ритуксимаб вводят с интервалом дозирования по меньшей мере 0,5 недель, например, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 недель или более. В некоторых вариантах осуществления ритуксимаб вводят в дозе и с интервалом дозирования, описываемым в настоящем описании, в течение периода времени, например, по меньшей мере 2 недель, например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 недель или более. Например, ритуксимаб вводят в дозе и с интервалом дозирования, описываемым в настоящем описании, в общей сложности по меньшей мере 4 дозы на цикл лечения (например, по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или более доз на цикл лечения).

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD20 ввключате офатумумаб. Офатумумаб представляет собой моноклональное антитело человека IgG1κ против CD20 с молекулярной

массой приблизительно 149 кДа. Например, офатумумаб получают с использованием трансгенной мыши и гибридомной технологии и экспрессируют, и выделяют из рекомбинантной линии клеток мыши (NS0). См., например, www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/125326lbl.pdf и клиническое испытание с идентификационным номером NCT01363128, NCT01515176, NCT01626352 и NCT01397591. В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с офатумумабом. В вариантах осуществления индивидуум страдает CLL или SLL.

В некоторых вариантах осуществления офатумумаб вводят в виде внутривенной инфузии. Например, каждая инфузия обеспечивает приблизительно 150-3000 мг (например, приблизительно 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000, 1000-1200, 1200-1400, 1400-1600, 1600-1800, 1800-2000, 2000-2200, 2200-2400, 2400-2600, 2600-2800 или 2800-3000 мг) офатумумаба. В вариантах осуществления офатумумаб вводят в начальной дозе приблизительно 300 мг с последующим введением 2000 мг, например, приблизительно для 11 доз, например, в течение 24 недель. В некоторых вариантах осуществления офатумумаб вводят с интервалом дозирования по меньшей мере 4 суток, например, 4, 7, 14, 21, 28, 35 суток или более. Например, офатумумаб вводят с интервалом дозирования по меньшей мере 1 неделя, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 26, 28, 20, 22, 24, 26, 28, 30 недель или более. В некоторых вариантах осуществления офатумумаб вводят в дозе и с интервалом дозирования, описываемым в настоящем описании, в течение периода времени, например, по меньшей мере 1 недели, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60 недель или более или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцев или более или 1, 2, 3, 4, 5 лет или более. Например, офатумумаб вводят в дозе и с интервалом дозирования, описываемым в настоящем описании, в общей сложности по меньшей мере 2 дозы на цикл лечения

(например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20 или более доз на цикл лечения).

В некоторых случаях антитело против CD20 включает окрелизумаб. Окрелизумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело против CD20, например, как описано в клинических испытаниях с идентификационными номерами NCT00077870, NCT01412333, NCT00779220, NCT00673920, NCT01194570 и у Kappos et al., Lancet., 19.378(2011):1779-87.

В некоторых случаях антитело против CD20 включает велтузумаб. Велтузумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело против CD20. См., например, клиническое испытание с идентификационным № NCT00547066, NCT00546793, NCT01101581 и Goldenberg et al., Leuk. Lymphoma., 51(5)(2010):747-55.

В некоторых случаях антитело против CD20 включает GA101. GA101 (также называемое обинутузумабом или RO5072759) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело против CD20 с модифицированной схемой гликозилирования. См., например, Robak., Curr. Opin. Investig. Drugs., 10.6(2009):588-96; клинические испытания с идентификационным номером: NCT01995669, NCT01889797, NCT02229422 и NCT01414205; и www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/125486s000lbl.pdf.

В некоторых случаях антитело против CD20 включает AME-133v. AME-133v (также называемое LY2469298 или окаратузумабом) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1 против CD20 с повышенной аффинностью к рецептору FcγRIIIa и повышенным антителозависимым клеточным цитотоксическим (ADCC) действием по сравнению с ритуксимабом. См., например, Robak et al., BioDrugs, 25,1(2011):13-25 и Forero-Torres et al., Clin. Cancer Res., 18,5(2012):1395-403.

В некоторых случаях антитело против CD20 включает PRO131921. PRO131921 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело против CD20, сконструированное так, чтобы лучше связываться с FcγRIIIa и иметь повышенную ADCC по

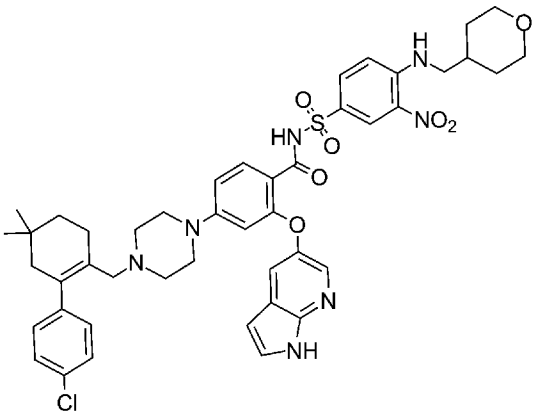
сравнению с ритуксимабом. См., например, Robak et al., BioDrugs, 25.1(2011):13-25 и Casulo et al., Clin Immunol., 154.1(2014):37-46; и клиническое испытание с идентификационным № NCT00452127.

В некоторых случаях антитело против CD20 включает TRU-015. TRU-015 представляет собой слитый белок против CD20, получаемый из доменов антитела против CD20. TRU-015 является меньше чем моноклональные антитела, но сохраняет Fc-опосредованные эффекторные функции. См., например, Robak et al., BioDrugs, 25,1(2011):13-25. TRU-015 содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) антитела CD20 против, связанный с шарнирным доменом, доменами CH2 и CH3 IgG1 человека, но не содержащий домены CH1 и CL.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD20, описываемое в настоящем описании, конъюгировано или иным образом связано с терапевтическим средством, например, химиотерапевтическим средством (например, цитоксаном, флударабином, ингибитором гистондеацетилазы, деметилирующим средством, пептидной вакциной, противоопухолевым антибиотиком, ингибитором тирозинкиназы, алкилирующим средством, средством, оказывающим действие на микротрубочки или антимитотическим средством), противоаллергическим средством, средством против тошноты (или противорвотным средством), обезболивающим средством или цитопротекторным средством, описываемым в настоящем описании.

В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с ингибитором B-клеточной лимфомы 2 (BCL-2) (например, венетоклаксом, также называемым ABT-199 или GDC-0199) и/или ритуксимабом. В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с венетоклаксом и ритуксимабом. Венетоклакс представляет собой низкомолекулярное соединение, которое ингибирует антиапоптотический белок BCL-2. Структура венетоклакса (4-(4-{[2-(4-хлорфенил)-4,4-диметилциклогекс-1-ен-1-ил]метил}пиперазин-1-ил)-*N*-({3-нитро-4-[(тетрагидро-2*H*-пиран-

4-илметил)амино]фенил}сульфонил)-2-(1*H*-пирроло[2,3-*b*]пиридин-5-илокси)бензамид) представлена ниже.



В вариантах осуществления индивидуум страдает CLL. В вариантах осуществления индивидуум страдает рецидивирующим CLL, например, индивидуум ранее получал терапию против злокачественной опухоли. В вариантах осуществления венетоклакс вводят в дозе приблизительно 15-600 мг (например, 15-20, 20-50, 50-75, 75-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500 или 500-600 мг), например, каждые сутки. В вариантах осуществления ритуксимаб вводят в дозе приблизительно 350-550 мг/м^2 (например, 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475 или 475-500 мг/м^2), например, внутривенно, например, каждый месяц.

В некоторых вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят в комбинации с онколитическим вирусом. В вариантах осуществления онколитические вирусы способны селективно реплицироваться и активировать гибель или замедление роста злокачественной клетки. В некоторых случаях онколитические вирусы не оказывают эффект или оказывают минимальный эффект на незлокачественные клетки. Онколитичие вирус включает, но не ограничивается им, онколитический аденовирус, онколитические вирусы простого герпеса, онколитический ретровирус, онколитический парвовирус, онколитический вирус осповакцины, онколитический вирус Синдбис, онколитический вирус гриппа или онколитический РНК-вирус (например, онколитический реовирус, онколитический Вирус болезни Ньюкасла (NDV), онколитический вирус кори или онколитический вирус везикулярного стоматита (VSV)).

В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус представляет собой вирус, например, рекомбинантный онколитический вирус, описанный в US2010/0178684 A1, полностью включенном в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный онколитический вирус содержит последовательность нуклеиновой кислоты (например, гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты), кодирующую ингибитор иммунного или воспалительного ответа, например, как описано в US2010/0178684 A1, полностью включенном в настоящее описание посредством ссылки. В вариантах осуществления рекомбинантный онколитический вирус, например, онколитический NDV содержит проапоптотический белок (например, апоптин), цитокин (например, GM-CSF, интерферон-гамма, интерлейкин 2 (IL-2), фактор некроза опухоли альфа), иммуноглобулин (например, антитело против ED-B фибронектина), опухолеассоциированный антиген, биспецифический адаптерный белок (например, биспецифическое антитело или фрагмент антитела, направленный против белка NDV HN и Т-клеточного костимулирующего рецептора, такого как CD3 или CD28; или слитый белок между IL-2 человека и одноцепочечным антителом, направленным против белка NDV HN). См., например, Zamarin et al., Future Microbiol., 7,3(2012):347-67, полностью включенной в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус представляет собой химерный онколитический NDV, описанный в US 8591881 B2, US 2012/0122185 A1 или US 2014/0271677 A1, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус включает условно реплицирующийся аденовирус (CRAd), который конструируют, чтобы он реплицировался только в злокачественных клетках. См., например, Alemany et al., Nature Biotechnol., 18(2000):723-27. В некоторых вариантах осуществления онколитический аденовирус включает вирус, описанный в таблице 1 на стр. 725 Alemany et al., полностью включенной в настоящее описание посредством ссылки.

Иллюстративные онколитические вирусы включают, но не ограничиваются ими, следующие ниже:

Онколитический аденовирус группы B (ColoAd1) (PsiOxus Therapeutics Ltd.) (см., например, клиническое испытание с идентификатором: NCT02053220);

ONCOS-102 (ранее называемый CGTG-102), которые представляет собой аденовирус, содержащий гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) (Oncos Therapeutics) (см., например, клиническое испытание с идентификатором: NCT01598129);

VCN-01, который представляет собой генетически модифицированный онколитический аденовирус человека, кодирующий гиалуронидазу PH20 человека (VCN Biosciences, S.L.) (см., например, клиническое испытание с идентификаторами: NCT02045602 и NCT02045589);

Условно реплицирующийся аденовирус ICOVIR-5, который представляет собой вирус, получаемый из аденовируса человека дикого типа серотипа 5 (Had5), который модифицировали селективно реплицироваться в злокачественных клетках с дерегулированный путь ретинобластомы/E2F (Institut Català d'Oncologia) (см., например, клиническое испытание с идентификатором: NCT01864759);

Селивир (celyvir), который содержит получаемые из костного мозга аутологичные мезенхимальные стволовые клетки (MSC), инфицированные ICOVIR5, онколитическим аденовирусом (Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain/Ramon Alemany) (см., например, клиническое испытание с идентификатором: NCT01844661);

CG0070, который представляет собой условно реплицирующийся онколитический аденовирус серотипа 5 (Ad5), в котором промотор E2F-1 человека направляет экспрессию основных генов вируса E1a, таким образом ограничивая вирусную репликацию и цитотоксичность в отношении опухолевых клеток с дефектным путем Rb (Cold Genesys, Inc.) (см., например, клиническое испытание с идентификатором: NCT02143804); или

DNX-2401 (ранее называемый Delta-24-RGD), который представляет собой аденовирус, который конструировали так, чтобы он селективно экспрессировался в клетках ретинобластомы с

недостаточностью пути (Rb) и инфицировал клетки, которые экспрессируют определенные связывающие RGD интегрины более эффективно (Clinica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra/DNAtrix, Inc.) (см., например, клиническое испытание с идентификатором: NCT01956734).

В некоторых вариантах осуществления онколитический вирус, описываемый в настоящем описании, вводят посредством инъекции, например, подкожной, внутриартериальной, внутривенной, внутримышечной, интратекальной или интраперитонеальной инъекции. В вариантах осуществления онколитический вирус, описываемый в настоящем описании, вводят внутриопухолевым путем, трансдермально, трансмукозально, перорально, интраназально или посредством легочного введения.

В одном из вариантов осуществления клетки, экспрессирующие CAR, описываемые в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с молекулой, которая уменьшает популяция Treg-клеток. Способы, которые приводят к уменьшению числа (например, истощению) Treg-клеток известны в данной области и включают, например, истощение CD25, введение циклофосфамида, модулирующую функцию GITR. Без желания быть связанными теорией, полагают, что уменьшение числа Treg-клеток у индивидуума до проведения афереза или перед введением экспрессирующей CAR клетки, описываемой в настоящем описании, уменьшает число нежелательных иммунных клеток (например, Treg) в микроокружении опухоли и снижает риск рецидива у индивидуума.

В одном из вариантов осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с молекулой, направленной на GITR и/или модулирующей функции GITR, такой как агонист GITR и/или антитело против GITR, которое истощает регуляторные Т-клетки (Treg). В вариантах осуществления клетки, экспрессирующие CAR, описываемый в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с циклофосфамидом. В одном из вариантов осуществления связывающие GITR молекулы и/или молекулы, модулирующие функции GITR, (например, агонист GITR и/или истощающие Treg антитела против GITR) вводят перед введением экспрессирующей CAR клетки.

Например, в одном из вариантов осуществления агонист GITR можно вводить до афереза клеток. В вариантах осуществления циклофосфамид вводят индивидууму перед введением (например, инфузией или реинфузией) экспрессирующей CAR клетки или до афереза клеток. В вариантах осуществления циклофосфамид и антитело против GITR вводят индивидууму перед введением (например, инфузией или реинфузией) экспрессирующей CAR клетки или до афереза клеток. В одном из вариантов осуществления индивидуум страдает злокачественной опухолью (например, солидной злокачественной опухолью или гематологической злокачественной опухолью, такой как ALL или CLL). В одном из вариантов осуществления индивидуум страдает CLL. В вариантах осуществления индивидуум страдает ALL. В вариантах осуществления индивидуум страдает солидной злокачественной опухолью, например, солидной злокачественной опухолью, описываемой в настоящем описании. Иллюстративные агонисты GITR включают, например, слитые белки GITR и антитела против GITR (например, бивалентные антитела против GITR), такие как, например, слитый белок GITR, описанный в патенте США №: 6111090, патенте Европы №: 090505B1, патенте U.S. №: 8586023, публикациях PCT №: WO 2010/003118 и 2011/090754, или антитело против GITR, описанное, например, в патенте США №: 7025962, патенте Европы №: 1947183B1, патенте США №: 7812135, патенте США №: 8388967 и патенте США №: 8591886, патенте Европы №: EP 1866339, публикации PCT №: WO 2011/028683, публикации PCT №:WO 2013/039954, публикации PCT №: WO2005/007190, публикации PCT №: WO 2007/133822, публикации PCT №: WO2005/055808, публикации PCT №: WO 99/40196, публикации PCT №: WO 2001/03720, публикации PCT №: WO99/20758, публикации PCT №: WO2006/083289, публикации PCT №: WO 2005/115451, патенте США №: 7618632 и публикации PCT №: WO 2011/051726.

В одном из вариантов осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с агонистом GITR, например, агонистом GITR, описываемым в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления агонист GITR вводят до экспрессирующей CAR клетки.

Например, в одном из вариантов осуществления агонист GITR можно вводить до афереза клеток.

В одном из вариантов осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с ингибитором mTOR, например, ингибитором mTOR, описываемым в настоящем описании, например, рапалогом, таким как эверолимус. В одном из вариантов осуществления ингибитор mTOR вводят до экспрессирующей CAR клетки. Например, в одном из вариантов осуществления ингибитор mTOR можно вводить до афереза клеток.

В одном из вариантов осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с ингибитором белковой тирозинфосфатазы, например, ингибитором белковой тирозинфосфатазы, описываемым в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления ингибитор белковой тирозинфосфатазы представляют собой ингибитор SHP-1, например, ингибитор SHP-1, описываемый в настоящем описании, такой как, например, стибоглюконат натрия. В одном из вариантов осуществления ингибитор белковой тирозинфосфатазы представляет собой ингибитор SHP-2.

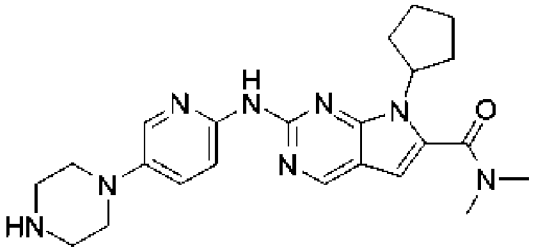
В одном из вариантов осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, можно использовать в комбинации с ингибитором киназы. В одном из вариантов осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор CDK4, например, ингибитор CDK4, описываемый в настоящем описании, например, ингибитор CD4/6, такой как, например, гидрохлорид 6-ацетил-8-циклопентил-5-метил-2-(5-пиперазин-1-ил-пиридин-2-иламино)-8*H*-пиридо[2,3-*d*]пиримидин-7-она (также обозначаемый как палбоциклиб или PD0332991). В одном из вариантов осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор BTK, например, ингибитор BTK, описываемый в настоящем описании, такой как, например, ибрутиниб. В одном из вариантов осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR, например, ингибитор mTOR, описываемый в настоящем описании, такой как, например, рапамицин, аналог рапамицина, OSI-027. Ингибитор mTOR может представлять собой, например,

ингибитор mTORC1 и/или ингибитор mTORC2, например, ингибитор mTORC1 и/или ингибитор mTORC2, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор MNK, например, ингибитор MNK, описываемый в настоящем описании, такой как, например, 4-амино-5-(4-фторанилино)пиразоло-[3,4-*d*]пиримидин. Ингибитор MNK может представлять собой, например, ингибитор MNK1a, MNK1b, MNK2a и/или MNK2b. В одном из вариантов осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор DGK, например, ингибитор DGK, описываемый в настоящем описании, такой как, например, DGKinh1 (D5919) или DGKinh2 (D5794). В одном из вариантов осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор CDK4, выбранный из алоизина A; флавопиридола или HMR-1275, 2-(2-хлорфенил)-5,7-дигидрокси-8-[(3S,4R)-3-гидрокси-1-метил-4-пиперидинил]-4-хроменона; кризотиниба (PF-02341066; гидрохлорида 2-(2-хлорфенил)-5,7-дигидрокси-8-[(2*R*,3*S*)-2-(гидроксиметил)-1-метил-3-пирролидинил]-4*H*-1-бензопиран-4-она (P276-00); 1-метил-5-[[2-[5-(трифторметил)-1*H*-имидазол-2-ил]-4-пиридинил]окси]-*N*-[4-(трифторметил)фенил]-1*H*-бензимидазол-2-амина (RAF265); индисулама (E7070); росковитина (CYC202); палбоциклиба (PD0332991); динациклиба (SCH727965); N-[5-[[(5-*трет*-бутилоксазол-2-ил)метил]тио]тиазол-2-ил]пиперидин-4-карбоксамида (BMS 387032); 4-[[9-хлор-7-(2,6-дифторфенил)-5*H*-пиримидо[5,4-*d*][2]бензазепин-2-ил]амино]бензойной кислоты (MLN8054); 5-[3-(4,6-дифтор-1H-бензимидазол-2-ил)-1H-индазол-5-ил]-N-этил-4-метил-3-пиридинметанамина (AG-024322); N-(пиперидин-4-ил)амида 4-(2,6-дихлорбензоиламино)-1H-пиразол-3-карбоновой кислоты (AT7519); 4-[2-метил-1-(1-метилэтил)-1*H*-имидазол-5-ил]-*N*-[4-(метилсульфонил)фенил]-2-пиримидинамина (AZD5438) и XL281 (BMS908662).

В одном из вариантов осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор CDK4, например, палбоциклиб (PD0332991), и палбоциклиб вводят в дозе приблизительно 50 мг, 60 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 105 мг, 110 мг, 115 мг, 120 мг, 125 мг, 130 мг, 135 мг (например, 75 мг, 100 мг или 125 мг) каждые сутки в течение определенного периода времени,

например, каждые сутки в течение 14-21 суток в цикле продолжительностью 28 суток или каждые сутки в течение 7-12 суток в цикле продолжительностью 21 сутки. В одном из вариантов осуществления палбоциклиб вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более циклов.

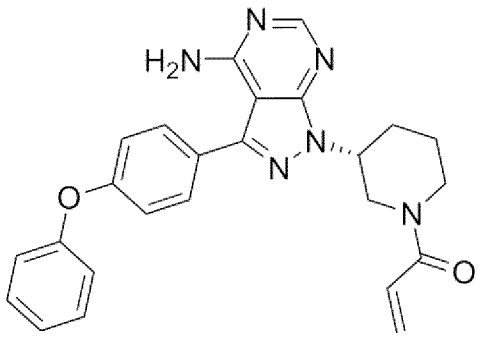
В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с ингибитором циклинзависимой киназы (CDK) 4 или 6, например, ингибитором CDK4 или ингибитором CDK6, описываемым в настоящем описании. В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с ингибитором CDK4/6 (например, ингибитором, который направленно воздействует на CDK4 и CDK6), например, ингибитором CDK4/6, описываемым в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления индивидуум страдает MCL. MCL представляет собой агрессивную злокачественную опухоль, которая слабо реагирует на доступные в настоящее время виды терапии, т.е. по существу неизлечимую. Во многих случаях MCL циклин D1 (регулятор CDK4/6) экспрессируется (например, вследствие хромосомной транслокации, включающей гены иммуноглобулина и циклина D1) в клетках MCL. Таким образом, без связи с теорией полагают, что клетки MCL являются высокочувствительными к ингибированию CDK4/6 с высокой специфичностью (т.е. минимальным эффектом на нормальные клетки иммунной системы). Ингибиторы CDK4/6 отдельно обладали некоторой эффективностью при лечении MCL, но с ними достигали только частичной ремиссии с высокой частотой рецидива. Иллюстративный ингибитор CDK4/6 представляет собой LEE011 (также называемый рибоциклибом), структура которого представлена ниже.



Без связи с теорией, полагают, что введением экспрессирующей CAR клетки, описываемой в настоящем описании, с ингибитором CDK4/6 (например, LEE011 или другим ингибитором CDK4/6, описываемым в настоящем описании) можно получать более высокую реакцию на лечение, например, с более высокой частотой ремиссии и/или более низкой частотой рецидива, например, по сравнению с одним ингибитором CDK4/6.

В одном из вариантов осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор BTK, выбранный из ибрутиниба (PCI-32765); GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774 и LFM-A13. В предпочтительном варианте осуществления ингибитор BTK не снижает или не ингибирует киназную активность индуцируемой интерлейкином 2 киназы (ITK) и выбран из GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774 и LFM-A13.

В одном из вариантов осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор BTK, например, ибрутиниб (PCI-32765). В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с ингибитором BTK (например, ибрутинибом). В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с ибрутинибом (также называемой PCI-32765). Структура ибрутиниба (1-[(3*R*)-3-[4-амино-3-(4-феноксифенил)-1*H*-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-ил]проп-2-ен-1-она) представлена ниже.



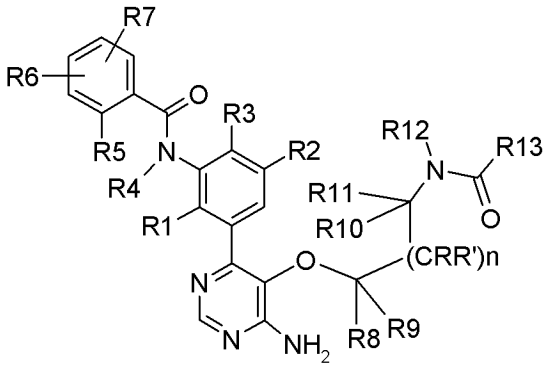
В вариантах осуществления индивидуум страдает CLL, лимфомой мантийных клеток (MCL) или мелкоклеточной лимфомой (SLL). Например, индивидуум имеет делецию в коротком плече хромосомы 17

(del(17p), например, в лейкозной клетке). В других примерах, индивидуум не имеет del(17p). В вариантах осуществления индивидуум страдает рецидивирующим CLL или SLL, например, индивидуум ранее получал терапию против злокачественной опухоли (например, ранее получал один, два, три или четыре вида терапии против злокачественной опухоли). В вариантах осуществления индивидуум страдает рефрактерным CLL или SLL. В других вариантах осуществления индивидуум страдает фолликулярной лимфомой, например, рецидивирующей или рефрактерной фолликулярной лимфомой. В некоторых вариантах осуществления ибрутиниб вводят в дозе приблизительно 300-600 мг/сутки (например, приблизительно 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-550 или 550-600 мг/сутки, например, приблизительно 420 мг/сутки или приблизительно 560 мг/сутки), например, перорально. В вариантах осуществления ибрутиниб вводят в дозе приблизительно 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 420 мг, 440 мг, 460 мг, 480 мг, 500 мг, 520 мг, 540 мг, 560 мг, 580 мг, 600 мг (например, 250 мг, 420 мг или 560 мг) каждые сутки в течение периода времени, например, каждые сутки в течение цикла продолжительностью 21 сутки или каждые сутки в течение цикла продолжительностью 28 суток. В одном из вариантов осуществления ибрутиниб вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более циклов.

В некоторых вариантах осуществления ибрутиниб вводят в комбинации с ритуксимабом. См., например, Burger et al., (2013) Ibrutinib In Combination With Rituximab (iR) Is Well Tolerated and Induces a High Rate Of Durable Remissions In Patients With High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): New, Updated Results Of a Phase II Trial In 40 Patients, Abstract 675 presented at 55th ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans, LA 7-10 Dec. Без связи с теорией, полагают, что добавление ибрутиниба усиливает пролиферативный ответ Т-клетки и может сдвигать Т-клетки от фенотипа Т-хелпера 2 (Th2) к Т-хелперу 1 (Th1). Th1 и Th2 представляют собой фенотипы хелперных Т-клеток, где Th1 по сравнению с Th2 направляют различные пути иммунного ответа. Фенотип Th1 ассоциирован с провоспалительными ответами, например, для уничтожения клеток, таких как внутриклеточные

патогены/вирусы или злокачественные клетки или закреплению аутоиммунных ответов. Фенотип Th2 ассоциирован с накоплением эозинофила и противовоспалительными ответами.

В некоторых вариантах осуществления способов, применений и композиций в настоящем описании ингибитор BTK представляет собой ингибитор BTK, описанный в международной заявке WO/2015/079417, которая полностью включена. Например, в некоторых вариантах осуществления ингибитор BTK представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль:



(I)

где,

R1 представляет собой водород, C1-C6алкил необязательно замещенный гидрокси;

R2 представляет собой водород или галоген;

R3 представляет собой водород или галоген;

R4 представляет собой водород;

R5 представляет собой водород или галоген;

или R4 и R5 соединены друг с другом и обозначают связь -CH2-, -CH2-CH2-, -CH=CH-, -CH=CH-CH2-; -CH2-CH=CH- или -CH2-CH2-CH2-;

R6 и R7 означают независимо друг от друга H, C1-C6алкил необязательно замещенный гидроксил, C3-C6циклоалкил, необязательно замещенный галогеном или гидрокси, или галоген;

R8, R9, R, R', R10 и R11 независимо друг от друга обозначают H или C1-C6алкил, необязательно замещенный C1-C6алкокси; или любые два из R8, R9, R, R', R10 и R11 совместно с атомом углерода, с которым они связаны, могут образовывать 3-6-членное насыщенное карбоциклическое кольцо;

R12 представляет собой водород или C1-C6алкил, необязательно замещенный галогеном или C1-C6алкокси;

или R12 и любой из R8, R9, R, R', R10 или R11 совместно с атомами, с которыми они связаны, могут образовывать 4-, 5-, 6- или 7-членное азациклическое кольцо, где кольцо необязательно может являться замещенным галогеном, циано, гидроксил, C1-C6алкилом или C1-C6алкокси;

n представляет собой 0 или 1, и

R13 представляет собой C2-C6алкенил, необязательно замещенный C1-C6алкилом, C1-C6алкокси или N,N-ди-C1-C6алкиламино; C2-C6алкинил, необязательно замещенный C1-C6алкилом или C1-C6алкокси, или C2-C6алкиленилоксид, необязательно замещенным C1-C6алкилом.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор BTK формулы I выбирают из: N-(3-(5-((1-акрилоилазетидин-3-ил)окси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; (E)-N-(3-(6-амино-5-((1-(бут-2-еноил)азетидин-3-ил)окси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; N-(3-(6-амино-5-((1-пропиолоилазетидин-3-ил)окси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; N-(3-(6-амино-5-((1-(бут-2-иноил)азетидин-3-ил)окси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; N-(3-(5-((1-акрилоилпиперидин-4-ил)окси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; N-(3-(6-амино-5-(2-(N-метилакриламидо)этокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; (E)-N-(3-(6-амино-5-(2-(N-метилбут-2-енамидо)этокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; N-(3-(6-амино-5-(2-(N-метилпропиоламидо)этокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; (E)-N-(3-(6-амино-5-(2-(4-метокси-N-метилбут-2-енамидо)этокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; N-(3-(6-амино-5-(2-(N-метилбут-2-инамидо)этокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; N-(2-((4-амино-6-(3-(4-циклопропил-2-фторбензамидо)-5-фтор-2-метилфенил)пиримидин-5-

ил)окси)этил)-N-метилоксиран-2-карбоксамида; N-(2-((4-амино-6-(3-(6-циклопропил-8-фтор-1-оксоизохинолин-2(1H)-ил)фенил)пиримидин-5-ил)окси)этил)-N-метилакриламида; N-(3-(5-(2-акриламидоэтокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; N-(3-(6-амино-5-(2-(N-этилакриламидо)этокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; N-(3-(6-амино-5-(2-(N-(2-фторэтил)акриламидо)этокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; N-(3-(5-((1-акриламидоциклопропил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; (S)-N-(3-(5-(2-акриламидопропокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; (S)-N-(3-(6-амино-5-(2-(бут-2-инамидо)пропокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; (S)-N-(3-(6-амино-5-(2-(N-метилакриламидо)пропокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; (S)-N-(3-(6-амино-5-(2-(N-метилбут-2-инамидо)пропокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; N-(3-(6-амино-5-(3-(N-метилакриламидо)пропокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; (S)-N-(3-(5-((1-акрилоилпирролидин-2-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; (S)-N-(3-(6-амино-5-((1-(бут-2-иноил)пирролидин-2-ил)метокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; (S)-2-(3-(5-((1-акрилоилпирролидин-2-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-(гидроксиметил)фенил)-6-циклопропил-3,4-дигидроизохинолин-1(2H)-она; N-(2-((4-амино-6-(3-(6-циклопропил-1-оксо-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-ил)-5-фтор-2-(гидроксиметил)фенил)пиримидин-5-ил)окси)этил)-N-метилакриламида; N-(3-(5-(((2S,4R)-1-акрилоил-4-метоксипирролидин-2-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; N-(3-(6-амино-5-(((2S,4R)-1-(бут-2-иноил)-4-метоксипирролидин-2-ил)метокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; 2-(3-(5-(((2S,4R)-1-акрилоил-4-метоксипирролидин-

2-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-(гидроксиметил)фенил)-6-циклопропил-3,4-дигидроизохинолин-1(2H)-она; N-(3-(5-(((2S,4S)-1-акрилоил-4-метоксипирролидин-2-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; N-(3-(6-амино-5-(((2S,4S)-1-(бут-2-иноил)-4-метоксипирролидин-2-ил)метокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; N-(3-(5-(((2S,4R)-1-акрилоил-4-фторпирролидин-2-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; N-(3-(6-амино-5-(((2S,4R)-1-(бут-2-иноил)-4-фторпирролидин-2-ил)метокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; (S)-N-(3-(5-((1-акрилоилазетидин-2-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; (S)-N-(3-(6-амино-5-((1-пропиолоилазетидин-2-ил)метокси)пиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; (S)-2-(3-(5-((1-акрилоилазетидин-2-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-(гидроксиметил)фенил)-6-циклопропил-3,4-дигидроизохинолин-1(2H)-она; (R)-N-(3-(5-((1-акрилоилазетидин-2-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; (R)-N-(3-(5-((1-акрилоилпиперидин-3-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; N-(3-(5-(((2R,3S)-1-акрилоил-3-метоксипирролидин-2-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида; N-(3-(5-(((2S,4R)-1-акрилоил-4-цианопирролидин-2-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида или N-(3-(5-(((2S,4S)-1-акрилоил-4-цианопирролидин-2-ил)метокси)-6-аминопиримидин-4-ил)-5-фтор-2-метилфенил)-4-циклопропил-2-фторбензамида.

Если не предусмотрено иное, химические термины, используемые выше в описании ингибитора BTK формулы I, используют в соответствии с их значениями как установлено в международной заявке WO/2015/079417, которая полностью включена в настоящее описание.

В одном из вариантов осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR, выбранный из темсиролимуса;

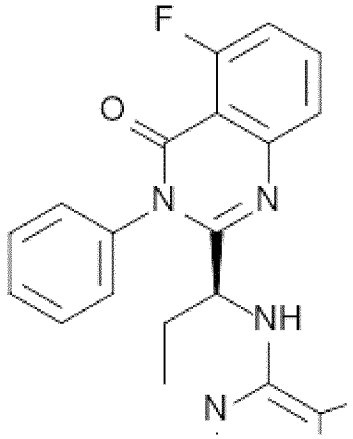
ридафоролимуса (1*R*,2*R*,4*S*)-4-[(2*R*)-2[(1*R*,9*S*,12*S*,15*R*,16*E*,18*R*,19*R*,21*R*,23*S*,24*E*,26*E*,28*Z*,30*S*,32*S*,35*R*)-1,18-дигидрокси-19,30-диметокси-15,17,21,23,29,35-гексаметил-2,3,10,14,20-пентаоксо-11,36-диокса-4-азатрицикло[30.3.1.$0^{4,9}$]гексатриаконт-16,24,26,28-тетраен-12-ил]пропил]-2-метоксициклогексилдиметилфосфината, также известного как AP23573 и MK8669; эверолимуса (RAD001); рапамицина (AY22989); симапимода; (5-{2,4-бис[(3*S*)-3-метилморфолин-4-ил]пиридо[2,3-*d*]пиримидин-7-ил}-2-метоксифенил)метанола (AZD8055); 2-амино-8-[*транс*-4-(2-гидроксиэтокси)циклогексил]-6-(6-метокси-3-пиридинил)-4-метил-пиридо[2,3-*d*]пиримидин-7(8*H*)-она (PF04691502) и N^2-[1,4-диоксо-4-[[4-(4-оксо-8-фенил-4*H*-1-бензопиран-2-ил)морфолиний-4-ил]метокси]бутил]-L-аргинилглицил-L-α-аспартил-L-серина (SEQ ID NO: 64) внутренней соли (SF1126) и XL765.

В одном из вариантов осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR, например, рапамицин, и рапамицин вводят в дозе приблизительно 3 мг, 4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг, 10 мг (например, 6 мг) каждые сутки в течение определенного периода времени, например, каждые сутки в течение цикла продолжительностью 21 сутки или каждые сутки в течение цикла продолжительностью 28 суток. В одном из вариантов осуществления рапамицин вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более циклов. В одном из вариантов осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор mTOR, например, эверолимус, и эверолимус вводят в дозе приблизительно 2 мг, 2,5 мг, 3 мг, 4 мг, 5 мг, 6 мг, 7 мг, 8 мг, 9 мг, 10 мг, 11 мг, 12 мг, 13 мг, 14 мг, 15 мг (например, 10 мг) каждые сутки в течение определенного периода времени, например, каждые сутки в течение цикла продолжительностью 28 суток. В одном из вариантов осуществления эверолимус вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более циклов.

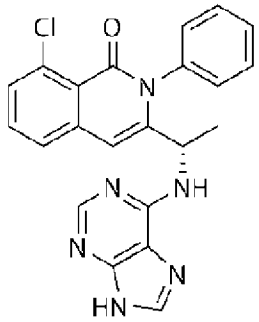
В одном из вариантов осуществления ингибитор киназы представляет собой ингибитор MNK, выбранный из CGP052088; 4-амино-3-(*пара*-фторфениламино)пиразоло[3,4-*d*]пиримидина

(CGP57380); церкоспорамида; ETC-1780445-2 и 4-амино-5-(4-фторанилино)пиразоло[3,4-*d*]пиримидина.

В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с ингибитором фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) (например, ингибитором PI3K, описываемым в настоящем описании, например, иделалисибом или дувелисибом) и/или ритуксимабом. В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с иделалисибом и ритуксимабом. В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с дувелисибом и ритуксимабом. Иделалисиб (также называемый GS-1101 или CAL-101; Gilead) представляет собой низкомолекулярное соединение, которое блокирует дельта-изоформу PI3K. Структура иделалисиба (5-фтор-3-фенил-2-[(1*S*)-1-(7*H*-пурин-6-иламино)пропил]-4(3*H*)-хиназолинона) представлена ниже.



Дувелисиб (также называемый IPI-145; Infinity Pharmaceuticals и Abbvie) представляет собой низкомолекулярное соединение, которое блокирует PI3K-δ,γ. Структура дувелисиба (8-хлор-2-фенил-3-[(1S)-1-(9H-пурин-6-иламино)этил]-1(2H)-изохинолинона) представлена ниже.



В вариантах осуществления индивидуум страдает CLL. В вариантах осуществления индивидуум страдает рецидивирующим CLL, например, индивидуум ранее получал терапию против злокачественной опухоли (например, ранее вводили антитело против CD20 или ранее вводили ибрутиниба). Например, индивидуум имеет делецию в коротком плече хромосомы 17 (del(17p), например, в лейкозной клетке). В других примерах индивидуум не имеет del(17p). В вариантах осуществления у индивидуума содержится лейкозная клетка, содержащая мутация в гене вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина (*IgV*$_H$). В других вариантах осуществления индивидуум не содержит лейкозную клетку, содержащую мутацию в гене вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина (*IgV*$_H$). В вариантах осуществления индивидуум имеет делецию в длинном плече хромосомы 11 (del(11q)). В других вариантах осуществления индивидуум не имеет del(11q). В вариантах осуществления иделалисиб вводят в дозе приблизительно 100-400 мг (например, 100-125, 125-150, 150-175, 175-200, 200-225, 225-250, 250-275, 275-300, 325-350, 350-375 или 375-400 мг), например, два раза в сутки. В вариантах осуществления дувелисиб вводят в дозе приблизительно 15-100 мг (например, приблизительно 15-25, 25-50, 50-75 или 75-100 мг), например, дважды в сутки. В вариантах осуществления ритуксимаб вводят в дозе приблизительно 350-550 мг/м^2 (например, 350-375, 375-400, 400-425, 425-450, 450-475 или 475-500 мг/м^2), например, внутривенно.

В одном из вариантов осуществления ингибитор киназы представляет собой двойной ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и mTOR, выбранный из 2-амино-8-[*транс*-4-(2-гидроксиэтокси)циклогексил]-6-(6-метокси-3-пиридинил)-4-метил-

пиридо[2,3-*d*]пиримидин-7(8*H*)-она (PF-04691502); *N*-[4-[[4-(диметиламино)-1-пиперидинил]карбонил]фенил]-*N*'-[4-(4,6-di-4-морфолинил-1,3,5-триазин-2-ил)фенил]мочевины (PF-05212384, PKI-587); 2-метил-2-{4-[3-метил-2-оксо-8-(хинолин-3-ил)-2,3-дигидро-1*H*-имидазо[4,5-c]хинолин-1-ил]фенил}пропаннитрила (BEZ-235); апитолисиба (GDC-0980, RG7422); 2,4-дифтор-N-{2-(метилокси)-5-[4-(4-пиридазинил)-6-хинолинил]-3-пиридинил}бензолсульфонамида (GSK2126458); малеиновой кислоты 8-(6-метоксипиридин-3-ил)-3-метил-1-(4-(пиперазин-1-ил)-3-(трифторметил)фенил)-1H-имидазо[4,5-c]хинолин-2(3H)-она (NVP-BGT226); 3-[4-(4-морфолинилпиридо[3',2':4,5]фуро[3,2-d]пиримидин-2-ил]фенола (PI-103); 5-(9-изопропил-8-метил-2-морфолино-9H-пурин-6-ил)пиримидин-2-амина (VS-5584, SB2343) и N-[2-[(3,5-диметоксифенил)амино]хиноксалин-3-ил]-4-[(4-метил-3-метоксифенил)карбонил]аминофенилсульфонамида (XL765).

В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с ингибитором киназы анапластической лимфомы (ALK). Иллюстративные киназы ALK включают, но не ограничиваются ими, кризотиниб (Pfizer), церитиниб (Novartis), алектиниб (Chugai), бригатиниб (также называемый AP26113; Ariad), энтректиниб (Ignyta), PF-06463922 (Pfizer), TSR-011 (Tesaro) (см., например, клиническое испытание с идентификационным № NCT02048488), CEP-37440 (Teva) и X-396 (Xcovery). В некоторых вариантах осуществления индивидуум страдает солидной злокачественной опухолью, например, солидной злокачественной опухолью, описываемой в настоящем описании, например, раком легких.

Химическое название кризотиниба представляет собой 3-[(1*R*)-1-(2,6-дихлор-3-фторфенил)этокси]-5-(1-пиперидин-4-илpyrazol-4-ил)пиридин-2-амин. Химическое название церитиниба представляет собой 5-хлор-N^2-[2-изопропокси-5-метил-4-(4-пиперидинил)фенил]-N^4-[2-(изопропилсульфонил)фенил]-2,4-пиримидиндиамин. Химическое название алектиниба представляет собой 9-этил-6,6-диметил-8-(4-морфолинопиперидин-1-ил)-11-оксо-6,11-дигидро-5H-бензо[b]карбазол-3-карбонитрил. Химическое название бригатиниба представляет собой 5-хлор-N^2-{4-[4-(диметиламино)-1-пиперидинил]-

2-метоксифенил}-N^4-[2-(диметилфосфорил)фенил]-2,4-пиримидиндиамин. Химическое название энтректиниба представляет собой N-(5-(3,5-дифторбензил)-1H-индазол-3-ил)-4-(4-метилпиперазин-1-ил)-2-((тетрагидро-2H-пиран-4-ил)амино)бензамид. Химическое название PF-06463922 представляет собой (10R)-7-амино-12-фтор-2,10,16-триметил-15-оксо-10,15,16,17-тетрагидро-2H-8,4-(метено)пиразоло[4,3-h][2,5,11]-бензоксадиазациклотетрадецин-3-карбонитрил. Химическая структура CEP-37440 представляет собой (S)-2-((5-хлор-2-((6-(4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил)-1-метокси-6,7,8,9-тетрагидро-5H-бензо[7]аннулен-2-ил)амино)пиримидин-4-ил)амино)-N-метилбензамид. Химическое название X-396 представляет собой (R)-6-амино-5-(1-(2,6-дихлор-3-фторфенил)этокси)-N-(4-(4-метилпиперазин-1-карбонил)фенил)пиридазин-3-карбоксамид.

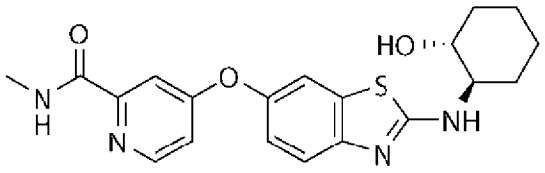
Также можно использовать лекарственные средства, которые ингибируют кальций-зависимую фосфатазу кальциневрин (циклоспорин и FK506) или ингибируют киназу p70S6, которая является важной для индуцируемого фактором роста сигнального каскада (рапамицин) (Liu et al., Cell, 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun., 5:763-773, 1993). В дополнительном аспекте клеточные композиции по настоящему изобретению можно вводить пациенту в сочетании (например, до, одномоментно или после) с трансплантацией костного мозга, Т-клеточной аблятивной терапией с использованием химиотерапевтических средств, таких как, флударабин, дистанционной лучевой терапией (XRT), циклофосфамидом, и/или антителами, такими как OKT3 или CAMPATH. В одном из аспектов клеточные композиции по настоящему изобретению вводят после В-клеточной аблятивной терапии, такой как средствами, которые взаимодействуют с CD20, например, ритуксаном. Например, в одном из вариантов осуществления индивидуумы могут получать стандартное лечение высокими дозами химиотерапии с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В определенных вариантах осуществления после трансплантации индивидуумы получают инфузию размноженных иммунных клеток по настоящему изобретению. В дополнительном варианте осуществления

размноженные клетки вводят до хирургической операции или после нее.

В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с ингибитором индоламин-2,3-диоксигеназой (IDO). IDO представляет собой фермент, который катализирует разрушение аминокислоты L-триптофана до кинуренина. Многие злокачественные опухоли сверхэкспрессируют IDO, например, рак простаты, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак желудка, рак яичника, рак головы и рак легких. pDC, макрофаги и дендритные клетки (DCs) могут экспрессировать IDO. Без связи с теорией полагают, что снижение уровня L-триптофана (например, катализируемое IDO) приводит к иммуносупрессорному окружению в результате индукции толерантности и апоптоза Т-клеток. Таким образом, без связи с теорией полагают, что ингибитор IDO может усиливать эффективность экспрессирующей CAR клетки, описываемой в настоящем описании, например, посредством снижения подавления или гибели экспрессирующих CAR иммунных клеток. В вариантах осуществления индивидуум страдает солидной опухолью, например, солидной опухолью, описываемой в настоящем описании, например, раком простаты, колоректальным раком, раком поджелудочной железы, раком шейки матки, раком желудка, раком яичника, раком головы и раком легких. Иллюстративные ингибиторы IDO включают, но не ограничиваются ими, 1-метилтриптофан, индоксимод (NewLink Genetics) (см., например, клинические испытания с идентификационными № NCT01191216; NCT01792050 и INCB024360 (Incyte Corp.) (см., например, клинические испытания с идентификационным № NCT01604889; NCT01685255).

В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с модулятором миелоидными супрессорными клетками (MDSC). MDSC аккумулируются на периферии и в очагах опухоли многих солидных опухолей. Эти клетки подавляют Т-клеточные ответы, таким образом, препятствуя эффективности терапии на основе экспрессирующих CAR клеток. Без связи с теорией полагают, что введение модулятора MDSC повысит эффективность

экспрессирующей CAR клетки, описываемой в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления индивидуум страдает солидной опухолью, например, солидной опухолью описываемой в настоящем описании, например, глиобластомой. Иллюстративные модуляторы MDSC включают, но не ограничиваются ими, MCS110 и BLZ945. MCS110 представляет собой моноклональное антитело (mAb) против макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF). См., например, клиническое испытание с идентификационным № NCT00757757. BLZ945 представляет собой низкомолекулярный ингибитор рецептора колониестимулирующего фактора 1 (CSF1R). См., например, Pyonteck et al., Nat. Med., 19(2013):1264-72. Структура BLZ945 представлена ниже.



В вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации со средством, которое ингибирует или снижает активность иммуносупрессивных плазматических клеток. Было продемонстрировано, что иммуносупрессивные плазматические клетки препятствуют зависимой от Т-клеток иммуногенной химиотерапии, такой как оксалиплатин (Shalapour et al., Nature, 2015, 521:94-101). В одном из вариантов осуществления иммуносупрессивные плазматические клетки могут экспрессировать один или более из IgA, интерлейкина (IL)-10 и PD-L1. В одном из вариантов осуществления средство представляет собой экспрессирующую CD19 CAR клетку или экспрессирующую CAR BCMA клетку.

В некоторых вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с полипептидом интерлейкина 15 (IL-15), полипептидом рецептора альфа интерлейкина 15 (IL-15Ra) или в комбинации с

полипептидом IL-15 и полипептидом IL-15Ra например, hetIL-15 (Admune Therapeutics, LLC). hetIL-15 представляет собой гетеродимерный нековалентный комплекс IL-15 и IL-15Ra. hetIL-15 описан, например, в U.S. 8124084, U.S. 2012/0177598, U.S. 2009/0082299, U.S. 2012/0141413 и U.S. 2011/0081311, включенных в настоящее описание посредством ссылки. В вариантах осуществления het-IL-15 вводят подкожно. В вариантах осуществления индивидуум страдает злокачественной опухолью, например, солидной злокачественной опухолью, например, меланомой или раком толстого кишечника. В вариантах осуществления индивидуум страдает метастатической злокачественной опухолью.

В вариантах осуществления индивидууму, страдающему заболеванием, описываемым в настоящем описании, например, гематологическим нарушением, например, AML или MDS, вводят экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, в комбинации со средством, например, цитотоксическим или химиотерапевтическим средством, биологической терапией (например, антителом, например, моноклональным антителом или клеточной терапией) или ингибитором (например, ингибитором киназы). В вариантах осуществления индивидууму вводят экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, в комбинации с цитотоксическим средством, например, CPX-351 (Celator Pharmaceuticals), цитарабином, даунорубицином, возароксином (Sunesis Pharmaceuticals), сапацитабином (Cyclacel Pharmaceuticals), идарубицином или митоксантроном. CPX-351 представляет собой липосомальный состав, содержащий цитарабин и даунорубицин в молярном отношении 5:1. В вариантах осуществления индивидууму вводят экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, в комбинации с гипометилирующим средством, например, ингибитором ДНК-метилтрансферазы, например, азацитидином или децитабином. В вариантах осуществления индивидууму вводят экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, в комбинации с биологической терапией, например, терапией антителом или клеточной терапией, например, 225Ac-линтузумабом (актимаб-A; Actinium Pharmaceuticals), IPH2102 (Innate Pharma/Bristol Myers Squibb), SGN-CD33A (Seattle

Genetics) или гемтузумабом озогамицином (милотарг; Pfizer). SGN-CD33A представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), содержащий димер пирролобензодиазепина, который связан с антителом против CD33. Актимаб-A представляет собой антитело против CD33 (линтузумаб), меченное актинием. IPH2102 представляет собой моноклональное антитело, которое направленно воздействует на иммуноглобулиноподобные рецепторы киллерных клеток (KIR). В вариантах осуществления индивидууму вводят экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, в комбинации с ингибитором FLT3, например, сорафенибом (Bayer), мидостаурином (Novartis), квизартинибом (Daiichi Sankyo), креноланибом (Arog Pharmaceuticals), PLX3397 (Daiichi Sankyo), AKN-028 (Akinion Pharmaceuticals) или ASP2215 (Astellas). В вариантах осуществления индивидууму вводят экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, в комбинации с ингибитором изоцитратдегидрогеназы (IDH), например, AG-221 (Celgene/Agios) или AG-120 (Agios/Celgene). В вариантах осуществления индивидууму вводят экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, в комбинации с регулятором клеточного цикла, например, ингибитором polo-подобной киназы 1 (Plk1), например, воласертибом (Boehringer Ingelheim), или ингибитором циклинзависимой киназы 9 (Cdk9), например, алвоцидибом (Tolero Pharmaceuticals/Sanofi Aventis). В вариантах осуществления индивидууму вводят экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, в комбинации с ингибитором сети передачи сигнала B-клеточного рецептора, например, ингибитором B-клеточной лимфомы 2 (Bcl-2), например, венетоклаксом (Abbvie/Roche), или ингибитором тирозинкиназы Брутона (Btk), например, ибрутинибом (Pharmacyclics/Johnson and Johnson Janssen Pharmaceuticals). В вариантах осуществления индивидууму вводят экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, в комбинации с ингибитором аминопептидазы M1, например, тоседостатом (CTI BioPharma/Vernalis); ингибитором гистондеацетилазы (HDAC), например, прациностатом (MEI Pharma); мультикиназным ингибитором, например, ригосертибом (Onconova

Pharmaceuticals/Baxter/SymBio) или обратимым пептидным агонистом CXCR4, например, BL-8040 (BioLineRx).

В другом варианте осуществления индивидуумы получают инфузию композиций экспрессирующих CAR клеток по настоящему изобретению до трансплантации клеток, например, трансплантации аллогенных стволовых клеток. В предпочтительном варианте осуществления экспрессирующие CAR клетки транзиторно экспрессируют NKR-CAR, например KIR-CAR, например, в результате электропорации иРНК, кодирующей NKR-CAR, например, KIR-CAR, таким образом, экспрессия опухолевого антигена заканчивается до инфузии донорных стволовых клеток для предотвращения недостаточности трансплантата.

Некоторые пациенты могут испытывать аллергические реакции на соединения по настоящему изобретению и/или другое средство(а) против злокачественной опухоли во время или после введения; таким образом, часто вводят противоаллергические средства для сведения к минимуму риска аллергической реакции. Подходящие противоаллергические средства включают кортикостероиды, такие как дексаметазон (например, Decadron®), беклометазон (например, Beclovent®), гидрокортизон (также известный как кортизон, гидрокортизон сукцината натрия, гидрокортизон фосфата натрия и продаваемый под товарными наименованиями Ala-Cort®, гидрокортизона фосфат, Solu-Cortef®, Hydrocort Acetate® и Lanacort®), преднизолон (продаваемый под товарными наименованиями Delta-Cortel®, Orapred®, Pediapred® и Prelone®), преднизон (продаваемый под товарными наименованиями Deltasone®, Liquid Red®, Meticorten® и Orasone®), метилпреднизолон (также известный как 6-метилпреднизолон, метилпреднизолона ацетат, метилпреднизолона сукцинат натрия, продаваемый под товарными наименованиями Duralone®, Medralone®, Medrol®, M-Prednisol® и Solu-Medrol®); антигистамины, такие как дифенгидрамин (например, Benadryl®), гидроксизин и ципрогептадин, и бронхолитики, такие как агонисты бета-адренергических рецепторов, альбутерол (например, Proventil®) и тербуталин (Brethine®).

Некоторые пациенты могут испытывать тошноту во время и после введения соединения по настоящему изобретению и/или другого средства(в) против злокачественной опухоли; таким образом, используют противорвотные средства для профилактики тошноты (верхний желудок) и рвоты. Подходящие противорвотные средства включают апрепитант (Emend®), ондансетрон (Zofran®), гранисетрон HCl (Kytril®), лоразепам (Ativan®), дексаметазон (Decadron®), прохлорпемазин (Compazine®), касопитант (Rezonic® и Zunrisa®) и их сочетания.

Для того чтобы пациент чувствовал себя более комфортно часто предписывают лекарственное средство для облегчения боли, которую испытывают в течение периода лечения. Как правило, используют общие отпускаемые без рецепта анальгетики, такие как Tylenol®. Однако для умеренной и сильной боли также пригодными являются лекарственные средства на основе опиоидных аналгетиков, такие как гидрокодон/парацетамол или гидрокодон/ацетаминофен (например, Vicodin®), морфин (например, Astramorph® или Avinza®), оксикодон (например, OxyContin® или Percocet®), оксиморфон гидрохлорид (Opana®) и фентанил (например, Duragesic®).

Для защиты нормальных клеток от токсичность лекарственного средства и для ограничения органной токсичности в качестве вспомогательной терапии можно использовать цитопротекторные средства (такие как нейропротекторы, ловушки свободных радикалов, кардиопротекторы, нейтрализующие кровоизлияния средство на основе антрациклинов, питательные вещества и т.п.). Подходящие цитопротекторные средства включают амифостин (Ethyol®), глутамин, димесна (Tavocept®), месна (Mesnex®), дексразоксан (Zinecard® или Totect®), ксалипроден (Xaprila®) и лейковорин (также известные как лейковорин кальция, цитроворум-фактор и фолиновая кислота).

Структуру активных соединений, которые можно идентифицировать по кодовым номерам, непатентованным или торговым наименованиям, можно получать из текущего издания

стандартного справочника "The Merck Index" или из баз данных, например, Patents International (например, публикаций IMS World).

Указанные выше соединения, которые можно использовать в комбинации с соединением по настоящему изобретению, можно получать и вводить, как описано в данной области, такой как в цитируемых выше документах.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим по меньшей мере одно соединение по настоящему изобретению (например, соединение по настоящему изобретению) или его фармацевтически приемлемую соль совместно с фармацевтически приемлемым носителем, подходящим для введение являющемуся человеком или животным индивидууму, отдельно или совместно с другими средствами против злокачественной опухоли.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения являющихся человеком или животным индивидуумов, страдающих от клеточного пролиферативного заболевания, такого как злокачественная опухоль. Настоящее изобретение относится к способам лечения являющегося человеком или животным индивидуума, нуждающегося в таком лечении, включающим введение индивидууму терапевтически эффективного количества соединения по настоящему изобретению (например, соединения по настоящему изобретению) или его фармацевтически приемлемой соли отдельно или в комбинации с другими средствами против злокачественной опухоли.

В частности, композиции формулируют совместно в виде терапевтической или вводимой раздельно комбинации.

В комбинированном лечении соединение по настоящему изобретению и другое средство(а) против злокачественной опухоли можно вводить одномоментно, одновременно или последовательно без каких-либо конкретных ограничений по времени, где такое введение обеспечивает терапевтически эффективные уровни двух соединений в организме пациента.

В предпочтительном варианте осуществления соединение по настоящему изобретению и другое средство(а) против

злокачественной опухоли, как правило, вводят последовательно в любом порядке посредством инфузии или перорально. Режим дозирования может изменяться в зависимости от стадии заболевания, физической подготовленности пациента, показателей безопасности отдельных лекарственных средств и от переносимости индивидуальных лекарственных средств, а также других критериев, хорошо известных лечащему врачу(ам) и врачу(ам)-терапевту(ам), вводящим комбинацию. Соединение по настоящему изобретению и другое средство(а) против злокачественной опухоли можно вводить через несколько минут друг от друга, часов, суток или даже недель друг от друга в зависимости от конкретного цикла, используемого для лечения. Кроме того, цикл может включать введение одного лекарственного средства более часто по сравнению с другим во время цикла лечения и в различных дозах на введение лекарственного средства.

Другой аспект настоящего изобретения относится к наборам, которые содержат одно или более соединений по настоящему изобретению и партнер по комбинации, как описано в настоящем описании. Характерные наборы содержат (а) соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль, (b) по меньшей мере один партнер по комбинации, например, как указано выше, таким образом, такой набор может содержать вкладыш в упаковку или другую этикетку, включая инструкции по введению.

Соединение по настоящему изобретению также можно использовать с целью преимущества в комбинации с известными терапевтическими способами, например, введение гормонов или в частности облучения. Соединение по настоящему изобретению можно в частности использовать в качестве радиосенсибилизирующего средства, особенно для лечения опухолей, которые характеризуются слабой чувствительностью к лучевой терапии.

В одном из вариантов осуществления индивидууму можно вводить средство, которое снижает или улучшает побочный эффект, связанный с введением экспрессирующей CAR клетки. Побочные эффекты, связанные с введением экспрессирующей CAR клетки, включают, но не ограничиваются ими, CRS и гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (HLH), также называемый синдромом активации

макрофагов (MAS). Симптомы CRS включают высокие температуры, тошноту, преходящую гипотензию, гипоксию и т.п. CRS может включать клинические конституциональные признаки и симптомы, такие как лихорадка, усталость, анорексия, миалгии, артралгии, тошноту, рвоту и головную боль. CRS может включать клинические кожные признаки и симптомы, такие как высыпание. CRS может включать клинические желудочно-кишечные признаки и симптомы, такие как тошнота, рвота и диарея. CRS может включать клинические респираторные признаки и симптомы, такие как тахипноэ и гипоксемия. CRS может включать клинические сердечно-сосудистые признаки и симптомы, такие как тахикардия, увеличенное пульсовое давление, гипотензия, увеличенный сердечный выброс (ранний) и потенциально сниженный сердечный выброс (поздний). CRS может включать клинические признаки и симптомы свертывания крови, такие как повышенный уровень d-димера, гипофибриногенемия с кровотечением или без него. CRS может включать клинические почечные признаки и симптомы, такие как азотемия. CRS может включать клинические печеночные признаки и симптомы, такие как повышение активности трансаминаз и гипербилирубинемия. CRS может включать клинические неврологические признаки и симптомы, такие как головная боль, изменения психического состояния, спутанность сознания, делирий, затруднения с подбором слов или выраженная афазия, галлюцинации, тремор, дисметрия, измененная походка и судороги.

Таким образом, способы, описываемые в настоящем описании, могут включать введение экспрессирующей CAR клетки, описываемой в настоящем описании, индивидууму и дополнительно введение одного или более средств для ведения повышенных уровней растворимого фактора, возникающего в результате лечения экспрессирующей CAR клеткой. В одном из вариантов осуществления растворимый фактор, повышенный у индивидуума, представляет собой один или более из IFN-γ, TNFα, IL-2 и IL-6. В одном из вариантов осуществления фактор, повышенный у индивидуума, представляет собой один или более из IL-1, GM-CSF, IL-10, IL-8, IL-5 и фракталкин. Таким образом, средство, вводимое для лечения такого

побочного эффекта, может представлять собой средство, которое нейтрализует один или более таких растворимых факторов. В одном из вариантов осуществления средство, которое нейтрализует одну или более таких растворимых форм, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Примеры таких средств включают, но не ограничиваются ими, стероид (например, кортикостероид), ингибитор TNFα и ингибитор IL-6. Примером ингибитора TNFα является молекула антитела против TNFα, такая как, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол и голимумаб. Другой пример ингибитора TNFα представляет собой слитый белок, такой как энтанерцепт. Низкомолекулярный ингибитор TNFα включает, но не ограничиваются ими, производные ксантина (например, пентоксифиллин) и бупропиона. Пример ингибитора IL-6 представляет собой молекулу антитела против IL-6, такую как тоцилизумаб (toc), сарилумаб, элсилимомуб, CNTO 328, ALD518/BMS-945429, CNTO 136, CPSI-2364, CDP6038, VX30, ARGX-109, FE301 и FM101. В одном из вариантов осуществления молекула антитела против IL-6 представляет собой тоцилизумаб. Пример ингибитора на основе IL-1R представляет собой анакинру.

В определенном варианте осуществления индивидууму вводят кортикостероид, такой как, например, наряду с другими метилпреднизолон, гидрокортизон.

В некоторых вариантах осуществления индивидууму вводят сосудосуживающее средство, такое как, например, норадреналин, дофамин, фенилэфрин, эпинефрин, вазопрессин или их сочетание.

В одном из вариантов осуществления индивидууму можно вводить жаропонижающее средство. В одном из вариантов осуществления индивидууму можно вводить анальгетическое средство.

В одном из вариантов осуществления индивидууму можно вводить средство, которое усиливает активность экспрессирующей CAR клетки. Например, в одном из вариантов осуществления средство может представлять собой средство, которое ингибирует ингибирующую молекулу, например, средство представляет собой ингибитор контрольных точек. Ингибирующие молекулы, например,

Programmed Death 1 (PD1), в некоторых вариантах осуществления могут снижать способность экспрессирующей CAR клетки повышать ответ иммунного эффектора. Примеры ингибирующих молекул включают PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 и TGFR бета. Ингибирование ингибирующей молекулы, например, посредством ингибирования на уровне ДНК, РНК или белка может оптимизировать характеристики экспрессирующей CAR клетки. В вариантах осуществления для ингибирования экспрессии ингибирующей молекулы в экспрессирующей CAR клетке можно использовать ингибирующую нуклеиновую кислоту, например, ингибирующую нуклеиновую кислоту, например, дцРНК, например, миРНК или кшРНК, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (CRISPR), эффекторную нуклеазу, подобную активаторам транскрипции (TALEN), или эндонуклеазу цинкового пальца (ZFN), например, как описано в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления ингибитор представляет собой кшРНК. В одном из вариантов осуществления ингибирующую молекулу ингибируют в экспрессирующей CAR клетке. В этих вариантах осуществления молекула дцРНК, которая ингибирует экспрессию ингибирующей молекулы, является связанной с нуклеиновой кислотой, кодирующим компонентом, например, всеми компонентами CAR.

В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует, функцию Т-клетки, является функционально связанной с промотором, например, получаемым из H1 или U6 промотором, таким образом, что экспрессируется молекула дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клетки, например, экспрессируется в экспрессирующей CAR клетке. См. например, Tiscornia G., "Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA", Chapter 3, in Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA (eds. Friedmann and Rossi). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2007; Brummelkamp T.R. et al. (2002) Science, 296: 550-553; Miyagishi M. et al.,

(2002) Nat. Biotechnol., 19: 497-500. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клетки, содержится в том же векторе, например, лентивирусном векторе, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую компонент, например, все компоненты CAR. В таком варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клетки, располагается в векторе, например, лентивирусном векторе, 5'- или 3'-конце по отношению к нуклеиновой кислоте, кодирующей компонент, например, все компоненты CAR. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клетки, может транскрибироваться в том же или другом направлении, что и нуклеиновая кислота, кодирующая компонент, например, все компоненты CAR.

В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клетки, содержится в векторе, отличном от вектора, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую компонент, например, все компоненты CAR. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекула дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клетки, транзиторно экспрессируется в экспрессирующей CAR клетке. В одном из вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу дцРНК, которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клетки, стабильно интегрирована в геном экспрессирующей CAR клетки. На фигурах 44A-44E проиллюстрированы примеры векторов для экспрессии компонента, например, всех компонентов CAR с молекулой дцРНК,

которая ингибирует экспрессию молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клетки.

Ниже приведены примеры молекул дцРНК, пригодных для ингибирования экспрессии молекулы, которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клетки, где молекула которая модулирует или регулирует, например, ингибирует функцию Т-клетки, представляет собой PD-1.

В таблице 7 ниже приведены названия средств РНКи PDCD1 (PD1) (получаемых из их положений в последовательности гена PDCD1 мыши NM_008798.2) вместе с SEQ ID NO: 216-263. представляющей последовательность ДНК. Смысловая (S) и антисмысловая (AS) последовательности предоставлены как содержащие 19 мономеров и 21 мономер последовательности в этой таблице. Также указано, что положение (PoS, например, 176) получают из номера положения в последовательности гена PDCD1 мыши NM_008798.2. SEQ ID NO указаны в группах из 12, которые соответствуют "смысловой 19" SEQ ID NO: 65-76; "смысловой 21" SEQ ID NO: 77-88; "антисмысловой 21" SEQ ID NO: 89-100; "антисмысловой 19" SEQ ID NO: 101-112.

Таблица 7. Последовательности кшРНК PDCD1 (PD1) мыши

Положение в NM_008798.2	Область-мишень	Смысловая 19	Смысловая 21	Антисмысловая 21	Антисмысловая 19
176	CDS	GGAGGTCCCTCACCTTCTA (SEQ ID NO: 65)	CTGGAGGTCCCTCACCTTCTA (SEQ ID NO: 77)	TAGAAGGTGAGGGACCTCCAG (SEQ ID NO: 89)	TAGAAGGTGAGGGACCTCC (SEQ ID NO: 101)
260	CDS	CGGAGGATCTTATGCTGAA (SEQ ID NO: 66)	GTCGGAGGATCTTATGCTGAA (SEQ ID NO: 78)	TTCAGCATAAGATCCTCCGAC (SEQ ID NO: 90)	TTCAGCATAAGATCCTCCG (SEQ ID NO: 102)
359	CDS	CCCGCTTCCAGATCATACA (SEQ ID NO: 67)	TGCCCGCTTCCAGATCATACA (SEQ ID NO: 79)	TGTATGATCTGGAAGCGGGCA (SEQ ID NO: 91)	TGTATGATCTGGAAGCGGG (SEQ ID NO: 103)

528	CDS	GGAGACCTCAAC AAGATAT (SEQ ID NO: 68)	CTGGAGACCTC AACAAGATAT (SEQ ID NO: 80)	ATATCTTGTTG AGGTCTCCAG (SEQ ID NO: 92)	ATATCTTGTTG AGGTCTCC (SEQ ID NO: 104)
581	CDS	AAGGCATGGTCA TTGGTAT (SEQ ID NO: 69)	TCAAGGCATGG TCATTGGTAT (SEQ ID NO: 81)	ATACCAATGAC CATGCCTTGA (SEQ ID NO: 93)	ATACCAATGAC CATGCCTT (SEQ ID NO: 105)
584	CDS	GCATGGTCATTG GTATCAT (SEQ ID NO: 70)	AGGCATGGTCA TTGGTATCAT (SEQ ID NO: 82)	ATGATACCAAT GACCATGCCT (SEQ ID NO: 94)	ATGATACCAAT GACCATGC (SEQ ID NO: 106)
588	CDS	GGTCATTGGTAT CATGAGT (SEQ ID NO: 71)	ATGGTCATTGG TATCATGAGT (SEQ ID NO: 83)	ATGGTCATTGG TATCATGAGT (SEQ ID NO: 95)	ATGGTCATTGG TATCATGA (SEQ ID NO: 107)
609	CDS	CCTAGTGGGTAT CCCTGTA (SEQ ID NO: 72)	GCCCTAGTGGG TATCCCTGTA (SEQ ID NO: 84)	GCCCTAGTGGG TATCCCTGTA (SEQ ID NO: 96)	GCCCTAGTGGG TATCCCTG (SEQ ID NO: 108)
919	CDS	GAGGATGGACAT TGTTCTT (SEQ ID NO: 73)	ATGAGGATGGA CATTGTTCTT (SEQ ID NO: 85)	ATGAGGATGGA CATTGTTCTT (SEQ ID NO: 97)	ATGAGGATGGA CATTGTTC (SEQ ID NO: 109)
1021	3'-UTR	GCATGCAGGCTA CAGTTCA (SEQ ID NO: 74)	GAGCATGCAGG CTACAGTTCA (SEQ ID NO: 86)	GAGCATGCAGG CTACAGTTCA (SEQ ID NO: 98)	GAGCATGCAGG CTACAGTT (SEQ ID NO: 110)
1097	3'-UTR	CCAGCACATGCA CTGTTGA (SEQ ID NO: 75)	TTCCAGCACAT GCACTGTTGA (SEQ ID NO: 87)	TTCCAGCACAT GCACTGTTGA (SEQ ID NO: 99)	TTCCAGCACAT GCACTGTT (SEQ ID NO: 111)
1101	3'-UTR	CACATGCACTGT TGAGTGA (SEQ ID NO: 76)	AGCACATGCAC TGTTGAGTGA (SEQ ID NO: 88)	AGCACATGCAC TGTTGAGTGA (SEQ ID NO: 100)	AGCACATGCAC TGTTGAGT (SEQ ID NO: 112)

В таблице 8 ниже приведены названия средств РНКи на основе PDCD1 (PD1) (получаемых из их положения в последовательности

гена PDCD1 человека, вместе с SEQ ID NO. 264-311, представляющими последовательность ДНК. Смысловая (S) и антисмысловая (AS) последовательности предоставлены как содержащие 19 мономеров и 21 мономер последовательности. SEQ ID NO указаны в группах из 12, которые соответствуют "смысловой 19" SEQ ID NO: 113-124; "смысловой 21" SEQ ID NO: 125-136; "антисмысловой 21" SEQ ID NO: 137-148; "антисмысловой 19" SEQ ID NO: 149-160.

Таблица 8. последовательности кшРНК PDCD1 (PD1) человека

Положение в NM_005018.2	Область-мишень	Смысловая 19	Антисмысловая 19	Смысловая 21	Антисмысловая 21
145	CDS	GGCCAGGATGGTTCTTAGA (SEQ ID NO: 113)	TCTAAGAACCATCCTGGCC (SEQ ID NO: 125)	GCGGCCAGGATGGTTCTTAGA (SEQ ID NO: 137)	TCTAAGAACCATCCTGGCCGC (SEQ ID NO: 149)
271	CDS	GCTTCGTGCTAAACTGGTA (SEQ ID NO: 114)	TACCAGTTTAGCACGAAGC (SEQ ID NO: 126)	GAGCTTCGTGCTAAACTGGTA (SEQ ID NO: 138)	TACCAGTTTAGCACGAAGCTC (SEQ ID NO: 150)
393	CDS	GGGCGTGACTTCCACATGA (SEQ ID NO: 115)	TCATGTGGAAGTCACGCCC (SEQ ID NO: 127)	ACGGGCGTGACTTCCACATGA (SEQ ID NO: 139)	TCATGTGGAAGTCACGCCCGT (SEQ ID NO: 151)
1497	3'-UTR	CAGGCCTAGAGAAGTTTCA (SEQ ID NO: 116)	TGAAACTTCTCTAGGCCTG (SEQ ID NO: 128)	TGCAGGCCTAGAGAAGTTTCA (SEQ ID NO: 140)	TGAAACTTCTCTAGGCCTGCA (SEQ ID NO: 152)
1863	3'-UTR	CTTGGAACCCATTCCTGAA (SEQ ID NO: 117)	TTCAGGAATGGGTTCCAAG (SEQ ID NO: 129)	TCCTTGGAACCCATTCCTGAA (SEQ ID NO: 141)	TTCAGGAATGGGTTCCAAGGA (SEQ ID NO: 153)
1866	3'-UTR	GGAACCCATTCCTGAAATT (SEQ ID NO: 118)	AATTTCAGGAATGGGTTCC (SEQ ID NO: 130)	TTGGAACCCATTCCTGAAATT (SEQ ID NO: 142)	AATTTCAGGAATGGGTTCCAA (SEQ ID NO: 154)

1867	3'-UTR	GAACCCATTCCT GAAATTA (SEQ ID NO: 119)	TAATTTCAGGA ATGGGTTC (SEQ ID NO: 131)	TGGAACCCATT CCTGAAATTA (SEQ ID NO: 143)	TAATTTCAGGA ATGGGTTCCA (SEQ ID NO: 155)
1868	3'-UTR	AACCCATTCCTG AAATTAT (SEQ ID NO: 120)	ATAATTTCAGG AATGGGTT (SEQ ID NO: 132)	GGAACCCATTC CTGAAATTAT (SEQ ID NO: 144)	ATAATTTCAGG AATGGGTTCC (SEQ ID NO: 156)
1869	3'-UTR	ACCCATTCCTGA AATTATT (SEQ ID NO: 121)	AATAATTTCAG GAATGGGT (SEQ ID NO: 133)	GAACCCATTCC TGAAATTATT (SEQ ID NO: 145)	AATAATTTCAG GAATGGGTTC (SEQ ID NO: 157)
1870	3'-UTR	CCCATTCCTGAA ATTATTT (SEQ ID NO: 122)	AAATAATTTCA GGAATGGG (SEQ ID NO: 134)	AACCCATTCCT GAAATTATTT (SEQ ID NO: 146)	AAATAATTTCA GGAATGGGTT (SEQ ID NO: 158)
2079	3'-UTR	CTGTGGTTCTAT TATATTA (SEQ ID NO: 123)	TAATATAATAG AACCACAG (SEQ ID NO: 135)	CCCTGTGGTTC TATTATATTA (SEQ ID NO: 147)	TAATATAATAG AACCACAGGG (SEQ ID NO: 159)
2109	3'-UTR	AAATATGAGAGC ATGCTAA (SEQ ID NO: 124)	TTAGCATGCTC TCATATTT (SEQ ID NO: 136)	TTAAATATGAG AGCATGCTAA (SEQ ID NO: 148)	TTAGCATGCTC TCATATTTAA (SEQ ID NO: 160)

В одном из вариантов осуществления ингибитор ингибирующего сигнала может представлять собой, например, антитело или фрагмент антитела, который связывается с ингибирующей молекулой. Например, средство может представлять собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с PD1, PD-L1, PD-L2 или CTLA4 (например, ипилимумаб (также обозначаемый как MDX-010 и MDX-101, и доступный на рынке как Yervoy®; Bristol-Myers Squibb; тремелимумаб (моноклональное антитело IgG2, доступное от Pfizer, ранее известное как тицилимумаб CP-675,206).). В одном из вариантов осуществления средство представляет собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с TIM3. В одном из вариантов осуществления средство представляет собой антитело или фрагмент антитела, который связывается с LAG3. В вариантах

осуществления средство, которое усиливает активность экспрессирующей CAR клетки, например, ингибитор ингибирующей молекулы, вводят в комбинации с аллогенным CAR, например, аллогенным CAR, описываемой в настоящем описании (например, описанной в разделе аллогенный CAR в настоящем описании).

PD-1 представляет собой ингибирующий представитель семейства CD28 рецепторов, которое также включает CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD-1 экспрессируется на активированных B-клетках, T-клетках и миелоидных клетках (Agata et al., 1996, Int. Immunol., 8:765-75). Было продемонстрировано, что два лиганда к PD-1, PD-L1 и PD-L2 подавляют активацию T-клеток при связывании с PD-1 (Freeman et al., 2000 J. Exp. Med., 192:1027-34; Latchman et al., 2001 Nat. Immunol., 2:261-8; Carter et al., 2002 Eur. J. Immunol., 32:634-43). PD-L1 содержится в большом количестве в злокачественных опухолях человека (Dong et al., 2003 J. Mol. Med., 81:281-7; Blank et al., 2005 Cancer Immunol. Immunother., 54:307-314; Konishi et al., 2004 Clin. Cancer Res., 10:5094). Иммунная супрессия можно отменять ингибированием локального взаимодействия PD-1 с PD-L1.

Антитела, фрагменты антител и другие ингибиторы PD-1, PD-L1 и PD-L2 являются доступными в данной области и можно использовать комбинацию с CAR по настоящему изобретению, описываемым в настоящем описании. Например, ниволумаб (также обозначаемый как BMS-936558 или MDX1106; Bristol-Myers Squibb) представляет собой полностью принадлежащее человеку моноклональное антитело IgG4, которое специфически блокирует PD-1. Ниволумаб (клон 5C4) и другие моноклональные антитела человека, которые специфически связываются с PD-1, описаны в US 8008449 и WO2006/121168. Пидилизумаб (CT-011; Cure Tech) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1k, которое связывается с PD-1. Пидилизумаб и другие гуманизированные моноклональные антитела против PD-1 описаны в WO2009/101611. Пембролизумаб (ранее известный как ламбролизумаб, а также обозначаемый как MK03475; Merck) представляет собой гуманизированной моноклональное антитело IgG4, которое связывается с PD-1. Пембролизумаб и другие уманизированные

антитела против PD-1 описаны в US 8354509 и WO2009/114335. MEDI4736 (медиммун) представляет собой моноклональное антитело человека, которое связывается с PDL1 и ингибирует взаимодействие лиганда с PD1. MDPL3280A (Genentech/Roche) представляет собой моноклональное антитело IgG1 с оптимизированной Fc человека, которое связывается с PD-L1. MDPL3280A и другие моноклональные антитела человека к PD-L1 описаны в патенте США №: 7943743 и публикации US № 20120039906. Другие связывающие средства против PD-L1 включают YW243.55.S70 (вариабельные области тяжелых и легких цепей представлены в SEQ ID NO 20 и 21 в WO2010/077634) и MDX-1 105 (также обозначаемый как BMS-936559 и, например, связывающие средства против PD-L1, описанные в WO2007/005874). AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; например, описанный в WO2010/027827 и WO2011/066342), представляет собой слитый с Fc PD-L2 растворимый рецептор, который блокирует взаимодействие PD-1 и B7-H1. Другие антитела против PD-1 включают наряду с другими AMP 514 (Amplimmune), например, антитела против PD-1, описанные в US 8609089, US 2010028330 и/или US 20120114649.

В одном из вариантов осуществления антитело против PD-1 или его фрагмент представляет собой молекулу антитела против PD-1, как описано в US 2015/0210769, озаглавленном "Antibody Molecules to PD-1 and Uses Thereof", полностью включенном посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления молекула антитела против PD-1 содержит по меньшей мере одну, два, три, четыре, пять или шесть CDR (или в совокупности все CDR) из вариабельной области тяжелой и легкой цепи из антитела, выбранного из любого из BAP049-hum01, BAP049-hum02, BAP049-hum03, BAP049-hum04, BAP049-hum05, BAP049-hum06, BAP049-hum07, BAP049-hum08, BAP049-hum09, BAP049-hum10, BAP049-hum11, BAP049-hum12, BAP049-hum13, BAP049-hum14, BAP049-hum15, BAP049-hum16, BAP049-Clone-A, BAP049-Clone-B, BAP049-Clone-C, BAP049-Clone-D или BAP049-Clone-E; или как описано в таблице 1 US 2015/0210769, или кодируемых нуклеотидной последовательностью в таблице 1 или последовательностью по существу идентичной (например, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичной) любой из указанных выше последовательностей; или

близкородственные CDR, например, CDR, которые являются идентичными или которые содержат по меньшей мере одно изменение аминокислоты, но не более двух, трех или четырех изменений (например, замены, делеций или вставок, например, консервативных замен).

В еще одном варианте осуществления молекула антитела против PD-1 содержит по меньшей мере одну, две, три или четыре вариабельные области из антитела, описываемого в настоящем описании, например, антитела, выбранного из любого из BAP049-hum01, BAP049-hum02, BAP049-hum03, BAP049-hum04, BAP049-hum05, BAP049-hum06, BAP049-hum07, BAP049-hum08, BAP049-hum09, BAP049-hum10, BAP049-hum11, BAP049-hum12, BAP049-hum13, BAP049-hum14, BAP049-hum15, BAP049-hum16, BAP049-Clone-A, BAP049-Clone-B, BAP049-Clone-C, BAP049-Clone-D или BAP049-Clone-E; или как описано в таблице 1 US 2015/0210769, или кодируемые нуклеотидной последовательностью в таблице 1; или последовательностью по существу идентичной (например, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичной) любой из указанных выше последовательностей.

TIM3 (Т-клеточный иммуноглобулин 3) также отрицательно регулирует функцию Т-клетки, в частности в секретирующих IFN-γ CD4+ хелперных Т-клетках 1 и CD8+ цитотоксических Т-клетках 1 и играет критическую роль в истощении Т-клеток. Ингибирование взаимодействия TIM3 и его лигандов, например, галектина 9 (Gal9), фосфатидилсерина (PS) и HMGB1 может повышать иммунный ответ. Антитела, фрагменты антител и другие ингибиторы TIM3 и его лигандов являются доступными в данной области, и их можно использовать в комбинации с CD19 CAR, описываемым в настоящем описании. Например, антитела, фрагменты антител, низкомолекулярные соединения или пептидные ингибиторы, которые направленно воздействуют на TIM3, связываются с доменом IgV TIM3, ингибируя взаимодействие с его лигандами. Антитела и пептиды, которые ингибируют TIM3, описаны в WO2013/006490 и US20100247521. Другие антитела против TIM3 включают гуманизированные варианты RMT3-23 (описанные у Ngiow et al.,

2011, Cancer Res., 71:3540-3551) и клон 8B.2C12 (описанный у Monney et al., 2002, Nature, 415:536-541). Биспецифические антитела, которые ингибируют TIM3 и PD-1 описаны в US20130156774.

В одном из вариантов осуществления антитело против TIM3 или его фрагмент представляет собой молекулу антитела против TIM3, как описано в US 2015/0218274, озаглавленном "Antibody Molecules to TIM3 and Uses Thereof", полностью включенном посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления молекула антитела против TIM3 содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR (или в совокупности все CDR) из вариабельной области тяжелой и легкой цепи из антитела, выбранного из любого из ABTIM3, ABTIM3-hum01, ABTIM3-hum02, ABTIM3-hum03, ABTIM3-hum04, ABTIM3-hum05, ABTIM3-hum06, ABTIM3-hum07, ABTIM3-hum08, ABTIM3-hum09, ABTIM3-hum10, ABTIM3-hum11, ABTIM3-hum12, ABTIM3-hum13, ABTIM3-hum14, ABTIM3-hum15, ABTIM3-hum16, ABTIM3-hum17, ABTIM3-hum18, ABTIM3-hum19, ABTIM3-hum20, ABTIM3-hum21, ABTIM3-hum22, ABTIM3-hum23; или как описано в таблицах 1-4 US 2015/0218274; или кодируемые нуклеотидной последовательностью в таблицах 1-4; или последовательностью по существу идентичной (например, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичной) любой из указанных выше последовательностей, или близкородственные CDR, например, CDR, которые являются идентичными, или которые содержат по меньшей мере одно изменение аминокислоты, но не более двух, трех или четырех изменений (например, замен, делеций или вставок, например, консервативных замен).

В еще одном варианте осуществления молекула антитела против TIM3 содержит по меньшей мере одну, две, три или четыре вариабельные области из антитела, описываемого в настоящем описании, например, антитела, выбранного из любого из ABTIM3, ABTIM3-hum01, ABTIM3-hum02, ABTIM3-hum03, ABTIM3-hum04, ABTIM3-hum05, ABTIM3-hum06, ABTIM3-hum07, ABTIM3-hum08, ABTIM3-hum09, ABTIM3-hum10, ABTIM3-hum11, ABTIM3-hum12, ABTIM3-hum13, ABTIM3-hum14, ABTIM3-hum15, ABTIM3-hum16, ABTIM3-hum17, ABTIM3-hum18, ABTIM3-hum19, ABTIM3-hum20, ABTIM3-hum21, ABTIM3-hum22, ABTIM3-

hum23; или как описано в таблицах 1-4 US 2015/0218274; или кодируемых нуклеотидной последовательностью в таблицах 1-4; или последовательностью по существу идентичной (например, по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, 99% или более идентичной) любой из указанных выше последовательностей.

В других вариантах осуществления средство, которое повышает активность экспрессирующей CAR клетки представляет собой ингибитор CEACAM (например, ингибитор CEACAM-1, CEACAM-3 и/или CEACAM-5). В одном из вариантов осуществления ингибитор CEACAM представляет собой молекулу антитела против CEACAM. Иллюстративные антитела против CEACAM-1 описаны в WO 2010/125571, WO 2013/082366 WO 2014/059251 и WO 2014/022332, например, моноклональное антитело 34B1, 26H7 и 5F4 или его рекомбинантная форма, как описано, например, в US 2004/0047858, US 7132255 и WO 99/052552. В других вариантах осуществления антитело против CEACAM связывает CEACAM-5, как описано, например, у Zheng et al., PLoS ONE. 2010 Sep 2;5(9).pii: e12529 (DOI:10:1371/journal.pone.0021146), или перекрестно реагирует с CEACAM-1 и CEACAM-5. как описано, например, в WO 2013/054331 и US 2014/0271618.

Без желания быть связанными теорией, полагают, что раково-эмбриональный антиген, связанный с молекулами клеточной адгезии (CEACAM), такой как CEACAM-1 и CEACAM-5, опосредует по меньшей мере частично ингибирование противоопухолевого иммунного ответа (см. например, Markel et al., J. Immunol., 2002 Mar 15;168(6):2803-10; Markel et al., J. Immunol., 2006 Nov 1;177(9):6062-71; Markel et al., Immunology, 2009 Feb;126(2):186-200; Markel et al., Cancer Immunol Immunother., 2010 Feb;59(2):215-30; Ortenberg et al., Mol. Cancer Ther., 2012 Jun;11(6):1300-10; Stern et al., J. Immunol., 2005 Jun 1;174(11):6692-701; Zheng et al., PLoS ONE, 2010 Sep 2;5(9). pii: e12529). Например, CEACAM-1 описан как гетерофильный лиганд TIM-3 и как играющий роль в опосредованной TIM-3 толерантности и истощении Т-клеток (см. например, WO 2014/022332; Huang, et al., (2014) Nature, doi:10,1038/nature13848). В вариантах осуществления было продемонстрировано, что совместная блокада

CEACAM-1 и TIM-3 усиливает противоопухолевый иммунный ответ на моделях ксенотрансплантата колоректального рака (см. например, WO 2014/022332; Huang, et al. (2014), выше). В других вариантах осуществления совместная блокада CEACAM-1 и PD-1 снижает толерантность Т-клеток, как описано, например, в WO 2014/059251. Таким образом, ингибиторы CEACAM можно использовать с другими иммуномодуляторами, описываемыми в настоящем описании (например, ингибиторы PD-1 и/или TIM-3), для усиления иммунного ответ против злокачественной опухоли, например, меланомы, рака легких (например, NSCLC), рака мочевого пузыря, рака толстого кишечника, рака яичника и других злокачественных опухолей, как описано в настоящем описании.

LAG3 (ген активации лимфоцитов 3 или CD223) представляет собой молекулу клеточной поверхности, экспрессируемую активированными Т-клетками и В-клетками, для которых было продемонстрировано, что они играют роль в истощении CD8+ Т-клеток. Антитела, фрагменты антител и другие ингибиторы LAG3 и его лиганды являются доступными в данной области, и их можно использовать в комбинации с CD19 CAR, описываемым в настоящем описании. Например, BMS-986016 (Bristol-Myers Squib) представляет собой моноклональное антитело, которое направленно воздействует на t LAG3. IMP701 (Immutep) представляет собой антагонистическое антитело против LAG3, и IMP731 (Immutep и GlaxoSmithKline) представляет собой истощающее антитело против LAG3. Другие ингибиторы LAG3 включают IMP321 (Immutep), который представляет собой рекомбинантный слитый белок растворимой части LAG3 и Ig, который связывается с молекулами MHC II класса и активирует антигенпрезентирующие клетки (APC). Другие антитела описаны, например, в WO2010/019570.

В некоторых вариантах осуществления средство, которое повышает активность экспрессирующей CAR клетки, может представлять собой, например, слитый белок, содержащий первый домен и второй домен, где первый домен представляет собой ингибирующую молекулу или ее фрагмент, и второй домен представляет собой полипептид, который является связанным с положительным сигналом, например, полипептид, содержащий

внутриклеточный сигнальный домен, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления полипептид, который связан с положительным сигналом, может содержать костимулирующий домен CD28, CD27, ICOS, например, внутриклеточный сигнальный домен CD28, CD27 и/или ICOS, и/или первичный сигнальный домен, например, CD3-дзета, например, описываемый в настоящем описании. В одном из вариантов осуществления слитый белок экспрессируется той же клеткой, которая экспрессирует CAR. В другом варианте осуществления слитый белок экспрессируется клеткой, например, Т-клеткой, которая не экспрессирует CD123 CAR.

В одном из вариантов осуществления средство, которое повышает активность экспрессирующей CAR клетки, описываемой в настоящем описании, представляет собой miR-17-92.

В одном из вариантов осуществления средство, которое повышает активность CAR, описываемого в настоящем описании, представляет собой цитокин. Цитокины обладают важными функциями, связанными с истощением, дифференцировкой, выживаемость и гомеостазом Т-клеток. Цитокины, которые можно вводить индивидууму, получающему экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, включают: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-18 и IL-21 или их сочетание. В предпочтительных вариантах осуществления вводимый цитокин представляет собой IL-7, IL-15 или IL-21, или их сочетание. Цитокин можно вводить один раз в сутки или более одного раза в сутки, например, дважды в сутки, три раза в сутки или четыре раза в сутки. Цитокин можно вводить в течение больше одних суток, например, цитокин вводят в течение 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 1 недели, 2 недель, 3 недель или 4 недель. Например, цитокин вводят один раз в сутки в течение 7 суток.

В вариантах осуществления цитокин вводят в комбинации с экспрессирующими CAR Т-клетками. Цитокин можно вводить одномоментно или одновременно с экспрессирующими CAR Т-клетками, например, вводить на те же сутки. Цитокин можно получать в той же фармацевтической композиции, как и экспрессирующие CAR Т-клетки, или можно получать в отдельной фармацевтической

композиции. Альтернативно, цитокин можно вводить непосредственно сразу после введения экспрессирующих CAR Т-клеток, например, через 1 сутки, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток или 7 суток после введения экспрессирующих CAR Т-клеток. В вариантах осуществления, где цитокин вводят в режиме дозирования, который включает более одних сутки, на первые сутки режим дозирования цитокина можно проводить на те же сутки, как и введение экспрессирующих CAR Т-клеток, или первые сутки режима дозирования цитокина могут приходиться на 1 сутки, 2 сутки, 3 сутки, 4 сутки, 5 сутки, 6 сутки или 7 сутки после введения экспрессирующих CAR Т-клеток. В одном из вариантов осуществления на первые сутки экспрессирующие CAR Т-клетки вводят индивидууму, а на вторые сутки цитокин вводят один раз сутки в течение следующих 7 суток. В предпочтительном варианте осуществления цитокин, который необходимо вводить в комбинации с экспрессирующими CAR Т-клетками, представляет собой IL-7, IL-15 или IL-21.

В других вариантах осуществления цитокин вводят в период времени после введения экспрессирующих CAR клеток, например, по меньшей мере через 2 недели, 3 недели, 4 недели, 6 недель, 8 недель, 10 недель, 12 недель, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев или 1 год или более после введения экспрессирующих CAR клеток. В одном из вариантов осуществления цитокин вводят после оценки реакции индивидуума на экспрессирующие CAR клетки. Например, индивидууму вводят экспрессирующие CAR клетки в соответствии с дозированием и схемами лечения, описываемыми в настоящем описании. Реакцию индивидуума на терапию клетками, экспрессирующими CAR, оценивают через 2 недели, 3 недели, 4 недели, 6 недель, 8 недель, 10 недель, 12 недель, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев или 1 год или более после введения экспрессирующих CAR клеток, любым из способов, описываемых в настоящем описании, включая ингибирование роста опухоли, уменьшение циркулирующих опухолевых клеток или регрессия опухоли. Индивидуумам, у которых не выявляют достаточную реакцию на терапию клетками, экспрессирующими CAR,

можно вводить цитокин. Введение цитокина индивидууму с недостаточно оптимальной реакцией на терапию клетками, экспрессирующими CAR, улучшает эффективность или противораковую активность экспрессирующей CAR клетки. В предпочтительном варианте осуществления цитокин, вводимый после введения экспрессирующих CAR клеток, представляет собой IL-7.

Комбинация с ингибиторами CD19

Способы и композиции, описываемые в настоящем описании, можно использовать в комбинации с ингибитором CD19. В некоторых вариантах осуществления содержащие CAR клетки, описываемые в настоящем описании, например, содержащие NKR-CAR клетки, и ингибитор CD19 (например, одну или более клеток, которые экспрессируют молекулу CAR, которая связывается с CD19, например, молекулу CAR, которая связывается с CD19, описываемым в настоящем описании) вводят одномоментно или одновременно, или последовательно.

В некоторых вариантах осуществления содержащие CAR клетки и ингибитор CD19 вводят инфузией индивидууму одномоментно или одновременно, например, смешивают в том же объеме инфузии. Например, популяцию содержащих CAR клеток и содержащих CD19CAR клеток смешивают друг с другом. Альтернативно, вводят популяцию клеток коэкспрессирующих CAR, описываемый в настоящем описании, и CD19CAR. В других вариантах осуществления одномоментное введение предусматривает отдельное введение содержащих CAR клеток и ингибитора CD19, например, в течение предопределенного интервала времени (например, в интервале в течение 15, 30 или 45 минут).

В некоторых вариантах осуществления начало содержащих CAR клеток и начало ингибитора CD19 находятся в пределах 1, 2, 3, 4, 6, 12, 18 или 24 часов друг от друга, или в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 60, 80 или 100 суток друг от друга. В некоторых вариантах осуществления конец доставки содержащих CD123 CAR клеток и конец доставки ингибитора CD19 находится в пределах 1, 2, 3, 4, 6, 12, 18 или 24 часов друг от друга или в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 60, 80 или 100 суток друг от друга. В некоторых вариантах

осуществления перекрытие в отношении доставки содержащих CAR клеток (например, инфузии) и конца доставки ингибитора CD19 (например, инфузии) составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 минут. В одном из вариантов осуществления ингибитор CD19 вводят до содержащих CAR клеток. В других вариантах осуществления содержащие CAR клетки вводят до ингибитора CD19.

В некоторых вариантах осуществления содержащие CAR клетки вводят пока ингибитор CD19 (например, одна или более клеток, которые экспрессируют молекулу CD19 CAR) присутствуют (например, клетки в стадии размножение) у индивидуума. В других вариантах осуществления ингибитор CD19 (например, одна или более клеток, которая экспрессирует молекулу CD19 CAR) вводят пока содержащие CAR клетки присутствуют (например, клетки в стадии размножение) у индивидуума.

Ингибитор CD19 включает, но не ограничивается ими, экспрессирующую CD19 CAR клетку, например, CD19 CART-клетку или антитело против CD19 (например, моно- или биспецифическое антитело против CD19) или его фрагмент или конъюгат.

В одном из вариантов осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с CD19 CAR клеткой (например, CART-клеткой) (например, CTL019, например, как описано в WO2012/079000, включенной в настоящее описание посредством ссылки).

В других вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с CD19 CAR клеткой (например, CART-клеткой), которая содержит гуманизированный антигенсвязывающий домен, как описано в WO2014/153270 (например, таблица 3 WO2014/153270), включенной в настоящее описание посредством ссылки.

Ингибитор CD19 (например, первая экспрессирующая CD19 CAR клетка) и вторая экспрессирующая CAR клетка могут экспрессироваться тем же типом клеток или различными типами. Например, в некоторых вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CD19 CAR, представляет собой CD4+ T-клетку, и клетка, экспрессирующая CAR, описываемый в настоящем описании,

представляют собой CD8+ Т-клетку, или клетка, экспрессирующая CD19 CAR представляет собой CD8+ Т-клетку, и клетка, экспрессирующая CAR, описываемый в настоящем описании, представляет собой CD4+ Т-клетку. В других вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CD19 CAR, представляет собой Т-клетку, и клетка, экспрессирующая CAR, описываемый в настоящем описании, представляет собой NK-клетку, или клетка, экспрессирующая CD19 CAR, представляет собой NK-клетку, и клетка, экспрессирующая CAR, описываемый в настоящем описании, представляет собой Т-клетку. В других вариантах осуществления клетка, экспрессирующая CD19 CAR, и клетка, экспрессирующая CAR, описываемый в настоящем описании, обе представляют собой NK-клетки, или обе представляют собой Т-клетки, например, обе представляют собой CD4+ Т-клетки, или обе представляют собой CD8+ Т-клетки. В других вариантах осуществления одна клетка экспрессирует CD19 CAR и CAR, описываемый в настоящем описании, и эта клетка представляет собой, например, NK-клетку или Т-клетку, такую как CD4+ Т-клетка или CD8+ Т-клетка.

В вариантах осуществления индивидуум страдает острым миелолейкозом (AML), например, CD19-положительным AML или CD19-отрицательным AML. В вариантах осуществления индивидуум страдает CD19+ лимфомой, например, CD19+ неходжкинской лимфомой (NHL), CD19+ FL или CD19+ DLBCL. В вариантах осуществления индивидуум страдает рецидивирующей или рефрактерной CD19+ лимфомой. В вариантах осуществления противолимфомную химиотерапию вводят индивидууму до, одновременно с или после введения (например, инфузии) CD19 CART-клеток. В примере противолимфомную химиотерапию вводят индивидууму перед введением CD19 CART-клеток. Например, противолимфомная химиотерапия заканчивается за 1-4 суток (например, 1, 2, 3 или 4 суток) до инфузии CD19 CART-клетки. В вариантах осуществления многократные дозы CD19 CART-клеток вводят, например, как описано в настоящем описании. Например, однократная доза содержит приблизительно 5×10^8 CD19 CART-клеток. В вариантах осуществления противолимфомную химиотерапию проводят у индивидуума до, одновременно или после

введения (например, инфузии) экспрессирующей CAR клетки, описываемой в настоящем описании, например, экспрессирующей не-CD19 CAR клетки. В вариантах осуществления CD19 CART вводят индивидууму до, одновременно или после введения (например, инфузии) экспрессирующей не-CD19 CAR клетки, например, экспрессирующей не-CD19 CAR клетки, описываемой в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят индивидууму в комбинации с экспрессирующей CD19 CAR клеткой, например, CTL019, например, как описано в WO2012/079000, включенной в настоящее описание посредством ссылки, для лечения заболевания, связанного с экспрессией опухолевого антигена, описываемого в настоящем описании, например, злокачественной опухоли, описываемой в настоящем описании. Без связи с теорией полагают, что введение экспрессирующей CD19 CAR клетки в комбинации с экспрессирующей CAR клеткой улучшает эффективность экспрессирующей CAR клетки, описываемой в настоящем описании, в результате направленного воздействия на злокачественные клетки раннего происхождения, например, злокачественные стволовые клетки, модулирующие иммунный ответ, истощающие регуляторные B-клетки и/или улучшающие микроокружение опухоли. Например, экспрессирующая CD19 CAR клетка направленно воздействует на злокачественные клетки, которые экспрессируют ранние линейный маркеры, например, злокачественные стволовые клетки и экспрессирующее CD19 клетки, тогда как экспрессирующая CAR клетка, описываемая в настоящем описании, направленно воздействует на злокачественные клетки, которые экспрессируют поздние линейный маркеры, например, CD123. Такой подход прекондиционирования может улучшать эффективность экспрессирующей CAR клетки, описываемой в настоящем описании. В таких вариантах осуществления экспрессирующую CD19 CAR клетку вводят до, одновременно или после введения (например, инфузии) экспрессирующей CAR клетки, описываемой в настоящем описании.

В вариантах осуществления экспрессирующая CAR клетка описываем в настоящем описании также экспрессирует CAR, направленный на CD19, например, CD19 CAR. В одном из вариантов

осуществления клетку, экспрессирующую CAR, описываемый в настоящем описании, и CD19 CAR вводят индивидууму для лечения злокачественной опухоли, описываемой в настоящем описании, например, AML. В одном из вариантов осуществления конфигурации одной или обеих молекул CAR содержат первичный внутриклеточный сигнальный домен и костимулирующий сигнальный домен. В другом варианте осуществления конфигурации одной или обеих молекул CAR содержат первичный внутриклеточный сигнальный домен и два или более, например, 2, 3, 4 или 5 или более костимулирующих сигнальных доменов. В таких вариантах осуществления молекула CAR, описываемая в настоящем описании, и CD19 CAR могут содержать тот же или отличный первичный внутриклеточный сигнальный домен, те же или отличные костимулирующие сигнальные домены или такое же число или различное число костимулирующих сигнальных доменов. Альтернативно, CAR, описываемый в настоящем описании, и CD19 CAR конфигурируют как расщепленный CAR, в котором одна из молекул CAR содержит антигенсвязывающий домен и костимулирующий домен (например, 4-1BB), тогда как другая молекула CAR содержит антигенсвязывающий домен и первичный внутриклеточный сигнальный домен (например, CD3 дзета).

В вариантах осуществления экспрессирующая CAR клетка, описываемая в настоящем описании, также экспрессирует CAR, направленный на CD19, например, CD19 CAR. В одном из вариантов осуществления клетку, экспрессирующую CAR, описываемый в настоящем описании, и CD19 CAR, вводят индивидууму для лечения злокачественной опухоли, описываемой в настоящем описании, например, AML. В одном из вариантов осуществления конфигурации одной или обеих молекул CAR содержат первичный внутриклеточный сигнальный домен и костимулирующий сигнальный домен. В другом варианте осуществления конфигурации одной или обеих молекул CAR содержат первичный внутриклеточный сигнальный домен и два или более, например, 2, 3, 4 или 5 или более, костимулирующих сигнальных домена. В таких вариантах осуществления молекула CAR, описываемая в настоящем описании, и CD19 CAR могут содержать тот же или отличный первичный внутриклеточный сигнальный домен, те же или отличные костимулирующие сигнальные домены, или такое же

количество или различное количество костимулирующих сигнальных доменов. Альтернативно, CAR, описываемый в настоящем описании, и CD19 CAR конфигурируют как расщепленный CAR, в котором одна молекул CAR содержит антигенсвязывающий домен и костимулирующий домен (например, 4-1BB), тогда как другая молекула CAR содержит антигенсвязывающий домен и первичный внутриклеточный сигнальный домен (например, CD3-дзета).

В одном из вариантов осуществления CAR, описываемый в настоящем описании, и второй CAR, например, CD19 CAR, находятся в одном и том же векторе или находятся в двух различных векторах. В вариантах осуществления, где CAR, описываемый в настоящем описании, и второй CAR, например, CD19 CAR, находятся в одном и том же векторе, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CAR, описываемый в настоящем описании, и второй CAR, например, CD19 CAR, находятся в одной и той же рамке считывания и разделены одним или более участками расщепления пептида, например, P2A.

В других вариантах осуществления экспрессирующую CAR клетку, описываемую в настоящем описании, вводят в комбинации с ингибитором антитела против CD19. В одном из вариантов осуществления антитело против CD19 представляет собой гуманизированный антигенсвязывающий домен, как описано в WO2014/153270 (например, таблице 3 WO2014/153270), включенной в настоящее описание посредством ссылки, или его конъюгат. Другие иллюстративные антитела против CD19 или их фрагменты, или конъюгаты, включают, но не ограничиваются ими, блинатумомаб, SAR3419 (Sanofi), MEDI-551 (MedImmune LLC), комботокс, DT2219ARL (Masonic Cancer Center), MOR-208 (также называемый XmAb-5574; MorphoSys), XmAb-5871 (Xencor), MDX-1342 (Bristol-Myers Squibb), SGN-CD19A (Seattle Genetics) и AFM11 (Affimed Therapeutics). См., например, Hammer, MAbs. 4,5(2012): 571-77. Блинатумомаб представляет собой биспецифическое антитело, состоящее из двух scFvs, где один связывается с CD19, а другой связывается с CD3. Блинатумомаб направляет Т-клетки атаковать злокачественные клетки. См., например, Hammer et al. клиническое испытание с идентификационным № NCT00274742 и NCT01209286. MEDI-551

представляет собой гуманизированное антитело против CD19 с Fc, сконструированным так, чтобы обладать повышенной антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC). См., например, Hammer et al. и клиническое испытание с идентификационным № NCT01957579. Комботокс представляет собой смесь иммунотоксинов, которые связываются с CD19 и CD22. Иммунотоксины состоят из фрагментов scFv антител, слитых с дегликозилированной цепью A рицина. См., например, Hammer et al. и Herrera et al., J. Pediatr. Hematol. Oncol. 31,12(2009):936-41; Schindler et al., Br. J. Haematol., 154,4(2011):471-6. DT2219ARL представляет собой биспецифический иммунотоксин, направленно воздействующий на CD19 и CD22, содержащий два scFvs и усеченный дифтерийный токсин. См., например, Hammer et al. и клиническое испытание с идентификационным № NCT00889408. SGN-CD19A представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), состоящий из гуманизированного моноклонального антитела против-CD19, слитого с синтетическим цитотоксическим уничтожающим клетки средством монометилауристатином F (MMAF). См., например, Hammer et al. и клинические испытания с идентификационным № NCT01786096 и NCT01786135. SAR3419 представляет собой конъюгат антитело против CD19-лекарственное средство (ADC), содержащий гуманизированное моноклональное антитело против CD19, конъюгированное с производным майтансина через расщепляемый линкер. См., например, Younes et al., J. Clin. Oncol., 30,2(2012): 2776-82; Hammer et al., клиническое испытание с идентификационным № NCT00549185 и Blanc et al., Clin. Cancer Res., 2011;17:6448-58. XmAb-5871 представляет собой гуманизированное антитело против CD19 с конструируемым Fc. См., например, Hammer et al. MDX-1342 представляет собой человек антитело против CD19 с конструируемым Fc с повышенной ADCC. См., например, Hammer et al. В вариантах осуществления молекула антитела представляет собой молекулу биспецифического антитела против CD19 и против CD3. Например, AFM11 представляет собой биспецифическое антитело, которое направленно воздействует на CD19 и CD3. См., например, Hammer et al. и клиническое испытание с идентификационным № NCT02106091. В некоторых вариантах

осуществления антитело против CD19, описываемое в настоящем описании, является конъюгированным или иным образом связанным с терапевтическим средством, например, химиотерапевтическим средством, пептидной вакциной (такой как описано у Izumoto et al., 2008 J. Neurosurg., 108:963-971), иммуносупрессирующим средством или средством иммуноабляции, например, циклоспорином, азатиоприном, метотрексатом, микофенолатом, FK506, CAMPATH, антителом против CD3, цитоксином, флударабином, рапамицином, микофеноловой кислотой, стероидом, FR901228 или цитокин.

Комбинация с низкими дозами ингибитора mTOR

В способах, описываемых в настоящем описании, используют низкие иммуностимулирующие дозы ингибиторов mTOR, например, аллостерических ингибиторов mTOR, включая рапалоги, такие как RAD001. Введение низкой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR (например, дозы, которая является недостаточной для полного подавления иммунной системы, но достаточной для улучшения иммунной функции) может оптимизировать характеристики эффекторных клеток иммунной системы, например, Т-клеток или экспрессирующих CAR клеток у индивидуума. Способы измерения ингибирования mTOR, дозы, схемы лечения и подходящие фармацевтические композиции описаны в патентной заявке США № 2015/01240036, таким образом, включенной посредством ссылки.

В одном из вариантов осуществления введение низкой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR can приводить к одному или более из указанного ниже:

i) уменьшения числа PD-1-положительных эффекторных клеток иммунной системы;

ii) увеличения числа PD-1положительных эффекторных клеток иммунной системы;

iii) увеличения отношения PD-1-отрицательных эффекторных клеток иммунной системы/PD-1-положительных эффекторных клеток иммунной системы;

iv) увеличения числа наивных Т-клеток;

v) увеличения экспрессии одного или более из следующих ниже маркеров: $CD62L^{high}$, $CD127^{high}$, $CD27^{+}$ и BCL2, например, в Т-клетках памяти, например, предшественниках Т-клеток памяти;

vi) понижения экспрессии KLRG1, например, в Т-клетках памяти, например, предшественниках Т-клеток памяти; или

vii) увеличения числа предшественников Т-клеток памяти, например, клеток с любой или сочетанием следующих ниже характеристик: повышенный $CD62L^{high}$, повышенный $CD127^{high}$, повышенный $CD27^{+}$, повышенный KLRG1 и повышенный BCL2;

и где любой из указанных выше, например, i), ii), iii), iv), v), vi) или vii) происходит например, по меньшей мере временно, например, по сравнению с не получавшим лечение индивидуумом.

В другом варианте осуществления введение низкой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR приводит к повышенной или пролонгированной пролиферации экспрессирующих CAR клеток, например, в культуре или у индивидуума, например, по сравнению с необрабатываемыми экспрессирующими CAR клетками или не получавшим лечение индивидуумом. В вариантах осуществления повышенная пролиферация связана с увеличением числа экспрессирующих CAR клеток. Способы измерения повышенной или пролонгированной пролиферации описаны в примерах 9 и 10. В другом варианте осуществления введение низкой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR приводит к повышенному цитолизу злокачественных клеток экспрессирующими CAR клетками, например, в культуре или у индивидуума, например, по сравнению с необрабатываемыми экспрессирующими CAR клетками или не получавшим лечение индивидуумом. В вариантах осуществления повышенный цитолиз злокачественных клеток ассоциирован с уменьшением объема опухоли. Способы измерения повышенного цитолиза злокачественных клеток описаны в примере 2.

В одном из вариантов осуществления клетки, экспрессирующие молекулу CAR, например, молекулу CAR, описываемую в настоящем описании, вводят в комбинации с низкой иммуностимулирующей дозой ингибитора mTOR, например, аллостерического ингибитора mTOR, например, RAD001 или каталитического ингибитора mTOR. Например, введение низкой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR можно начинать перед введением экспрессирующей CAR клетки, описываемой в настоящем описании; завершать перед введением экспрессирующей

CAR клетки, описываемой в настоящем описании; начинать одновременно с введением экспрессирующей CAR клетки, описываемой в настоящем описании; с совпадением по времени введения экспрессирующей CAR клетки, описываемой в настоящем описании; или продолжая после введения экспрессирующей CAR клетки, описываемой в настоящем описании.

Альтернативно или дополнительно, введение низкой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR может оптимизировать эффекторные клетки иммунной системы, которые конструируют для экспрессии молекулы CAR, описываемой в настоящем описании. В таких вариантах осуществления введение низкой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR, например, аллостерического ингибитора, например, RAD001 или каталитического ингибитора начинают или продолжают до сбора эффекторных клеток иммунной системы, например, Т-клеток или NK-клеток, которые конструируют для экспрессии молекулы CAR, описываемой в настоящем описании, у индивидуума.

В другом варианте осуществления эффекторные клетки иммунной системы, например, Т-клетки или NK-клетки, которые конструируют для экспрессии молекулы CAR, описываемой в настоящем описании, например, после сбора у индивидуума, или экспрессирующие CAR эффекторные клетки иммунной системы, например, Т-клетки или NK-клетки, например, перед введением индивидууму можно культивировать в присутствии низкой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR.

В одном из вариантов осуществления введение индивидууму низкой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR включает введение, например, один раз в неделю, например, в лекарственной форме с немедленным высвобождением от 0,1 до 20, от 0,5 до 10, от 2,5 до 7,5, от 3 до 6 или приблизительно 5 мг RAD001 или его эквивалентной дозы. В одном из вариантов осуществления введение индивидууму низкой иммуностимулирующей дозы ингибитора mTOR включает введение, например, один раз в неделю, например, лекарственной форме с длительным высвобождением от 0,3 до 60, от 1,5 до 30, от 7,5 до 22,5, от 9 до 18 или приблизительно 15 мг RAD001 или его эквивалентной дозы.

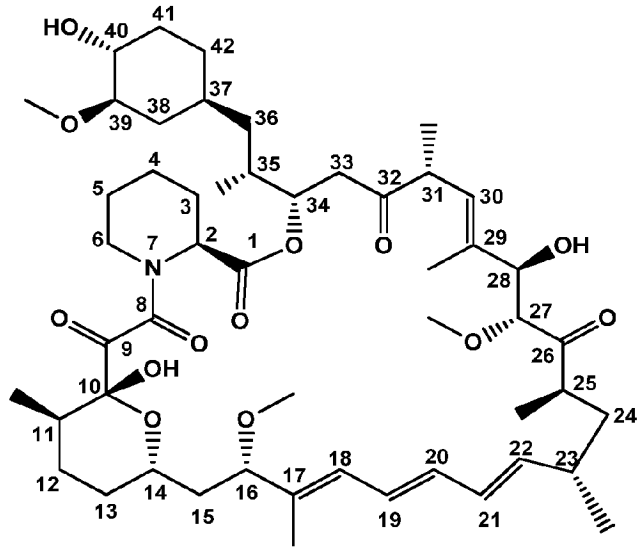
В одном из вариантов осуществления доза ингибитора mTOR связана с или обеспечивает ингибирование mTOR по меньшей мере на 5, но не более чем на 90%, по меньшей мере на 10, но не более чем на 90%, по меньшей мере на 15, но не более чем на 90%, по меньшей мере на 20, но не более чем 90%, по меньшей мере на 30, но не более чем на 90%, по меньшей мере на 40, но не более чем на 90%, по меньшей мере на 50, но не более чем на 90%, по меньшей мере на 60, но не более чем на 90%, по меньшей мере на 70, но не более чем на 90%, по меньшей мере на 5, но не более чем на 80%, по меньшей мере на 10, но не более чем на 80%, по меньшей мере на 15, но не более чем на 80%, по меньшей мере на 20, но не более чем на 80%, по меньшей мере на 30, но не более чем на 80%, по меньшей мере на 40, но не более чем на 80%, по меньшей мере на 50, но не более чем на 80%, по меньшей мере на 60, но не более чем на 80%, по меньшей мере на 5, но не более чем на 70%, по меньшей мере на 10, но не более чем на 70%, по меньшей мере на 15, но не более чем на 70%, по меньшей мере на 20, но не более чем на 70%, по меньшей мере на 30, но не более чем на 70%, по меньшей мере на 40, но не более чем на 70%, по меньшей мере на 50, но не более чем на 70%, по меньшей мере на 5, но не более чем на 60%, по меньшей мере на 10, но не более чем на 60%, по меньшей мере на 15, но не более чем на 60%, по меньшей мере на 20, но не более чем на 60%, по меньшей мере на 30, но не более чем на 60%, по меньшей мере на 40, но не более чем на 60%, по меньшей мере на 5, но не более чем на 50%, по меньшей мере на 10, но не более чем на 50%, по меньшей мере на 15, но не более чем на 50%, по меньшей мере на 20, но не более чем на 50%, по меньшей мере на 30, но не более чем на 50%, по меньшей мере на 40, но не более чем на 50%, по меньшей мере на 5, но не более чем на 40%, по меньшей мере на 10, но не более чем на 40%, по меньшей мере на 15, но не более чем на 40%, по меньшей мере на 20, но не более чем на 40%, по меньшей мере на 30, но не более чем 40%, по меньшей мере на 35, но не более чем на 40%, по меньшей мере на 5, но не более чем на 30%, по меньшей мере на 10, но не более чем на 30%, по меньшей мере на 15, но не

более чем на 30%, по меньшей мере на 20, но не более чем на 30% или по меньшей мере на 25, но не более чем на 30%.

Степень ингибирования mTOR можно выражать в виде степени ингибирования киназы P70S6, или она может соответствовать степени ингибирования киназы P70S6, например, степень ингибирования mTOR можно определять по уровню снижения активности киназы P70S6, например, по снижению фосфорилирования субстрата киназы P70S6. Уровень ингибирования mTOR можно оценивать различными способами, такими как измерение активности киназы P70S6 анализом Boulay, как описано в патентной заявке США № 2015/01240036, таким образом, включенной посредством ссылки, или как описано в патенте США № 7727950, таким образом, включенной посредством ссылки; измерение уровня фосфорилированного S6 вестерн-блоттингом или оценка изменения отношения PD1-отрицательных эффекторных клеток иммунной системы к PD1-положительным эффекторным клеткам иммунной системы.

Как используют в настоящем описании, термин "ингибитор mTOR" относится к соединению или лиганду, или его фармацевтически приемлемой соли, которая ингибирует киназу mTOR в клетке. В одном из вариантов осуществления ингибитор mTOR представляет собой аллостерический ингибитор. Аллостерические ингибиторы mTOR включают нейтральное трициклическое соединение рапамицина (сиролимуса), родственных рапамицину соединений, т.е. соединения со структурой и функциональным сходством с рапамицином, включая, например, производные рапамицин, аналоги рапамицина (также обозначаемые как рапалоги) и другие соединения макролидов, которые ингибируют активность mTOR. В одном из вариантов осуществления ингибитор mTOR представляет собой каталитический ингибитор.

Рапамицин является известным макролидным антибиотиком, продуцируемым *Streptomyces hygroscopicus*, обладающим структурой, представленной в формуле A.



(A)

См., например, McAlpine J.B. et al., J. Antibiotics, (1991) 44: 688; Schreiber S.L. et al., J. Am. Chem. Soc., (1991) 113: 7433; патент США № 3929992. Существуют различные системы нумерации, предложенные для рапамицина. Во избежание путаницы, когда в настоящем описании называют конкретные аналоги рапамицина, названия приведены со ссылкой на рапамицин с использованием системы нумерации формулы A.

Аналоги рапамицина, пригодные в изобретении, представляют собой, например, O-замещенные аналоги, в которых гидроксильная группа на циклогексильном кольце рапамицина является замещенной OR_1, где R_1 представляет собой гидроксиалкил, гидроксиалкоксиалкил, ациламиноалкил или аминоалкил; например, RAD001, также известный как эверолимус, как описано в US 5665772 и WO94/09010, содержание которых включено посредством ссылки. Другие подходящие аналоги рапамицина включают аналоги, замещенные в 26- или 28-положении. Аналог рапамицина может представлять собой эпимер аналога, указанного выше, в частности эпимер аналога, замещенного в положении 40, 28 или 26, и может необязательно являться дополнительно гидрогенизированным, например, как описано в US 6015815, WO95/14023 и WO99/15530, содержания которых включены посредством ссылки, например, ABT578, также известный как зотаролимус, или аналог рапамицина, описанный в US 7091213, WO98/02441 и WO01/14387, содержания

которых включены посредством ссылки, например, AP23573, также известный как ридафоролимус.

Примеры аналогов рапамицина, пригодных для использования в настоящем изобретении из US 5665772, включают, но не ограничиваются ими, 40-O-бензилрапамицин, 40-O-(4'-гидроксиметил)бензилрапамицин, 40-O-[4'-(1,2-дигидроксиэтил)]бензилрапамицин, 40-O-аллилрапамицин, 40-O-[3'-(2,2-диметил-1,3-диоксолан-4(S)-ил)-проп-2'-ен-1'-ил]-рапамицин, (2'E,4'S)-40-O-(4',5'-дигидроксипент-2'-ен-1'-ил)рапамицин, 40-O-(2-гидрокси)этоксикарбонилметилрапамицин, 40-O-(2-гидрокси)этил-рапамицин, 40-O-(3-гидрокси)пропилрапамицин, 40-O-(6-гидрокси)гексилрапамицин, 40-O-[2-(2-гидрокси)этокси]этилрапамицин, 40-O-[(3S)-2,2-диметилдиоксолан-3-ил]метилрапамицин, 40-O-[(2S)-2,3-дигидроксипроп-1-ил]рапамицин, 40-O-(2-ацетокси)этилрапамицин, 40-O-(2-никотиноилокси)этилрапамицин, 40-O-[2-(N-морфолино)ацетокси]этилрапамицин, 40-O-(2-N-имидазолилацетокси)этилрапамицин, 40-O-[2-(N-метил-N'-пиперазинил)ацетокси]этилрапамицин, 39-O-десметил-39,40-O,O-этиленрапамицин, (26R)-26-дигидро-40-O-(2-гидрокси)этилрапамицин, 40-O-(2-аминоэтил)рапамицин, 40-O-(2-ацетаминоэтил)рапамицин, 40-O-(2-никотинамидоэтил)рапамицин, 40-O-(2-(N-метилимидазо-2'-илcarbethoxамидо)этил)рапамицин, 40-O-(2-этоксикарбониламиноэтил)рапамицин, 40-O-(2-толилсульфонамидоэтил)рапамицин и 40-O-[2-(4',5'-дикарбоэтокси-1',2',3'-тиазол-1'-ил)этил]рапамицин.

Другие аналоги рапамицина, пригодные в настоящем изобретении, представляют собой аналоги, где гидроксильную группу на циклогексильном кольце рапамицина и/или гидроксигруппу в положении 28 замещают гидроксиэфирной группой, известны, например, аналоги рапамицина, встречающиеся в US RE44.768, например, темсиролимус.

Другие аналоги рапамицина, пригодные в настоящем изобретении, включают аналоги, где метоксигруппу в положении 16 замещают другим заместителем, предпочтительно (необязательно замещенным гидрокси) алкинилокси, бензилом, *орто*-метоксибензилом

или хлорбензилом, и/или где метоксигруппу в положении 39 удаляют совместно с углеродом 39, таким образом, что циклогексильное кольцо рапамицина становится циклопентильным кольцом, не содержащим в положении 39 метоксигруппу; например, как описано в WO95/16691 и WO96/41807, содержания которых включены посредством ссылки. Аналоги можно дополнительно модифицировать, таким образом, что гидрокси в положении 40 рапамицина является алкилированным, и/или карбонил в положении 32 является восстановленным.

Аналоги рапамицина из WO95/16691 включают, но не ограничиваются ими, 16-диметокси-16-(пент-2-инил)оксирапамицин, 16-диметокси-16-(бут-2-инил)оксирапамицин, 16-диметокси-16-(пропаргил)оксирапамицин, 16-деметокси-16-(4-гидрокси-бут-2-инил)оксирапамицин, 16-диметокси-16-бензилокси-40-О-(2-гидроксиэтил)рапамицин, 16-диметокси-16-бензилоксирапамицин, 16-деметокси-16-*орто*-метоксибензилрапамицин, 16-деметокси-40-О-(2-метоксиэтил)-16-пент-2-инил)оксирапамицин, 39-деметокси-40-дезокси-39-формил-42-норрапамицин, 39-деметокси-40-дезокси-39-гидроксиметил-42-норрапамицин, 39-деметокси-40-дезокси-39-карбокси-42-норрапамицин, 39-деметокси-40-дезокси-39-(4-метил-пиперазин-1-ил)карбонил-42-норрапамицин, 39-деметокси-40-дезокси-39-(морфолин-4-ил)карбонил-42-норрапамицин, 39-деметокси-40-дезокси-39-[N-метил,N-(2-пиридин-2-ил-этил)]карбамоил-42-норрапамицин и 39-деметокси-40-дезокси-39-(п-толуолсульфонилгидразонометил)-42-норрапамицин.

Аналоги рапамицина из WO96/41807 включают, но не ограничиваются ими, 32-деоксо-рапамицин, 16-О-пент-2-инил-32-деоксо-рапамицин, 16-О-пент-2-инил-32-деоксо-40-О-(2-гидрокси-этил)рапамицин, 16-О-пент-2-инил-32-(S)-дигидро-40-О-(2-гидроксиэтил)рапамицин, 32(S)-дигидро-40-О-(2-метокси)этилрапамицин и 32(S)-дигидро-40-О-(2-гидроксиэтил)рапамицин.

Другой подходящий аналог рапамицина представляет собой миролимус, как описано в US2005/0101624, содержание которого включено посредством ссылки.

RAD001, также известный как эверолимус (Afinitor®), имеет химическое название (1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-дигидрокси-12-{(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-(2-гидроксиэтокси)-3-метоксициклогексил]-1-метилэтил}-19,30-диметокси-15,17,21,23,29,35-гексаметил-11,36-диокса-4-аза-трицикло[30.3.1.04.9]гексатриаконта-16,24,26,28-тетраен-2,3,10,14,20-пента-он.

Дополнительные примеры аллостерических ингибиторов mTOR включают сиролимус (рапамицин, AY-22989), 40-[3-гидрокси-2-(гидроксиметил)-2-метилпропаноат]рапамицин (также называемый темсиролимусом или CCI-779) и ридафоролимус (AP-23573/MK-8669). Другие примеры аллостерических ингибиторов mTor включают зотаролимус (ABT578) и умиролимус.

Альтернативно или дополнительно, было выявлено, что каталитические АТФ-конкурентные ингибиторы mTOR направленно воздействует непосредственно киназный домен mTOR и направленно воздействует на mTORC1 и mTORC2. Они также являются более эффективными ингибиторами mTORC1, чем такие аллостерические ингибиторы mTOR как рапамицин, вследствие того, что они модулируют устойчивые к рапамицину mTORC1 выходные сигналы, такие как фосфорилирование 4EBP1-T37/46 и кэп-зависимая трансляция.

Каталитические ингибиторы включают: BEZ235 или 2-метил-2-[4-(3-метил-2-оксо-8-хинолин-3-ил-2,3-дигидро-имидазо[4,5-c]хинолин-1-ил)фенил]пропионитрил или форму монотозилатной соли, синтез BEZ235 описан в WO2006/122806; CCG168 (также известный как AZD-8055, Chresta C.M. et al., Cancer Res., 2010, 70(1), 288-298), химическое название которого представляет собой {5-[2,4-бис-((S)-3-метилморфолин-4-ил)пиридо[2,3d]пиримидин-7-ил]-2-метоксифенил}метанол; 3-[2,4-бис[(3S)-3-метилморфолин-4-ил]пиридо[2,3-d]пиримидин-7-ил]-N-метилбензамид (WO09104019); 3-(2-аминобензо[d]оксазол-5-ил)-1-изопропил-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-4-амин (WO10051043 и WO2013023184); N-(3-(N-(3-((3,5-диметоксифенил)амино)хиноксалин-2-ил)сульфамоил)фенил)-3-

метокси-4-метилбензамид (WO07044729 и WO12006552); PKI-587 (Venkatesan A.M., J. Med.Chem., 2010, 53, 2636-2645), химическое название которого представляет собой 1-[4-[4-(диметиламино)пиперидин-1-карбонил]фенил]-3-[4-(4,6-диморфолино-1,3,5-триазин-2-ил)фенил]мочевина; GSK-2126458 (ACS Med. Chem. Lett., 2010, 1, 39-43), химическое название которого представляет собой 2,4-дифтор-N-{2-метокси-5-[4-(4-пиридазинил)-6-хинолинил]-3-пиридинил}бензолсульфонамид; 5-(9-изопропил-8-метил-2-морфолино-9H-пурин-6-ил)пиримидин-2-амин (WO10114484); (E)-N-(8-(6-амино-5-(трифторметил)пиридин-3-ил)-1-(6-(2-цианопропан-2-ил)пиридин-3-ил)-3-метил-1H-имидазо[4,5-c]хинолин-2(3H)илиден)цианамид (WO12007926).

Дополнительные примеры каталитических ингибиторов включают mTOR 8-(6-метоксипиридин-3-ил)-3-метил-1-(4-пиперазин-1-ил-3-трифторметилфенил)-1,3-дигидроимидазо[4,5-c]хинолин-2-он (WO2006/122806) и Ku-0063794 (Garcia-Martinez J.M. et al., Biochem J., 2009, 421(1), 29-42. Ku-0063794 представляет собой специфический ингибитор мишени млекопитающих рапамицина (mTOR). WYE-354 представляет собой другой пример каталитического ингибитора mTor (Yu K. et al., (2009). Biochemical, Cellular, and In vivo Activity of Novel ATP-Competitive and Selective Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin. Cancer Res. 69(15): 6232-6240).

Ингибиторы mTOR, пригодные по настоящему изобретению, также включают пролекарства, производные, фармацевтически приемлемые соли или их аналоги любого из указанных выше соединений.

Ингибиторы mTOR, такие как RAD001, можно формулировать для доставки на основе хорошо установленных способы в данной области, на основе конкретных доз, описываемых в настоящем описании. В частности, в патенте США 6004973 (включенном в настоящее описание посредством ссылки) приводят примеры составов, которые можно использовать с ингибиторами mTOR, описываемыми в настоящем описании.

Фармацевтические композиции и виды лечения

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать экспрессирующую CAR клетку, например, совокупность

экспрессирующих CAR клеток, как описано в настоящем описании, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как EDTA или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. В одном из аспектов композиции по настоящему изобретению формулируют для внутривенного введения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить способом, подходящим для заболевания, подлежащее лечению (или профилактике). Количество и частоту введения определяют такие факторы, как состояние пациента и тип и тяжесть заболевания пациента, хотя подходящие дозы можно определять клиническими испытаниями.

В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция по существу не содержит, например, не наблюдают детектируемых уровней загрязняющего вещества, например, выбранного из группы, состоящей из эндотоксина, микоплазмы, компонента репликации лентивируса (RCL), p24, нуклеиновой кислоты VSV-G, gag ВИЧ, остаточных гранул, покрытых антителом против CD3/антителом против CD28, антител мыши, объединенной сыворотки человека, бычьего сывороточного альбумина, телячьей сыворотки, компонентов среды для культивирования, компонентов вектора, упаковывающего клетку, или плазмиды, бактерии и гриба. В одном из вариантов осуществления бактерия представляет собой по меньшей мере бактерию, выбранную из группы, состоящей из *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia* и *Streptococcus pyogenes* группы A.

Когда указывают "иммунологически эффективное количество", "противоопухолевое эффективное количество", "ингибирующее опухоль эффективное количество" или "терапевтическое

количество", точное количество композиций по настоящему изобретению, которое необходимо вводить, может определять врач, принимая во внимание индивидуальные различия возраста, массы, размера опухоли, степени инфекции или метастазирования, и состояния пациента (индивидуума). В общем случае, может быть указано, что фармацевтическую композицию, содержащую Т-клетки, описываемые в настоящем описании, можно вводить в дозе от 10^4 до 10^9 клеток/кг масса тела, предпочтительно от 10^5 до 10^6 клеток/кг масса тела, включая все целочисленные значения в этих диапазонах. Т-клеточные композиции также можно вводить много раз в этих дозах. Клетки можно вводить способами инфузии, которые являются общеизвестными в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med., 319:1676, 1988). Специалист в данной области медицины может легко определять оптимальную дозу и схему лечения для конкретного пациента путем мониторинга у пациента признаков заболевания и регулируя, таким образом, лечение.

В некоторых вариантах осуществления доза CAR-клеток (например, NKR-CAR клеток, например, KIR-CAR клеток) составляет приблизительно 1×10^6, $1,1\times10^6$, 2×10^6, $3,6\times10^6$, 5×10^6, 1×10^7, $1,8\times10^7$, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8 или 5×10^8 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза CAR-клеток (например, NKR-CAR клеток, например, KIR-CAR клеток) составляет по меньшей мере приблизительно 1×10^6, $1,1\times10^6$, 2×10^6, $3,6\times10^6$, 5×10^6, 1×10^7, $1,8\times10^7$, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8 или 5×10^8 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза CAR-клеток (например, NKR-CAR клеток, например, KIR-CAR клеток) составляет приблизительно до 1×10^6, $1,1\times10^6$, 2×10^6, $3,6\times10^6$, 5×10^6, 1×10^7, $1,8\times10^7$, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8 или 5×10^8 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза CAR-клеток (например, NKR-CAR клеток, например, KIR-CAR клеток) составляет приблизительно $1,1\times10^6$-$1,8\times10^7$ клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза CAR-клеток (например, NKR-CAR клеток, например, KIR-CAR клеток) составляет приблизительно 1×10^7, 2×10^7,

5×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 2×10^9 или 5×10^9 клеток. В некоторых вариантах осуществления доза CAR-клеток (например, NKR-CAR клеток, например, KIR-CAR клеток) составляет по меньшей мере приблизительно 1×10^7, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 2×10^9 или 5×10^9 клеток. В некоторых вариантах осуществления доза CAR-клеток (например, NKR-CAR клеток, например, KIR-CAR клеток) составляет приблизительно до 1×10^7, 2×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 2×10^9 или 5×10^9 клеток.

Клетки можно вводить с использованием техник инфузии, которые являются общеизвестными в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med., 319:1676, 1988).

В определенных аспектах желательным может являться введение активированных экспрессирующих CAR клеток индивидууму, а затем повторный отбор крови (или проведение афереза), активирование клетки после этого по настоящему изобретению и реинфузия пациенту таких активированных и размноженных клеток. Этот процесс можно проводить много раз в течение нескольких недель. В определенных вариантах осуществления Т-клетки можно активировать из отобранных образцов крови от 10cc до 400cc. В определенных вариантах осуществления Т-клетки активируют из отобранных образцов крови 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc или 100cc. Без ограничения какой-либо теорией, использование такого протокола многократного забора крови/многократной реинфузии может служить для исключения определенных популяций Т-клеток.

Введение индивидууму композиций можно проводить любым подходящим способом, включая посредством ингаляции аэрозолей, инъекции, проглатывания, трансфузии, имплантации или трансплантаций. Композиции, описываемые в настоящем описании, можно вводить пациенту подкожно, интрадермально, внутрь опухоли, внутрь узла, интрамедуллярно, внутримышечно, посредством внутривенной (в/в) инъекции или интраперитонеально. В одном из вариантов осуществления композиции экспрессирующей CAR клетки (например, Т-клетки или NK-клетки) по настоящему изобретению вводят пациенту посредством интрадермальной или подкожной

инъекции. В другом варианте осуществления композиции экспрессирующей CAR клетки (например, Т-клетки или NK-клетки) по настоящему изобретению предпочтительно вводят посредством в/в инъекции. Композиции экспрессирующей CAR клетки (например, Т-клетки или NK-клетки) можно инъецировать непосредственно в опухоль, лимфоузел или участок инфекции.

В определенных вариантах настоящего изобретения клетки, активируемые и размножаемые способами, описываемыми в настоящем описании, или другими известными в данной области способами, где Т-клетки размножают до терапевтических уровней, вводят пациенту в сочетании с (например, до, одномоментно или после) любым числом подходящих способов лечения, включая, но, не ограничиваясь ими, лечение средствами, такими как противовирусная терапия, лечение цидофовиром и интерлейкином 2, цитарабином (также известным как ARA-C) или натализумабом для пациентов с MS или лечение эфализумабом для пациентов с псориазом или другие виды лечения для пациентов с PML. В дополнительных вариантах осуществления Т-клетки по изобретению можно использовать в комбинации с химиотерапией, лучевой терапией, иммуносупрессирующими средствами, такими как циклоспорин, азатиоприн, метотрексат, микофенолат и FK506, антителами или другими иммунодеструктивными средствами, такими как CAMPATH, антитела против CD3 или другие виды терапии антителами, цитоксином, флударибином, циклоспорином, FK506, рапамицином, микофеноловой кислотой, стероидами, FR901228, цитокинами и облучением. Эти лекарственные средства ингибируют кальций-зависимую фосфатазк кальциневрин (циклоспорин и FK506) или ингибируют киназк p70S6, которая является важной для индуцированной фактором роста передачи сигналов (рапамицин) (Liu et al., Cell, 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun., 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun., 5:763-773, 1993). В дополнительном варианте осуществления клеточные композиции по настоящему изобретению вводят пациенту в сочетании с (например, до, одномоментно или после) трансплантацией костного мозга, Т-клеточной абляционной терапией с использованием химиотерапевтических средств, таких как,

флударабин, дистанционной лучевой терапией (XRT), циклофосфамидом или антителами, такими как OKT3 или CAMPATH. В другом варианте осуществления клеточные композиции по настоящему изобретению вводят после В-клеточной абляционной терапии, такой как средствами, которые взаимодействуют с CD20, например, ритуксаном. Например, в одном из вариантов осуществления индивидуумы могут получать стандартное лечение высокими дозами химиотерапии с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В определенных вариантах осуществления после трансплантации индивидуумы получают инфузию размноженных иммунных клеток по настоящему изобретению. В дополнительном варианте осуществления размноженные клетки вводят до хирургической операции или после нее.

В конкретном иллюстративном аспекте индивидуумы могут проходить лейкаферез, где лейкоциты собирают, обогащают или истощают *ex vivo* для отбора и/или выделения представляющих интерес клеток, например, эффекторных клеток иммунной системы (например, Т-клеток или NK-клеток). Такие изоляты эффекторных клеток иммунной системы (например, Т-клеток или NK-клеток) можно размножать известными в данной области способами и обрабатывать, таким образом, что одну или более конструкций CAR по изобретению можно вводить, таким образом, создавая экспрессирующую CAR клетку (например, CAR Т-клетку или экспрессирующую CAR NK-клетку) по изобретению. Затем нуждающиеся в этом индивидуумы могут получать стандартное лечение химиотерапии в высоких дозах с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В определенных аспектах после или совместно с трансплантацией индивидуумы получают инфузию размноженной экспрессирующей CAR клетки (например, CAR Т-клетки или экспрессирующей CAR NK-клетки) по настоящему изобретению. В дополнительном аспекте размноженные клетки вводят до хирургической операции или после нее.

Дозирование указанных выше видов лечения, которое необходимо проводить пациенту, изменяется в зависимости от точной природы состояния, подлежащего лечению и реципиента лечения. Масштабирование доз для введения человеку можно

проводить в соответствии с принятыми в данной области практиками. Стратегии дозирования и схемы введения CAR Т-клеток были описаны (Ertl et al., 2011, Cancer Res, 71:3175-81; Junghans, 2010, Journal of Translational Medicine, 8:55).

В одном из вариантов осуществления CAR вводят в эффекторные клетки иммунной системы (например, Т-клетки или NK-клетки), например, с использованием транскрипции *in vitro*, и индивидуум (например, человек) получает начальное введение экспрессирующей CAR клетки (например, CAR Т-клетка или экспрессирующей CAR NK-клетки) по изобретению и одно или более последующих введений экспрессирующей CAR клетки (например, CAR Т-клетки или экспрессирующей CAR NK-клетки) по изобретению, где одно или более последующих введений вводят менее чем 15 суток, например, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или через 2 суток после предыдущего введения. В одном из вариантов осуществления более одно введение экспрессирующей CAR клетки (например, CAR Т-клетки или экспрессирующей CAR NK-клетки) по изобретению вводят индивидууму (например, человеку) в неделю, например, 2, 3 или 4 введения экспрессирующей CAR клетки (например, CAR Т-клетки или экспрессирующей CAR NK-клетки) по изобретению вводят в неделю. В одном из вариантов осуществления индивидуум (например, являющийся человеком индивидуум) получает более одного введения экспрессирующей CAR клетки (например, CAR Т-клетки или экспрессирующей CAR NK-клетки) в неделю (например, 2, 3 или 4 введения в неделю) (также обозначаемых в настоящем описании как цикл) с последующей неделей без введений экспрессирующей CAR клетки (например, CAR Т-клетки или экспрессирующей CAR NK-клетки), а затем проводят одно или более дополнительных введений экспрессирующей CAR клетки (например, CAR Т-клетки или экспрессирующей CAR NK-клетки) (например, более одного введения экспрессирующей CAR клетки (например, CAR Т-клетки или экспрессирующей CAR NK-клетки) в неделю) индивидууму. В другом варианте осуществления индивидуум (например, являющейся человеком индивидуум) получает более одного цикла экспрессирующей CAR клетки (например, CAR Т-клетки или экспрессирующей CAR NK-клетки), и период времени между циклами

составляет менее 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 суток. В одном из вариантов осуществления экспрессирующую CAR клетку (например, CAR Т-клетку или экспрессирующую CAR NK-клетку) вводят через сутки в 3 введениях в неделю. В одном из вариантов осуществления экспрессирующую CAR клетку (например, CAR Т-клетку или экспрессирующую CAR NK-клетку) по изобретению вводят в течение по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или более недель.

В одном из аспектов экспрессирующую CD123 CAR клетку (например, CAR Т-клетку или экспрессирующую CAR NK-клетку) получают с использованием лентивирусных векторов, таких как лентивирус. Экспрессирующая CAR клетка (например, CAR Т-клетка или экспрессирующая CAR NK-клетка), получаемая таким образом, характеризуется стабильной экспрессией CAR.

В одном из аспектов экспрессирующие CAR клетки, например, CART или экспрессирующие CAR NK-клетки, получают с использованием вирусного вектора, такого как гамма-ретровирусный вектор, например, гамма-ретровирусный вектор, описываемый в настоящем описании. Экспрессирующие CAR клетки, например, CART или экспрессирующие CAR NK-клетки, получаемые с использованием этих векторов, могут характеризоваться стабильной экспрессией CAR.

В одном из аспектов экспрессирующая CAR клетка (например, CAR Т-клетка или экспрессирующая CAR NK-клетка) транзиторно экспрессирует CAR-векторы в течение периода времени 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 через 15 суток после трансдукция. Транзиторную экспрессию CAR можно получать посредством доставки вектора с РНК CAR. В одном из аспектов РНК CAR трансдуцируют в клетку (например, Т-клетку или NK-клетку) электропорацией.

Возможной проблемой, которая может возникать у пациентов, которым проводят лечение с использованием транзиторно экспрессирующей CAR клетки (например, CAR Т-клетки или экспрессирующей CAR NK-клетки) (в частности с scFv мышей, несущих CAR), является анафилаксия после нескольких циклов лечения.

Без связи с этой теорией, полагают, что такая анафилактическая реакция может быть вызвана развивающимся гуморальным ответом против CAR у пациента, т.е. антителами против CAR с изотипом против IgE. Полагают, что продуцирующие антитела клетки пациента претерпевают переключение класса с изотипа IgG (который не вызывает анафилаксию) на изотип IgE, затем присутствует перерыв продолжительностью от десяти до четырнадцати сутки в воздействии антигеном.

Если пациент подвергается высокому риску развития ответа антител про CAR во время курса терапии транзиторно экспрессирующимися CAR (такими, как CAR, образуемые в результате трансдукций РНК), перерывы в проведении инфузии экспрессирующих CAR клеток (например, CAR Т-клеток или экспрессирующих CAR NK-клеток) не должны длиться более десяти-четырнадцати суток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПРИМЕРЫ

Изобретение далее подробно описано со ссылкой на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры предоставлены только с целью иллюстрации и не предназначены ограничивать, если не указано иное. Таким образом, изобретение не следует каким-либо образом интерпретировать как ограниченное следующими ниже примерами, в наоборот следует интерпретировать как включающее любой и все варианты, которые станут очевидны из указаний, предоставляемых в настоящем описании.

Без дополнительного описания полагают, что специалист в данной области с использованием предшествующего описания и следующих ниже иллюстративных примеров может получать и использовать соединения по настоящему изобретению и применять на практике описываемые в заявке способы. Следующие ниже демонстрационные примеры, таким образом, конкретно указывают на предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, и их не следует интерпретировать как ограничивающие каким-либо образом оставшуюся часть изобретения.

Пример 1: Химерные NK рецепторы

Результаты, представленные в настоящем описании, демонстрируют альтернативный подход конструкции CAR для Т-клеток, которые можно более тонко регулировать по сравнению с

существующими структурами CAR. Планировали эксперименты для разработки новой регулируемой системы CAR, которая содержит по меньшей мере два или три химерных слитых белка. В основе первичных активирующего сигнала и ингибирующих сигналов Т-клеток лежат природные активирующие и ингибирующие рецепторы NK-клеток, известные как иммуноглобулиноподобные рецепторы киллерных клеток (KIR).

KIR существуют в активирующих и ингибирующих формах, которые зависят от внутриклеточного домена рецептора. Активирующие KIR доставляют свои сигналы посредством взаимодействия с иммунорецепторным тирозиновым активирующим мотивом (ITAM), содержащим мембранный белок DAP12, который собирается из остатков в трансмембранных доменах этих белков. Ингибирующие KIR несут цитоплазматический домен, который содержит иммунорецепторные тирозиновые ингибирующие мотивы (ITIM), которые отменяют активирующий сигнал, сто приводит к ингибированию NK цитолитической активности и активности продукции цитокинов. Аналогично TCR, KIR принадлежат к иммуноглобулиновому семейству белковых рецепторов и могут связываться с инвариантными лигандами MHC и MHC-подобными лигандами. Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, полагают, что такие взаимодействия используются для различия в природе нормальных клеток (как правило, экспрессирующих MHC I класса в высокой плотности) от злокачественных или инфицированных вирусом клеток (часто с низким количеством MHC I класса или отсутствием MHC I класса).

Были сконструированы KIR-подобные химерные антигенные рецепторы (KIR-CAR), ы которых сливают scfv к представляющему антигену-мишени с активирующим и ингибирующим KIR, как продемонстрировано на фигуре 1. Условную активацию Т-клеток получают в результате взаимодействия активирующего KIR-CAR (actKIR-CAR) или стандартного TCR-дзета CAR, несущего scfv к антигену на представляющей интерес злокачественной клетке. Ингибирующий CAR (inhCAR), несущий scFv, направленный против антигена, который присутствует на нормальной, но не злокачественной ткани, обеспечивает ослабление первичного

сигнала активирующего CAR, когда Т-клетка встречается с нормальными клетками. Примеры антигенов, которые случат в качестве пригодных мишеней для ингибирующих CAR, включают рецепторы эфринов (Pasquale, 2010, Nat. Rev. Cancer, 10(3):165-80) и клаудины (Singh et al., 2010, J. Oncol., 2010:541957), которые экспрессируются эпителиальными клетками из нормальных тканей, но часто селективно утрачиваются злокачественными опухолями (например, EPHA7).

Пример 2: Конструкция и активность активирующего KIR-CAR

Планировали эксперименты для разработки активирующих KIR-CAR на основе слияния scFv против CD19 или против мезотелин (SS-1), которые ранее вводили в CAR на основе цитоплазматического домена TCR-дзета, который в настоящее время проходит клинические испытания. В качестве исходного основного рецептора для actKIR-CAR выбирали активирующий рецептор KIR KIR2DS2 человека. Для доставки активирующих сигналов для actKIR-CAR необходимой является коэкспрессия DAP12, который не экспрессируется обычно в Т-клетках. Таким образом, конструировали лентивирусный вектор, который экспрессирует actKIR-CAR с DAP12 человека с использованием "бицистронной" генной кассеты на основе пептида, вызывающего пропуски рибосомой 2A. Карта лентивирусного вектора проиллюстрирована на фигуре 2. Первоначальные исследования демонстрировали, что actKIR-CAR эффективно экспрессировались в первичных Т-клетках человека, и actKIR-CAR SS1 связывался с мезотелином (фигура 3). Аналогично ранее разработанному и опубликованному CAR scFv SS1 CD3 дзета (SS1-ζ) (Carpenito et al., 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106(9):3360-5), для Т-клеток, экспрессирующих actKIR-CAR SS1, демонстрировали цитотоксическую активность по отношению к клеткам-мишеням K562, конструируемым так, чтобы экспрессировать лиганд мезотелин (KT-meso), как продемонстрировано на фигуре 4. Ни для одного из рецепторов не обнаруживают цитолиз K562 дикого типа, у которой отсутствует мезотелин-мишень.

Вследствие того, что цитотоксическая активность KIR-CAR SS1 по отношению к мезотелин-положительным клеткам-мишеням являлась

ниже, чем у стандартного CAR на основе TCR-дзета, нацеленного на тот же антиген, при сравнимой экспрессии CAR на поверхности, полагают, что CAR к мезотелину могут содержать внеклеточный шарнир (на основе KIR2DS2 дикого типа), который не является оптимальным для сегрегации от CD45 вследствие его длины. Полагают, что кинетическая сегрегация активирующих рецепторов на основе ITAM от CD45 является ключевыми механизмами активации TCR и зависит масштаба расстояний между мембранами Т-клетки и клетки-мишени ~14-15 нм (Choudhuri et al., 2005, Nature, 436(7050):578-82). Как оценивают, масштаб расстояний KIR-CAR SS1 на основе KIR2DS2 составляет более 20 нм в зависимости от конкретной кристаллической структуры мезотелина, демонстрирующей, что эпитоп SS1, вероятно, находится на расстоянии ~10 нм от мембраны клетки-мишени (Ma et al., 2012, J. Biol. Chem., 287(40):33123-31), и CAR, который по оценкам составляет ~10 нм, предположительно каждый Ig-подобный домен составляет ~3,5 нм в шарнире KIR2DS2 в дополнение к scFv. Таким образом, конструировали активирующий KIR-CAR, в котором удаляли шарнир KIR2DS2 (CAR KIRS2), как схематично представлено на фигуре 5. Показано, что KIRS2 CAR на основе scFv SS1 обладал повышенной цитолитической активностью по отношению к экспрессирующим мезотелин клетками-мишенями по сравнению с CAR, образованному слиянием scFv SS1 с полноразмерным KIR2DS2 дикого типа (фигура 6). Для такого оптимизированного CAR KIRS2 также демонстрировали повышенную активность по сравнению с TCR дзета CAR на основе scFv SS1, содержащим внеклеточный шарнир CD8 альфа.

Пример 3: Конструкция и активность InhKIR-CAR

Конструировали ингибирующий KIR-CAR на основе слияния SS1 scFv против мезотелина с ингибирующей основой рецептора KIR2DL3. Первоначальные исследования демонстрировали, что inhKIR-CAR эффективно экспрессируются в первичных Т-клетках человека. CD19 actKIR-CAR, SS1 actKIR-CAR и SS1 inhKIR-CAR отдельно или в комбинации вводили в Т-клетки Jurkat, несущие репортер dsGFP под контролем NFAT-зависимого промотора для мониторинга активации

этого критического пути передачи сигнала Т-клетки. Несмотря на то, что Т-клетки Jurkat, экспрессирующие CD19 actKIR-CAR или SS1 actKIR-CAR отдельно эффективно активировались K562, экспрессирующими CD19 и мезотелин (KT-meso/CD19), для Т-клеток Jurkat, коэкспрессирующих CD19 actKIR-CAR и SS1 inhKIR-CAR, демонстрировали заметно сниженную активацию теми же 9 клетками-мишенями KT-meso/CD1 (фигура 7A); однако анализ экспрессии на поверхности CD19 и связывания мезотелина scFv с использованием специфических к идиотипу реагентов неожиданно демонстрировал, что экспрессия scFv с различными специфичностями к мишени являлась взаимоисключающей (фигура 7B).

Пример 4: Чувствительность конструкций активирующих KIR-CAR к природным ингибирующим рецепторным системам

Вследствие того, что коэкспрессия CAR с двумя scFv является ограниченной, разрабатывали стратегию для оценки чувствительности активирующих CAR на основе KIR к ингибирующим сигналам, получаемым из рецептора PD-1. PD-1 является природным рецептором в Т-клетках, который используется ITIM в цитоплазматическом домене, аналогично ингибирующим KIR для рекрутирования фосфатазы, которая отрицательно регулирует передачу сигналов TCR. Схематическое представление приведено на фигуре 19. Результаты, представленные в настоящем описании, демонстрируют, что PD-1 дикого типа может экспрессироваться на повышенном уровне с активирующим CAR на основе KIR и CAR на основе TCR-дзета, нацеленным на мезотелин (фигуры 8A и 8C). Результаты также демонстрируют, что такая комбинация приводила к зависящему от лиганда 1 PD-1 (PDL-1) ингибированию цитотоксичности специфического к мезотелину активирующего KIR-CAR (фигура 9). В отношении нормальной экспрессии PD-1 Т-клетками (т.е. Т-клетки без трансфекции PD-1) для KIR-CAR демонстрируют менее выраженное ингибирование при встрече с экспрессирующими на повышенном уровне PD-L1 клетками-мишенями по сравнению с CAR на основе TCR-дзета. Без желания быть связанным какой-либо конкретной теорией, полагают, что это может являться преимуществом KIR-CAR при встрече с опухолями, которые в

большинстве случаев экспрессируют лиганды ингибирующих рецепторов.

Пример 5: Зависимая от костимуляции активация KIR-CAR

Планировали эксперименты для оценки эффектов химерных костимулирующих рецепторов (CCR) в системе KIR-CAR по сравнению с CCR, описанными для стандартных CAR Kloss et al. (Kloss et al., 2013, Nat. Biotechnol., 31(1):71-5). Также планировали эксперименты для оценки необходимых условий зависимой от костимуляции активации KIR введением рецептора эндогенного CD28 в Т-клетку с использованием антитело-агониста, клон 9.3. Как продемонстрировано на фигуре 14, CAR KIRS2 характеризовались устойчивой пролиферацией в ответ на мезотелин-положительные мишени при отсутствии костимуляции CD28. Эта пролиферация превосходит пролиферацию, наблюдаемую с CAR TCR-дзета, где было показано, что костимуляция является критической для пролиферации. Эти данные позволяют предположить, что для антигенспецифической пролиферации для CAR на основе KIR могут не существовать такие же необходимые условия костимуляции как для CAR TCR-дзета (Milone et al., 2009, Mol. Ther., 17(8):1453-64; Carpenito et al., 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106(9):3360-5), и такая независимость от костимуляции может являться существенным преимуществом CAR на основе KIR для существующих CAR на основе TCR-дзета. Также планировали эксперименты для оценки CAR на основе KIR у гуманизированных мышей для тестирования CAR на основе KIR против CAR с костимулирующими доменами и без них в доклинических исследованиях *in vivo* (данные и эксперименты в примере 5 также предоставлены в примере 6).

Пример 6: Химерные антигенные рецепторы (CAR) на основе иммуноглобулиноподобного рецептора киллерных клеток (KIR) индуцирует устойчивую цитотоксическую активность в солидных опухолях

Химерные антигенные рецепторы (CAR), несущие антигенсвязывающий домен, связанный в *цис*-положении с цитоплазматическими доменами CD3-ζ, и костимулирующий рецепторы обеспечивают эффективный способ конструкции цитотоксичности Т-

клеток по отношению к опухолям (Grupp et al., The New England journal of medicine, 368(16):1509-18, 2013; Brentjens et al., Science translational medicine, 5(177):177ra38, 2013; Porter et al., The New England journal of medicine, 365(8):725-33, 2011). В настоящем описании описан альтернативный химерный рецептор, в котором одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), нацеленный на мезотелин (SS1), сливали с трансмембранным и цитоплазматическим доменом KIR2DS2, стимулирующим иммуноглобулиноподобным рецептором киллерных клеток (KIR), обычно экспрессируемым естественными киллерными (NK) клетками. Такой SS1-KIRS2 CAR на основе KIR индуцирует устойчивую антигенспецифическую цитотоксическую активность и эффекторную функция *in vitro*, такую как секреция цитокинов и пролиферация, при введении в Т-клетки человека в комбинации с адапторной молекулой DAP12. Т-клетки, модифицированные, так чтобы экспрессировать KIR-CAR и DAP12, обладают существенно повышенной противоопухолевой активностью на модели ксенотрансплантатов резистентной опухоли по сравнению с Т-клетки, трансдуцированными стандартным CAR на основе CD3ζ, что подтверждает то, что CAR на основе KIR может ослаблять ингибирующие сигналы в опухолях, которые ограничивают второе и третье поколение CAR на основе CD3ζ. Данные, предоставленные в настоящем описании, обосновывают предстоящую клиническую оценку CAR на основе KIR на злокачественных опухолях, включая солидные опухоли.

CAR "первого поколения" конструировали введением цитоплазматического домена, содержащего иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM), в одиночный химерный рецептор, в котором используют одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) из антитела для специфического к антигену нацеливания (Sadelain et al., Cancer discovery, 3(4):388-98, 2013). В дальнейшем последовательно вводили ряд различных дополнительных сигнальных доменов из костимулярующих рецепторов, таких как CD28, ICOS, 4-1BB и OX-40, в эти рецепторы для повышения пролиферации, выживаемости и функции Т-клеток (Finney H.M. et al., J. Immunol., 1998;161:2791-2797; Maher J. et al.,

Nat. Biotech., 2002; 20:70-75; Finney H.M. et al., J. Immunol., 2004; 18:676-684; Milone et al., 2009, Mol. Ther.,17(8):1453-64; Carpenito et al., 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106(9):3360-5). Эти CAR "второго поколения" (один костимулирующий домен) и "третьего поколения" (2 костимулирующих домена) характеризуются повышенной функцией на доклинических моделях на животных злокачественной опухоли, и некоторые CAR с усиленной костимуляцией в настоящее время находятся на ранней фазе клинических испытаний на человеке лечения злокачественной опухоли (обзор приведен у Barrett D.M. et al., Ann. Rev. Med., 2014; 65:333-347).

Хотя одноцепочечные CAR индуцируют устойчивую антигенспецифическую цитотоксическую активность, природные рецепторы, использующие высоко консервативные домены ITAM, как правило, являются структурированными в многоцепочечные комплексы, состоящие из отдельных связывающих лиганд и содержащих ITAM сигнальных цепей, таких как комплекс Т-клеточный рецептор (TCR)-CD3, комплекс В-клеточный рецептор (BCR)-Igα/β и комплекс Fc-рецептора (FcR). Потенциальные преимущества многоцепочечного иммунорецепторного комплекса заключаются в многообразии, включая большее разнообразие сигналов, доступных в результате многих взаимодействий между связывающими лиганд и сигнальными молекулами и длительной передачи сигналов ITAM, которая отделена от интернализации связывающей лиганд цепи (Sigalov et al., Advances in experimental medicine and biology, 640:ix-xi, 2008). Последствия комбинации нескольких компонентов рецепторов, обычно встречающихся в гетерологичных рецепторах в CAR, не были полностью выяснены; однако для некоторых конструкций наблюдали анергию и независящую от антигена передачу сигналов (Brocker, Blood, 96(5):1999-2001, 2000; Brocker et al., The Journal of experimental medicine, 181(5):1653-9, 1995; Milone et al., Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, 17(8):1453-64, 2009).

Изобретение, раскрытое в настоящем описании, относится к CAR, сконструированным на основе более "естественной"

конструкции многоцепочечного иммунорецептора, обладающим большей активностью в отношении активации Т-клеток вследствие естественно отобранных взаимодействий между субъединицами в рецепторном комплексе и других рецепторов в иммунных клетках. В качестве основы CAR выбирали иммуноглобулиноподобный рецептор киллерных клеток(KIR) и многоцепочечный иммунорецепторный комплекс DAP12 (Thielens et al., Current opinion in immunology, 24(2):239-45, 2012). Несмотря а то, что они экспрессируются естественными киллерными клетками, где они вносят вклад в их естественную цитотоксичность, экспрессию KIR также наблюдали в CD4+ и CD8+ Т-клетках (Moretta et al., Immunological reviews, 155:105-17, 1997; Falk et al., Human immunology; 61(12):1219-32, 2000; Remtoula et al., Journal of immunology, 180(5):2767-71, 2008). Активирующие KIR, такие как KIR2DS2, содержат короткий цитоплазматический домен с не известной эндогенной сигнальной активностью. Однако KIR образуют нековалентный комплекс с димерами DAP12, содержащей ITAM адапторной молекулой, способной связываться с киназами Syk и Zap70 в NK-клетках (Lanier et al., Nature, 391(6668):703-7, 1998). В дополнение к стимуляции цитотоксичности при связывании с лигандом также было продемонстрировано, что KIR проявляют костимулирующие действия в Т-клетках при отсутствии DAP12, что подтверждает, что эти молекулы могли бы являться способными обеспечивать первичную инициирующую активность и костимуляции в Т-клетках (Snyder et al., Journal of immunology, 173(6):3725-31, 2004).

CAR на основе KIR конструировали путем сплайсинга специфического к мезотелину scFv SS1 на трансмембранном и коротком цитоплазматическом домене активирующего KIR, KIR2DS2 (SS1-KIRS2), как схематически проиллюстрировано на фигуре 1 (Hassan et al., Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 8(11):3520-6, 2002). Содержащая ITAM адапторная молекула DAP12 конститутивно экспрессируется в естественных киллерных (NK) клетках, но она экспрессируется только в подпоуляции Т-клеток человека (Moretta et al.). Таким образом, для получения коэкспрессии обеих молекул получали бицистронный лентивирусный вектор, кодирующий CAR на

основе специфического к мезотелину KIR (SS1-KIRS2) и молекулу DAP12, отделенную последовательностью вируса *Thoseaasigna* 2A (T2A) (фиг. 2). Трансдукция первичных Т-клеток человека SS1-KIRS2 и DAP12 бицистронным лентивирусом после активации антителами против CD3 и CD28 демонстрировала устойчивую экспрессию на поверхности SS1-KIRS2, которая являлась сравнимой с CAR SS1ζ на основе CD3ζ (фиг. 6). Котрансдуцированные SS1-KIRS2/DAP12 Т-клетки размножались после стимуляции поликлональными антителами против CD3/против CD28 с кинетикой, которая являлась сравнимой с кинетикой, наблюдаемой с трансдуцированными в условиях имитации Т-клетками или Т-клетками, трансдуцированными специфическим к мезотелину CAR, содержащим CD3ζ цитоплазматический домен (данные не показаны). Сравнивали цитотоксические активности CAR Т-клеток на основе KIR в сравнении с CD3ζ (SS1-z) CAR Т-клетками. Для трансдуцированных SS1-KIRS2/DAP12 Т-клеток демонстрировали высокую цитотоксическую активность по отношению к клеткам K562, которые экспрессировали мезотелин человека, (K-meso), аналогичную по величине конструкции SS1ζ. Ни для каких конструируемых Т-клеток не демонстрировали литическую активность по отношению к K562 (Kwt) дикого типа, что подтверждает специфическую активацию рецептора SS1-KIRS2 когнатным антигеном-мишенью мезотелином (фиг. 6).

Вследствие того, что экспрессия KIR2DS2 была описана в Т-клетках при отсутствии детектируемой экспрессии DAP12, оценивали экспрессию и функцию рецептора SS1-KIRS2 с совместной доставкой DAP12 или без нее. С использованием лентивирусного вектора, который коэкспрессировал DAP12 с красным флуоресцентным белком, dsRed (DAP12-dsRed) или экспрессирующего dsRed контрольного вектора (dsRed) Т-клетки трансдуцировали лентивирусным вектором с DAP12 или контрольным вектором с последующей трансфекцией транскрибируемой *in vitro* РНК, экспрессирующей SS1-KIRS2. SS1-KIRS2 экспрессировался на поверхности Т-клеток без добавления DAP12; однако экспрессия на поверхности SS1-KIRS2 повышалась на ~1 log при добавлении DAP12 (фиг. 12A). Несмотря на экспрессию SS1-KIRS2, Т-клетки без DAP12 не лизировали экспрессирующие

мезотелин клетки-мишени, что демонстрирует необходимость DAP12 в индуцируемой SS1-KIRS2 цитотоксической активности Т-клеток (фиг. 12B). Эти данные не исключают возможности того, что химерный KIR может обеспечивать сигналы независимо своей связи с DAP12, как ранее сообщали для природного рецептора KIR2DS2 в клонах Т-клеток (Snyder et al.).

Нековалентная связь природного KIR2DS2 и DAP12 зависит от электростатических взаимодействий между остатком аспарагиновой кислоты в трансмембранном (TM) домене KIR и остатком лизина в TM домене DAP12 (Feng et al., PLoS biology, 4(5):e142, 2006). Хотя полагают, что конфигурация этих ионизируемых аминокислотных остатков в TM доменах субъединиц TCR и CD3 отличается от KIR и DAP12, обеспечивая определенную специфичность взаимодействий, исследовали вероятность того, что SS1-KIRS2 может взаимодействовать с компонентами комплекса CD3 вместо совместно доставляемого DAP12. Вследствие того, что связь между комплексом CD3 и цепями TCR является необходимой для экспрессии TCR на клеточной поверхности, ожидают, что конкуренция KIR за компоненты CD3 препятствует нормальной экспрессии TCR, как ранее наблюдали с экспрессией клонированных TCR. Было показано, что введение эктопической цепи Vβ в Т-клетки понижает экспрессию на поверхности эндогенного TCR Vβ вследствие конкуренции во время сборки комплекса (Varela-Rohena et al., Nature medicine, 14(12):1390-5, 2008). Аналогичная частота и интенсивность TCR Vβ 13,1+ в трансдуцированных KIRS2 поликлональных Т-клетках по сравнению с трансдуцированными в условиях имитации контрольными Т-клетками подтверждает отсутствие существенного взаимодействия между SS1-KIRS2 и представителями эндогенного комплекса CD3 (фиг. 13).

Хотя цитотоксическая активность является важной эффекторной функцией противоопухолевой активности *in vivo* Т-клеток, способность антигена-рецептора индуцировать секрецию цитокинов и пролиферацию Т клеток также является важной характеристикой, которая, как правило, коррелирует с высокой противоопухолевой активностью *in vivo*. Таким образом, сравнивали индуцируемую

антигеном секрецию интерферона-γ (IFN-γ) и интерлейкина 2 (IL-2) модифицированными SS1-KIRS2/DAP12 Т-клетками для Т-клеток, несущих CAR на основе CD3ζ без костимулирующего домена (SS1-ζ) или с костимулирующими доменами CD28 или 4-1BB (SS1-28ζ и SS1-BBζ), соответственно. Конструкция SS1-ζ стимулирует более низкую секрецию IFN-γ и IL-2 (фиг. 10, 11). Продукция интерферона-γ повышается и является сравнимой в Т-клетках, экспрессирующих SS1-KIRS2/DAP12 или SS1-BBζ, при этом Т-клетки, экспрессирующие CAR SS1-28ζ, характеризуются существенно более высокой продукцией IL-2 и IFN-γ (фиг. 10). Анализ большей панели цитокинов и хемокинов демонстрирует, что SS1-KIRS2/DAP12 стимулирует профиль экспрессии, который является качественно аналогичным для CAR на основе CD3ζ с величиной индуцируемой антигеном секреции цитокинов и хемокинов, которая является сравнимой с CAR SS1-ζ и SS1-BBζ (фиг.11).

Рецептор SS1-KIRS2/DAP12 также являлся эффективным стимулятором пролиферации Т клеток в ответ на когнатный антиген (фиг. 14). В отличие от стандартного CAR SS1-ζ, который зависит от дополнительных костимулирующих сигналов для устойчивой пролиферации, Т-клетки SS1-KIRS2/DAP12 характеризуются пролиферацией, которая является сравнимой с SS1ζ при добавлении антитело-агониста против CD28. Механизм костимуляции, обеспечиваемый SS1-KIR2 в отсутствие DAP12, может быть связан с взаимодействиями KIR с другими адапторными молекулами (Synder et al.). Дополнительные рецепторы естественным образом экспрессируемые Т-клетками также могут быть способны использовать совместно доставляемый DAP12, дополнительно внося вклад в активацию и пролиферацию Т-клеток. В частности, интегрины могут обеспечивать костимулирующие сигналы Т-клеткам (Brunmark et al., (1996) PNAS USA, 93(25):14736-41; Zuckerman et al., (1998) J. Immunol., 160(7):3259-68). DAP12 является критическим для внешней передачи сигналов интегринами в макрофаги и нейтрофилы (Jakus et al., (2007) Trends in Cell Biol., 17(10):493-501; Mocsai et al., (2006) Nature Immunol.,

7(12):1326-33), и обеспечивать придавать уникальную сигнальную активность LFA-1 и другим интегринам в Т-клетках, внося вклад в активность SS1-KIRS2/DAP12.

Для повышения активности CAR Т-клетки *in vivo* в CAR вводили CD28 и 4-1BB (Carpenito et al., (2009) PNAS USA 106(9):3360-65); однако костимуляция не всегда способна преодолевать иммуносупрессивное микроокружение опухоли. Недавно было опубликовано, что Т-клетки с CAR SS1-BBζ, инъецируемые иммунодефицитным мышам NOD-SCID-$\gamma_c^{-/-}$ (NSG), несущим ксенотрансплантат клеток EM-meso (линии клеток, получаемой из плеврального выпота пациента со злокачественной мезотелиомой), размножаются *in vivo*, но становятся гипофункциональными в микроокружении опухоли, что связано с неспособностью устранять опухоли (Moon et al., (2014) Clinical Cancer Res., 20:4262-4273). Активность модифицированных SS1-KIRS2/DAP12 Т-клеток оценивали на такой высокоустойчивой модели мезотелиомы. CAR на основе SS1-KIRS2/DAP12 и CD3ζ с костимуляцией или без нее способны лизировать клетки EM-meso *in vitro* со сравнимой эффективностью. Для трансдуцированных в условиях имитации Т-клеток и трансдуцированных DAP12-dsRed Т-клеток демонстрируют минимальную литическую активность в отношении клеток EM-meso (фиг. 36). Однократная внутривенная инъекция трансдуцированных в условиях имитации, трансдуцированных SS1ζ и SS1BBζ Т-клеток не вызывала наблюдаемого противоопухолевого эффекта на установленных ксенотрансплантатах EM-meso (фиг. 15A). Рост опухоли значительно замедлялся Т-клетками с CAR SS1-28ζ; однако только модифицированные SS1-KIRS2/DAP12 Т-клетки индуцировали регрессию опухолей с существенным подавлением рост опухоли EM-meso на 52 сутки ($p<0,001$, ANOVA с апостериорным F-критерием Шеффе). Второй эксперимент, сравнивающий Т-клетки, экспрессирующие SS1-KIRS2/DAP12, с DAP12 отдельно или SS1-28ζ конструируемыми Т-клетками, демонстрировал аналогичную повышенную противоопухолевую активность Т-клеток SS1-KIRS2/DAP12 (фиг. 38). Устойчивая активность CAR на основе KIR не является уникальной для специфичности к мезотелину. Также конструировали

специфические к CD19 CAR на основе KIR с активностью *in vitro*, сравнимой с CAR CD3ζ второго поколения (фиг. 16B). Тестирование на модели ксенотрансплантата лейкоза NALM-6 также демонстрировало эффективность KIR-CAR, превосходящую CAR первого поколения, и сравнимую с CAR второго поколения с костимулирующим доменом 4-1BB.

Проводили анализ приживления Т-клеток и проникающих в опухоль лимфоцитов (TIL) для исследования механизма повышенной противоопухолевой активности Т-клеток SS1-KIRS2/DAP12 на модели ксенотрансплантата EM-meso. Только у мышей, получающих Т-клетки с CAR SS1-BBζ, наблюдали детектируемые CD45 (hCD45)-положительные клетки человека в крови и селезенке, что согласуется с ранее наблюдаемым эффектом костимулируеющего домена 4-1BB на сохранение CAR+ Т-клеток *in vivo* (Milone et al.). Несколько hCD45+ проникающих в опухоль лимфоцитов (TIL) детектировали у мышей, обрабатываемых в условиях имитации или обрабатываемых SS1ζ. В противоположность этому, опухоли, обрабатываемые Т-клетками с CAR SS1-KIRS2/DAP12, SS1-28ζ и SS1-41BBζ, имели hCD45+ TIL, которые составляли 2-4% всех жизнеспособных клеток со сравнимыми частотами для каждой группы (фиг. 15B). Иммуногистохимическое окрашивание демонстрировало CD8+ и CD4+ TIL (данные не показаны) в опухолях мышей, обрабатываемых Т-клетками с CAR SS1-KIRS2/DAP12, SS1-28ζ, и SS1-41BBζ, подтверждаемые анализом проточной цитометрии. Таким образом, повышенная эффективность Т-клеток SS1-KIRS2/DAP12 не связана с частотой TIL в опухолях на поздних стадиях роста опухоли. Вследствие того, что сравнение TIL ограничено большими различиями объема опухоли на поздних моментах времени, проводили оценку на ранних моментах времени после инъекции Т-клеток. На 10 сутки после инъекции Т-клеток наблюдали сравнимые частоты hCD45+ TIL в группах, обрабатываемых Т-клетками с CAR SS1-28ζ и SS1-KIRS2/DAP12, но несколько CD45+ TIL присутствовали в группе Т-клеток с CAR SS1-BBζ (фиг. 15B). Ограниченный анализ этих выделенных TIL демонстрировал, что только Т-клетки с CAR SS1-KIRS2/DAP12 являлись способными проявлять литическую активность

in vitro по отношению к клеткам EM-meso (данные не показаны). Эти результаты указывают на то, что замедленное накопление Т-клеток SS1-BBζ в опухоли наряду с индуцируемой опухолью гипофункцией лежит в основе слабой противоопухолевой активности этих клеток, несмотря на их высокую частоту ан поздних стадиях развития опухоли. Проводили повторный эксперимент, сравнивающий Т-клетки с CAR SS1-28ζ и SS1-KIRS2/DAP12 с выделенными TIL на 18 сутки после инъекции Т-клеток для получения большего числа TIL для фенотипического и функционального анализа. Выделенные TIL SS1-28ζ характеризовались заметно пониженной цитотоксической активностью и антигенспецифической продукцией IFN-γ по сравнению с криоконсервированными Т-клетками, используемыми для лечения. В противоположность этому, TIL из опухолей, обрабатываемых Т-клетками с CAR SS1-KIRS2/DAP12, обладали сравнимой цитотоксичностью *in vitro* и продукцией IFN-γ с криоконсервированными клетками (фиг. 15E и фиг. 37). Иммуноблоттинг белковых лизатов из TIL и криоконсервированных клеток для белка CAR демонстрировал потерю экспрессии CAR (данные не показаны). Отсутствие CAR в TIL может быть обусловлено подавлением экспрессии или слабой выживаемостью Т-клеток с CAR SS1-28ζ относительно нетрансдуцированных Т-клеток в микроокружении опухоли.

В заключении, предоставленные в настоящем описании данные демонстрируют, что комбинация CAR на основе KIR и DAP12 обеспечивает высокоэффективную антигенспецифическую рецепторную систему для придания искусственной антигенной специфичности Т-клеткам. Несмотря на относительную эквивалентную активность *in vitro*, кроме того, показано, что такой CAR на основе KIR обладает значительно улучшенной противоопухолевой эффективностью по сравнению с CAR на основе CD3ζ с одни или более костимулирующими доменами на модельной системе опухоли, используемой в настоящем описании, возможно, вследствие повышенной устойчивости к инактивации. Будет проводиться дальнейшее исследование механизмов такой повышенной эффективности и конструкций химерных рецепторов на основе других

ассоциированных с DAP12 связывающих лиганд рецепторов, а также дополнительных природных содержащих ITAM рецепторных систем, таких как FcRγ.

Пример 7: CAR на основе KIR можно коэкспрессировать с природным ингибирующим KIR, что обеспечивает регуляцию посредством экспрессии HLA на клетках-мишенях

Получение и характеристика линии клеток K562-meso, которые экспрессируют лиганд HLA-Cw KIR2DL3

Материалы и способ. Клетки K562 дикого типа или линию K562, предварительно сконструированную так, чтобы экспрессировать мезотелин (K562-meso), трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим аллель HLA-Cw3. Клетки сортировали на однородную экспрессию мезотелина и HLA-Cw3 активируемой флуоресценцией сортировкой клеток. Экспрессию HLA-Cw3 подтверждали проточной цитометрией после окрашивания антителом W6/32 против HLA A, B, C, конъюгированным с APC.

Результат. Можно получать линии клеток K562, экспрессирующих отдельно или в комбинации мезотелин или HLA-Cw3 (фиг. 20).

Коэкспрессия SS1-KIRS2 и KIR2DL3 в первичных T-клетках человека

Материалы и способ. Первичные T-клетки человека стимулировали микрогранулами с антителами против CD3/28 с последующей трансдукцией бицистронным лентивирусным вектором, экспрессирующим DAP12 и SS1-KIRS2, отдельно или в комбинации с лентивирусным вектором, экспрессирующим KIR2DL3, на сутки 1 после активации. Экспрессию SS1-KIRS2 CAR оценивали проточной цитометрией с использованием биотинилированного поликлонального антитела козы против F(ab)2 мыши с последующим SA-APC. Экспрессию KIR2DL3 определяли с использованием специфического к KIR2D моноклонального антитела.

Результат. Можно получать первичные T-клетки человека, экспрессирующие специфический к мезотелину CAR на основе KIR с одним DAP12 (KIRS2), одним KIR2DL3 или комбинацией двух рецепторов (фиг. 21).

KIR2DL3, коэкспрессируемый с KIR-CAR, может подавлять антигенспецифическую цитотоксичность в присутствии HLA-Cw на клетках-мишенях

Материалы и способ. Первичные Т-клетки человека стимулировали микрогранулами с антителами против CD3/28 с последующей трансдукцией бицистронным лентивирусным вектором, экспрессирующим DAP12 и SS1-KIRS2. 5 мкг транскрибируемой *in vitro* иРНК, кодирующей KIR2DL3, вводили в трансдуцированные лентивирусом Т-клетки посредством электропорации после 10 суток размножения *ex vivo*. Эти популяции Т-клеток смешивали с меченными ^{51}Cr клетками-мишенями K562 (K562, K562-meso, K562-HLACw и K562-meso/HLACw), как указано, в различных отношениях эффекторных Т-клеток к клеткам-мишеням K562 (отношение E:T). Цитотоксичность определяли измерением фракции ^{51}Cr, высвобождающегося в супернатант, через 4 часа.

Результат. Экспрессирующие SS1-KIRS2/DAP12 Т-клетки являлись способными вызывать цитолиз клеток-мишеней K562, которые экспрессируют мезотелин, независимо от экспрессии HLA-Cw3. В противоположность этому, Т-клетки, коэкспрессирующие рецепторный комплекс SS1-KIRS2/DAP12 и ингибирующий KIR, KIR2DL3, оказались неспособны проявлять устойчивую цитотоксичность по отношению к K562, экспрессирующим мезотелин с HLA-Cw3; однако для этих клеток демонстрировали цитотоксическую активность по отношению к клеткам K562, экспрессирующим один мезотелин, которая являлась сравнимой с модифицированными SS1-KIRS2/DAP12 Т-клетками. Эти результаты демонстрируют способность ингибирующих рецепторов KIR регулировать функциональную активность активирующего CAR на основе KIR (фиг. 22).

Пример 8: CAR на основе KIR со специфичностью к CD19 могут активировать антигенспецифическую цитотоксичность по отношению к клетки-мишени *in vitro* и *in vivo*

CAR на основе KIR со специфичностью к CD19 могут активировать антигенспецифическую цитотоксичность по отношению к клетки-мишени *in vitro*

Материалы и способ. После активации гранулами с антителами против CD3/CD28 Т-клетки трансдуцировали бицистронным

лентивирусным вектором, экспрессирующим DAP12 наряду со специфическим к CD19 CAR на основе KIR, в котором получаемый из FMC63 scFv является слитым с полноразмерным KIR2DS2 (CD19-KIR2DS2), или с CAR на основе KIR, получаемым слиянием scFv FMC63 с трансмембранным и цитоплазматическим доменом KIR2DS2 через короткий линкер $[Gly]_4$-Ser-линкер-(CD19-KIRS2). Трансдуцированные Т-клетки культивировали до конца фазы логарифмического роста и оценивали экспрессию специфического к CD19 CAR на основе KIR проточной цитометрией с использованием биотинилированного поликлонального антитела козы против F(ab)2 мыши с последующим SA-PE. Меченные ^{51}Cr клетки-мишени K562 с экспрессией CD19 (K562- CD19) или без нее (K562-wt) смешивали в различных отношениях Т-клеток с клеткам-мишеням (отношение E:T). Цитотоксичность определяли измерением фракции ^{51}Cr, высвобождаемого в супернатант через 4 часа. В качестве отрицательных и положительных контролей так же включали контрольные Т-клетки, которые являлись либо трансдуцированными в условиях имитации (NTD) или трансдуцированными специфическим к CD19 CAR на основе CD3ζ (CD19-z), соответственно.

Результат. Анализ проточной цитометрией демонстрирует экспрессию специфического к CD19 scFv на поверхности Т-клеток, трансдуцированных CD19-KIR2DS2, CD19-KIRS2 и CD19-z (фиг. 16A). Т-клетки, экспрессирующие DAP12 с CD19-KIR2DS2 или CD19-KIRS2, являлись способными вызывать цитолиз клеток-мишеней антигенспецифическим образом (фиг. 16B). Цитотоксичность, проявляемая модифицированными CAR на основе KIR Т-клетками, являлась сравнимой или выше чем у Т-клеток, экспрессирующих специфический к CD19 CAR на основе CD3ζ.

Т-клетки, трансдуцированные CD19-KIRS2/DAP12, индуцируют регрессию опухоли в ксенотрансплантате лейкоза человека

Материалы и способ. Мышам NOD-SCID-$\gamma_c^{-/-}$(NSG) прививали внутривенно через хвостовую вену на сутки 0 1 миллион опухолевые клетки Nalm-6 CBG, линии лейкозных клеток, экспрессирующих CD19. В эксперименте Т-клетки стимулировали стимулирующими гранулами с антителами против CD3/CD28 с последующей трансдукцией

лентивирусом на сутки 1 серией CAR на основе CD3 с костимулирующим доменом (CD19-z, CD19-BBz) или без него или специфическими к CD19 CAR на основе KIR, CD19-KIRS2 с DAP12, как указано, на фигуре. В качестве контроля использовали трансдуцированные в условиях имитации (NTD) Т-клетки. Т-клетки размножали до конца фазы логарифмического роста *ex vivo* и инъецировали внутривенно на сутки 5 после инъекции лейкозной линии клеток 2 миллиона CAR Т-клеток на мышь. Опухолевую нагрузку оценивали посредством биолюминесцентной визуализации. Для каждого условия Т-клеток анализировали 5 животных (фиг. 17).

Результат. В представленном эксперименте *in vivo* (фиг. 17) NTD Т-клетки не оказывали эффекта на рост опухоли, тогда как трансдуцированные CD19z, CD19BBz и CD19-KIRS2 Т-клетки проявляют различные противоопухолевые эффекты. У мышей, которым вводили инфузией CD19z Т-клетки, демонтировали незначительное снижение опухолевой нагрузки, но сохранение детектируемых уровней люминесценции. В противоположность этому, люминесценция опухолевых клеток у мышей, которым вводили инфузией CD19BBz или CD19KIRS2 Т-клетки, падала до нижнего предела детекции (фиг. 17B, точечная линия) только через 7 суток после инъекции Т-клеток, что демонстрирует полный клиренс вне небольшого резервуара лейкозных клеток в недоступном для Т-клеток корне зуба. На сутки 15 опухолевая нагрузка в группе Т-клеток в условиях имитации превышала конечную точку (2×10^{10} фотонов/с), и животных умерщвляли, при этом люминесценция в группах CD19BBz и CD19KIRS2 оставалась на нижем пределе детекции.

Пример 9: CAR на основе одиночного домена VHH верблюда можно экспрессировать на поверхности Т-клеток в комбинации с CAR на основе scFv без заметного взаимодействия рецепторов

Материалы и способ. Т-клетки Jurkat, экспрессирующие GFP под контролем NFAT-зависимого промотора (NF-GFP), трансдуцировали специфическим к мезотелину активирующим CAR (SS1-CAR), специфическим к CD19 активирующим (19-CAR) или CAR, получаемым с использованием VHH-домена верблюда, специфического к EGFR (VHH-CAR). После трансдукции активирующим CAR клетки

затем трансдуцировали дополнительным ингибирующим CAR, распознающим CD19 (19-PD1), с получением клеток, коэкспрессирующих активирующий и ингибирующий CAR (SS1+19PD1, 19+19PD1 или VHH+19PD1). Трансдуцированные Т-клетки Jurkat культивировали в течение 24 часов совместно с различными линиями клеток, которые 1) лишены всех антигенов-мишеней (K562), 2) экспрессируют мезотелин (K-meso), CD19 (K-19) или только EGFR (A431), 3) экспрессируют комбинацию EGFR и мезотелина (A431-мезотелин) или CD19 (A431-CD19) или 4) экспрессируют комбинацию CD19 и мезотелина (K-19/meso). В качестве отрицательных и положительных контролей для активации NFAT также включали дополнительные условия, которые включают отсутствие стимулирующих клеток (no stim) или K562 с 1 мкг/мл OKT3 (OKT3), соответственно. Экспрессию GFP в качестве маркера активации NFAT оценивали проточной цитометрией.

Результат. У верблюдов и родственных видов (например, ламы) естественным путем образуются антитела, которые содержат один вариабельный домен тяжелой цепи. Этот домен, известный VHH-домен верблюда, эволюционировал так, чтобы существовать без спаривания с вариабельным доменом легкой цепи. На фиг. 27A схематически представлена возможность того, что две гетерологичные молекулы scFvcan диссоциируют и повторно ассоциируют друг с другом при предоставлении на поверхности клетки, как продемонстрировано наблюдаемым разрушением связывания scFv с когнатным лигандом во время коэкспрессии рецептора (фиг. 25 и Fig 26). На фиг. 27B приведено схематическое представление ожидаемого пониженного взаимодействия CAR scFv, предоставляемым на поверхности клетки, в комбинации с CAR на основе VHH-домена. На фиг. 28 продемонстрировано, что коэкспрессия двух CAR на основе scFv (SS1-z активирующего CAR и CD19-PD1 ингибирующего CAR) на поверхности Jurkat приводит к неспособности активирующего CAR (SS1-z) распознавать свой когнатный лиганд на клетке-мишени и запускает активацию Т-клеток несмотря на отсутствие лиганда ингибирующего рецептора. Это соответствует наблюдаемому пониженному связыванию лиганда на поверхности (фиг. 25). В противоположность этому, коэкспрессия такого же ингибирующего

CAR (CD19-PD1) с активирующим CAR на основе VHH верблюда (VHH-z) не оказывала влияния на способность активирующего CAR на основе VHH распознавать свой когнатный лиганд EGFR. Эти данные подтверждают модель, проиллюстрированную на фиг. 27B, что активирующий CA на основе VHH можно экспрессировать с CAR на основе scFv без существенного взаимодействия между рецепторами вследствие пониженной способности доменов scFv и VHH взаимодействовать.

Пример 10: NCR CARна основе NKp46 со специфичностью к мезотелину активирует антигенспецифическую цитотоксичность

Материалы и способ. После активации гранулами с антителами против CD3/CD28 Т-клетки трансдуцировали бицистронным лентивирусным вектором, экспрессирующим DAP12 и SS1-KIRS2 (контроль) или FcεRγ и специфический к мезотелину CAR на основе NKp46 (SS1-NKp46), или FcεRγ и специфический к мезотелину NKp46 CAR, в котором природный внеклеточный домен NKp46 являлся усеченным (SS1-TNKp46). Экспрессию специфических к мезотелину CAR оценивали проточной цитометрией с использованием биотинилированного поликлонального антитела козы против F(ab)2 мыши с последующим SA-PE (фигура 18). Т-клетки смешивали с меченными ^{51}Cr клетками-мишенями K562, экспрессирующими мезотелин, в различных отношениях эффекторных Т-клеток к клеткам-мишеням K562 (отношение E:T). Цитотоксичность определяли измерением фракции ^{51}Cr, высвобождаемого в супернатант, через 4 часа в сравнении со спонтанным высвобождением.

Результат. Для обоих рецепторов SS1-NKp46 и SS1-NKp46 демонстрирую экспрессию на поверхности Т-клеток. Для трансдуцированных SS1-NKp46 Т-клеток демонстрируют устойчивый цитолиз клетки-мишени, который является сравнимым с CAR SS1-KIRS2 на основе KIR. Для SS1-NKp46 демонстрировали более слабую цитотоксическую активность, которая являлась очевидной только при высоких отношениях эффектора к клетке-мишени (фиг. 18). Эти данные демонстрируют, что антигенспецифический химерный иммунорецептор для применения в перенаправленной цитолитической активности Т-клеток можно получать из рецепторов естественной

цитотоксичности (NCR) с использованием конструкции, аналогичной конструкции, используемой для создания CAR на основе KIR.

Пример 11: Взаимодействие доменов scFv

Материалы и способ. На фигуре 24 Т-клетки Jurkat трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим специфический к мезотелину ингибирующий CAR на основе KIR (SS1-KIR2DL3). Затем эти трансдуцированные клетки трансдуцировали лентивирусным векторов, кодирующим специфический к CD19 активирующий CAR на основе KIR (CD19-KIR2DS2), в различных разведениях. Эти KIR-CAR схематически приведены на фигуре 23. После трансдукции обоями CAR проточной цитометрией оценивали частоту клеток с экспрессией на поверхности CAR с интактным scFv, способным связывать свой лиганд-мишень, после окрашивания слитым белком мезотелин-Fc с последующим окрашиванием вторичным антителом против Fc, меченным PE, и специфическим к CD19 (клон FMC63) антиидиотипическим моноклональным антителом, меченным APC. На фигуре 25 активированные антителом против CD3/28 первичные Т-клетки человека трансдуцировали различными лентивирусными векторами, кодирующими специфический к мезотелину CAR на основе CD3ζ, несущий слияние mCherry с С-концом (SS1z-mCh), специфический к CD19 CAR с CD3ζ и 4-1BB цитоплазматическим доменом (19bbz) или комбинацию обоих SS1z-mCh и 19bbz. Экспрессию mCherry и функциональный scFv SS1 оценивали проточной цитометрией после окрашивания слитым белком мезотелин-Fc с последующим окрашиванием вторичным антителом против Fc, меченным FITC. На фигуре 26 активированные антителом против CD3/28 первичные Т-клетки человека трансдуцировали различными лентивирусными векторами, кодирующими специфический к мезотелину CAR на основе CD3ζ (SS1z), специфический к CD19 CAR, несущий FMC63 scFv (19bbz), или специфический к CD19 CAR, несущий 21d4 scFv (21d4bbz), или специфический к CD19 CAR, несущий BL22 scFv (BL22bbz), в котором scFv состоял из вариабельного домена тяжелой цепи (VH) 5' к вариабельному домену легкой цепи (VL) в scFv (H2L) или VL, локализованного на 5'-конце к VH (L2H). После трансдукции каждым из специфических к CD19 CAR Т-клетки

котрансдуцировали SS1z. Связывание SS1z с мезотелином и экспрессию на поверхности scFv против CD19 оценивали проточной цитометрией после окрашивания слитым белком мезотелин-Fc с последующим окрашиванием вторичным антителом против Fc, меченным FITC, или биотинилированным белком L с последующим окрашиванием конъюгированным со стрептавидином APC.

Результат. На фиг. 24 продемонстрировано, что коэкспрессия CAR на основе двух интактных связывающих лиганд scFv (SS1-KIR2DL3 и CD19-KIR2DS2) на клеточной поверхности является взаимоисключающей. На фигуре 26 продемонстрировано, что утрата связывания лиганда происходит несмотря на экспрессию CAR в клетке, как проиллюстрировано по наличию mCherry, экспрессируемого клетками с пониженным связыванием мезотелина в клетках, котрансдуцированных SS1z-mCh и 19bbz. На фигуре 26 продемонстрировано, что взаимодействие между scFv, приводящее к утрате функции связывания scFv, можно наблюдать с использованием различных CAR на основе scFv, что подтверждает универсальную природу этого эффекта. Эти наблюдения соответствуют модели, проиллюстрированной на фиг. 27 панель A, в которой вариабельный домен одного scFv может подвергаться межмолекулярному спариванию с гетерологичным химерным рецептором на основе scFv, что приводит к утрате ввязывания scFv в одиночном CAR.

Пример 12: Химерный антигенный рецептор (CAR) на основе иммуноглобулиноподобного рецептора киллерных клеток (KIR) запускает цитотоксическую активность в солидных опухолях

Химерные антигенные рецепторы (CAR) на основе одной химерной молекулы, несущей антигенсвязывающий домен, связанный в *цис*-положении с цитоплазматическими доменами CD3ζ, и костимулирующие рецепторы CD28 или 4-1BB, обеспечивают эффективный способ конструкции Т-клеточной цитотоксичности по отношению к опухолям. Использовали химерный многочепочечный рецептор на основе иммуноглобулиноподобных рецепторов киллерных клеток (KIR), как правило, экспрессируемых естественными киллерными (NK) клетками, и Т-клетки. Сконструированный слиянием одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) с трансмембранным

и цитоплазматическим доменом KIR, было показано, что CAR на основе KIR, нацеленный на мезотелин (SS1-KIR), запускает антигенспецифическую цитотоксическую активность и продукцию цитокинов, которая является сравнимой с CAR на основе CD3ζ с индуцируемой антигеном пролиферацией, которая не зависит от дополнительной костимуляции. С использованием модели ксенотрансплантатов мезотелиомы, резистентной к Т-клеточной иммунотерапии, дополнительно продемонстрировали, что CAR на основе KIR, нацеленные на мезотелин, обладают более мощной противоопухолевой активностью по сравнению с Т-клетками, несущими специфические к мезотелину CAR на основе CD3ζ с костимуляцией несмотря на устойчивость *in vivo* последних модифицированных CAR Т-клеток. Оценка проникающих в опухоль лимфоцитов демонстрирует, что CAR+ Т-клетки на основе KIR характеризуются устойчивостью к приобретенной гипофукции в микроокружении опухоли по сравнению с CAR на основе CD3ζ с костимулирующими доменами рецептора. Способность CAR на основе KIR индуцировать регрессию опухоли, в отношении которой для CAR на основе CD3ζ второго поколения демонстрируют ограниченную активность, подтверждает необходимость дополнительной клинической оценки CAR на основе KIR на мезотелиоме и других опухолях, например, других солидных опухолях.

Пример 13: Противоопухолевая активность *in vivo* специфических к мезотелину CAR

Аналогично как в эксперименте ксенотрансплантата, описанном в примере 6, серию конструкций CAR на основе мезотелина тестировали на модели мезотелиомы для оценки противоопухолевой активности *in vivo*. Тестировали три специфические к мезотелину конструкции CAR (как продемонстрировано на фигуре 39): конструкцию CAR 2-ого поколения, содержащую антигенсвязывающий домен SS1 и цитоплазматический домен, содержащий внутриклеточные сигнальные домены CD28 и CD3-дзета (SS1-28z, фиг. 39C), многоцепочечный KIR-CAR, содержащий антигенсвязывающий домен SS1 и цитоплазматический домен KIR2DS2 на одной цепи и адапторную молекулу DAP12 на другой цепи (SS1-KIRS2/DAP12, фиг. 39A), и

одноцепочечный KIR-CAR, содержащий антигенсвязывающий домен SS1 и цитоплазматический домен, содержащий DAP12 (SS1-DAP12, фиг. 39B). Трансмембранный домен используемой конструкции SS1-DAP12 представлял собой трансмембранный домен CD8.

Взрослым мышам NSG инъецировали подкожно 2×10^6 клеток EM-meso, как описано ранее и в примере 6. Первичные Т-клетки человека трансдуцировали SS1-28z, SS1-KIRS2/DAP12, SS1-DAP12, достигая 90% эффективности трансдукции, или трансдуцировали в условиях имитации. $4,3\times10^6$ трансдуцированных CAR или трансдуцированных в условиях имитации первичных Т-клеток человека инъецировали внутривенно на сутки 20 после имплантации опухоли. Объем опухоли измеряли циркулем по формуле $(\pi/6)\times(\text{длина})\times(\text{ширина})^2$ в указанные моменты времени (n=5 мышей в группе). Объем опухоли сравнивали между группами обработки CAR Т-клетками на сутки 40 (самый низкий уровень регрессии опухоли) и сутки 52 (конец эксперимента) посредством одностороннего ANOVA ($p<0,001$) с межгрупповыми сравнениями, проводимыми посредством апостериорного F-критерия Шеффе. * означает статистически значимое отличие от имитирующего контроля в оба момента времени ($p<0,001$).

Как продемонстрировано на фигуре 40, SS1-DAP12 обладал противоопухолевой активностью, что приводило к уменьшению объема опухоли по сравнению с трансдуцированном в условиях имитации контролями и контролями без Т-клеток. SS1-KIRS2/DAP12, аналогично результатам, описанным в примере 6, обладал устойчивой противоопухолевой активностью, эквивалентной активности, получаемой конструкцией SS1-28z.

Пример 14: Активность *in vitro* NKR-CAR, содержащих антигенсвязывающие домены человека, которые связываются с мезотелином

Получали NKR-CAR, содержащие антигенсвязывающие домены человека, которые связываются с мезотелином. Последовательности scFv человека, которые связываются с мезотелином, M-5, M-11, M-12, M-14, M-16, M-17, M-21 и M-23, как предоставлено в таблице 4, сливали с трансмембранным доменом и цитоплазматическим

доменом, получаемым из KIR2DS2, в дальнейшем обозначаемым как huMeso-KIRS2. Лентивирусные конструкции получали, как описано в предшествующих примерах, например, бицистронный лентивирусный вектор, дополнительно содержащий DAP12, связанный с NKR-CAR участком расщепления пептида T2A. Для оценки активности CAR специфических к мезотелину NKR-CAR, содержащих scFv против мезотелина человек, проводили различные анализы *in vitro*.

Экспрессия на поверхности

Анализ проводили для определения экспрессии на поверхности конструкций huMeso-KIRS2 на первичных Т-клетках человека. Первичные Т-клетки человека стимулировали активирующими Т-клетки гранулами с антителами против CD3/CD28 (Dynabeads® CD3/CD28 CTS™, Life Technologies). Через 24 часа стимуляции Т-клетки трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим huMeso-KIRS2 CARs: M-5, M-11, M-12, M-14, M-16, M-17, M-21 и M23 или контролями SS1-PLENS и SS1-PTRPE. Клетки размножали в течение 7-8 суток и анализировали проточной цитометрией на экспрессию указанных CAR с использованием растворимого мезотелин-V5-Hisx12 с последующим конъюгированным с FITC антителом к эпитопу V5 или биотинилированным антителом козы против антитела человека с последующим конъюгированным с PE SA. Экспрессию на поверхности конструкций huMeso-KIRS2 количественно определяли анализом проточной цитометрии, как продемонстрировано на фигурах 41A-41F. Для конструкций huMeso-KIRS2 демонстрировали экспрессию на поверхности первичных Т-клеток человека.

Цитотоксичность

Также оценивали специфическую к мишени цитотоксическую активность CAR-клеток, экспрессирующих huMeso-KIRS2. Первичные Т-клетки человека, экспрессирующие huMeso-KIRS2, смешивали с меченными ^{51}Cr экспрессирующими мезотелин клетками-мишенями (клетками K562, сконструированными так, чтобы экспрессировать мезотелин, K562-meso) или контрольными клетками-мишенями, которые не экспрессируют мезотелин (клетками K562, K562) в различных отношениях эффекторных Т-клеток к клеткам-мишеням (0:1, 10:1, 20:1 и 30:1). Цитотоксичность определяли измерением

фракции ^{51}Cr, высвобождаемого в супернатант, через 4 часа. Как и ожидалось в контрольном эксперименте с контрольными клетками, которые не экспрессируют мезотелин (K562), ни для одних из экспрессирующих CAR клеток не демонстрировали значимой величины цитотоксичности. На фигуре 42B для нетрансдуцированных (NTD) клеток не демонстрируют антигенспецифическую цитотоксичность. Для HuMeso-KIRS2, содержащего scFv M-23 и M-12, демонстрировали незначительную антигенспецифическую цитотоксичность. Однако для huMeso-KIRS2, содержащих M-5, M-11, M-16, M-17 и M-21, демонстрировали значительную антигенспецифическую цитотоксичность на уровнях, аналогичных уровням контролей, содержащих SS1.

Продукция цитокинов

Также оценивали продукцию цитокинов экспрессирующими huMeso-KIRS2 CAR-клетками. Первичные Т-клетки человека стимулировали, трансдуцировали huMes-KIRS2 и размножали, как описано ранее. После размножения трансдуцированные Т-клетки смешивали с K562 (мезотелин-отрицательными клетками, пустые столбики) или клетками K562, сконструированными так, чтобы экспрессировать мезотелин (черные столбики) в отношении 2:1. Концентрации цитокинов (IFNγ и IL-2) определяли в супернатантах после 24 часов стимуляции посредством ELISA для указанных цитокинов. Как продемонстрировано на фигуре 43A, содержащие M-5, M-11, M-14, M-16, M-17 и M-23, экспрессирующие huMeso-KIRS2 CAR-клетки продуцировали IFNγ. Как продемонстрировано на фигуре 43B, содержащие M-5, M-11, M16 и M17, экспрессирующие huMes-KIRS2 клетки продуцировали IL-2.

Пример 15: Низкая доза RAD001 стимулирует пролиферацию CART на модели культуры клеток

Эффект низких доз RAD001 на пролиферацию CART-клеток *in vitro* оценивали путем кокультвирования экспрессирующих CART клеток с клетками-мишенями в присутствии различных концентраций RAD001.

Материалы и способы

Получение трансдуцированных CAR Т-клеток

Лентивирусный вектор для переноса с гуманизированный CAR против CD19 человека (huCART19) использовали для получения геномного материала. упакованного в псевдотипированные лентивирусные частицы VSVg. Аминокислотная и нуклеотидная последовательность гуманизированного CAR против CD19 человека (huCART19) представляет собой CAR 1, ID 104875, описанную в публикации PCT WO2014/153270, зарегистрированной 15 марта 2014 года, и в настоящем описании обозначается как SEQ ID NO. 85 и 31.

Лентивирусный вектор для переноса ДНК смешивают с тремя компонентами для упаковки VSVg env, gag/pol и rev в комбинации с реагентом липофектамином для трансфекции клеток Lenti-X 293T. В дальнейшем среду меняют через 24 часа и 30 часов, содержащую вирус среду собирают, фильтруют и хранят при -80°C. CART получают трансдукцией свежих или замороженных наивных Т-клеток, получаемых посредством отрицательной магнитной селекции крови здорового донора или Leuko Pak. Т-клетки активируют инкубацией с гранулами с антителами против CD3/против CD28 в течение 24 часов, после чего к культурам добавляют содержащий вирус супернатант или концентрированный вирус (MOI=2 или 10, соответственно). Модифицированные Т-клетки оставляют размножаться приблизительно 10 суток. Процентное содержание трансдуцированных клеток (экспрессирующих CAR на клеточной поверхности) и уровень экспрессии CAR (относительная интенсивность флуоресценции, Geo Mean) определяют проточным цитометрическим анализом на сутки от 7 до 9. Сочетание замедления скорости роста и приближения размера Т-клетки к ~350 фл определяет состояние Т-клеток для криоконсервирования для дальнейшего анализа.

Оценка пролиферации CART

Для оценки функциональности CART Т-клетки размораживают и подсчитывают и оценивают жизнеспособность посредством Cellometer. Число CAR-положительных клетки в каждой культуре нормализуют с использованием нетрансдуцированных Т-клеток (UTD). Влияние RAD001 на CART тестировали в титрованиях с RAD001,

начиная от 50 нМ. Линия клеток-мишеней, используемая во всех экспериментах совместного культивирования представляет собой Nalm-6, линию клеток пре-B-клеточного острого лимфобластного лейкоза (ALL) человека, экспрессирующих CD19 и трансдуцированных для экспрессии люциферазы.

Для измерения пролиферации CART, T-клетки культивируют с клетками-мишенями в отношении 1:1. Анализ проводят в течение 4 суток, когда клетки окрашивают на CD3, CD4, CD8 и экспрессию CAR. Число T-клеток оценивают проточной цитометрией с использованием подсчета гранул в качестве эталонной величины.

Результаты

Пролиферативную способность CART-клеток тестировали на 4 сутки анализа совместного культивирования. Число CAR-положительных CD3-положительных T-клеток (черные столбики) и общее число CD3-положительных T-клеток (белые столбики) оценивали после культивирования CAR-трансдуцированных и нетрансдуцированных T-клеток с Nalm-6 (фиг. 39). Клетки huCART19 размножались при культивировании в присутствии менее чем 0,016 нМ RAD001 и в меньшей степени при более высоких концентрациях соединения. Следует отметить, что при 0,0032 и 0,016 нМ RAD001 пролиферация являлась выше, чем наблюдаемая без добавления RAD001. Для нетрансдуцированных T-клетки (UTD) не демонстрировали детектируемого размножения.

Пример 16: Низкая доза RAD001 стимулирует размножение CART *in vivo*

В этом примере оценивают способность клеток huCAR19 пролиферировать *in vivo* при различных концентрациях RAD001.

Материалы и способы

Клетки NALM6-luc. Линию клеток острого лимфобластного лейкоза человека (ALL) NALM6 устанавливали из периферической крови пациента с рецидивирующим ALL. Затем клетки метили люциферазой светляков. Такие суспензия клетки растили в RPMI, дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой.

Мыши. Мышей NSG (NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}*Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ) в возрасте 6 недель получали от Jackson Laboratory (складской номер 005557).

Имплантация опухоли. Клетки NALM6-luc выращивали и размножали *in vitro* в RPMI, дополненной 10% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сывороткой. Затем клетки переносили в 15 мл коническую пробирку и промывали дважды холодным стерильным PBS. Затем подсчитывали клетки NALM6-luc и ресуспендировали в концентрации 10×10^6 клетки на миллилитр PBS. Клетки помещали на лед и сразу же (в течение одного часа) имплантировали мышам. Клетки NALM6-luc инъецировали внутривенно в хвостовую вену в объеме 100 мкл в целом всего 1×10^6 клеток на мышь.

Дозирование CAR T-клеток. Мышам вводили 5×10^6 CAR T-клеток через 7 суток после имплантации опухоли. Клетки частично размораживали на водяной бане при 37 градусах Цельсия, а затем полностью размораживали добавлением 1 мл холодного стерильного PBS в пробирку, содержащую клетки. Размороженные клетки переносили в 15 мл пробирку Falcon и доводили до конечного объема 10 мл PBS. Клетки дважды промывали при 1000 об./мин. в течение 10 минут каждый раз, а затем подсчитывали на гемоцитометре. Затем T-клетки ресуспендировали в концентрации 50×10^6 CAR T-клеток на мл холодного PBS и держали на льду до дозирования мышам. Мышам инъецировали внутривенно через хвостовую вену 100 мкл CAR T-клеток в дозе 5×10^6 CAR T-клеток на мышь. Восемь мышей в группе обрабатывали 100 мкл одним PBS (PBS) или гуманизированными CD19 CAR T-клетками.

Дозирование RAD001. Формулировали концентрированную микроэмульсию 50 мг эквивалентных 1 мг RAD001, а затем ресуспендировали в D5W (5% декстроза в воде) во время дозирования. Мышам перорально дозировали каждые сутки (посредством перорального принудительного кормления) 200 мкл желаемых доз RAD001.

Анализ PK. Мышам дозировали каждые сутки RAD001, начиная с 7 суток после имплантации опухоли. Группы дозирования являлись такими, как указано ниже: 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг и 10 мг/кг. У мышей получали образцы крови на сутки 0 и 14 после первой и последней дозы RAD001 в следующие моменты времени для

анализа PK: 15 минут, 30 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 8 часов, 12 часов и 24 часа.

Результаты

Размножение и фармакокинетику RAD001 тестировали у мышей NSG с опухолями NALM6-luc. Ежесуточное пероральное дозирование RAD001 отдельно не оказывало влияние на рост опухолей NALM6-luc (фигура 47). Фармакокинетический анализ RAD001 демонстрирует, что он является достаточно стабильным в крови мышей, несущих опухоль (фигура 48A и 48B). Анализ PK на сутки 0 и сутки 14 демонстрировал, что концентрации RAD001 в крови являются выше 10 нм даже через 24 часа после дозирования самой маленькой тестируемой дозы (0,3 мг/кг).

На основании этих доз huCAR19 CAR T-клетки дозировали RAD001 и не дозировали RAD001 для определения пролиферативной способности этих клеток. Наиболее высокая используемая доза составляла 3 мг/кг на основании уровней RAD001 в крови через 24 часа после дозирования. Вследствие того, что концентрация RAD001 являлась выше 10 нМ через 24 часа после последней дозы RAD001, в исследовании *in vivo* с CAR T-клетками использовали несколько более низких доз RAD001. CAR T-клетки дозировали в/в за сутки до начала перорального дозирования RAD001 каждые сутки. За мышами наблюдали посредством FACS в отношении размножения T-клеток.

Для наиболее низких доз RAD001 демонстрируют повышенную пролиферацию CAR T-клеток (фигуры 49A-49B). Такая повышенная пролиферация является наиболее выраженной и длительной с $CD4^+$ CAR T-клетками, чем с $CD8^+$ CAR T-клетками. Однако с $CD8^+$ CAR T-клетками повышенную пролиферацию можно наблюдать в ранние моменты времени после дозы CAR T-клеток. В вариантах осуществления можно использовать РНК CART-клетки также в комбинации с ингибиторами иммунных контрольных точек.

Описания каждого и любого патента, патентной заявки и публикации, цитируемой в настоящем описании, таким образом, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Несмотря на то, что это изобретение описано со ссылкой на конкретные варианты осуществления, очевидно, что другие варианты осуществления и изменения настоящего изобретения могут быть

разработаны другими специалистами в данной области, не выходя за рамки сущности и объема изобретения. Прилагаемую формулу изобретения следует истолковывать как включающую все такие варианты осуществления и эквивалентные изменения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую химерный антигенный рецептор активирующего иммуноглобулиноподобного рецептора клетки-киллера (actKIR-CAR), где actKIR-CAR содержит:

(i) внеклеточный антигенсвязывающий домен из молекулы антитела или не принадлежащего антителу каркаса;

(ii) трансмембранный домен активирующего иммуноглобулиноподобного рецептора клетки-киллера(actKIR); и

(iii) цитоплазматический домен.

2. Нуклеиновая кислота по п. 1, где трансмембранный домен actKIR может взаимодействовать с трансмембранным доменом полипептида DAP12.

3. Нуклеиновая кислота по п. 1, где трансмембранный домен actKIR содержит положительно заряженную группу.

4. Нуклеиновая кислота по п. 1, где цитоплазматический домен представляет собой цитоплазматический домен KIR.

5. Нуклеиновая кислота по п. 1, где антигенсвязывающий домен содержит антитело, которое связывает мезотелин, CD19, CD123, EGFRvIII, CLL-1, BCMA, CD33, клаудин6 или WT1.

6. Нуклеиновая кислота по п. 5, где антигенсвязывающий домен содержит антитело, которое связывает мезотелин или CD19.

7. Химерный антигенный рецептор активирующего иммуноглобулиноподобного рецептора клетки-киллера (actKIR-CAR), кодируемый нуклеиновой кислотой по любому из пп. 1-6.

8. Цитотоксическая клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-6 или actKIR-CAR по п. 7.

9. Цитотоксическая клетка по п. 8, где цитотоксическая клетка представляет собой NK-клетку или Т-клетку.

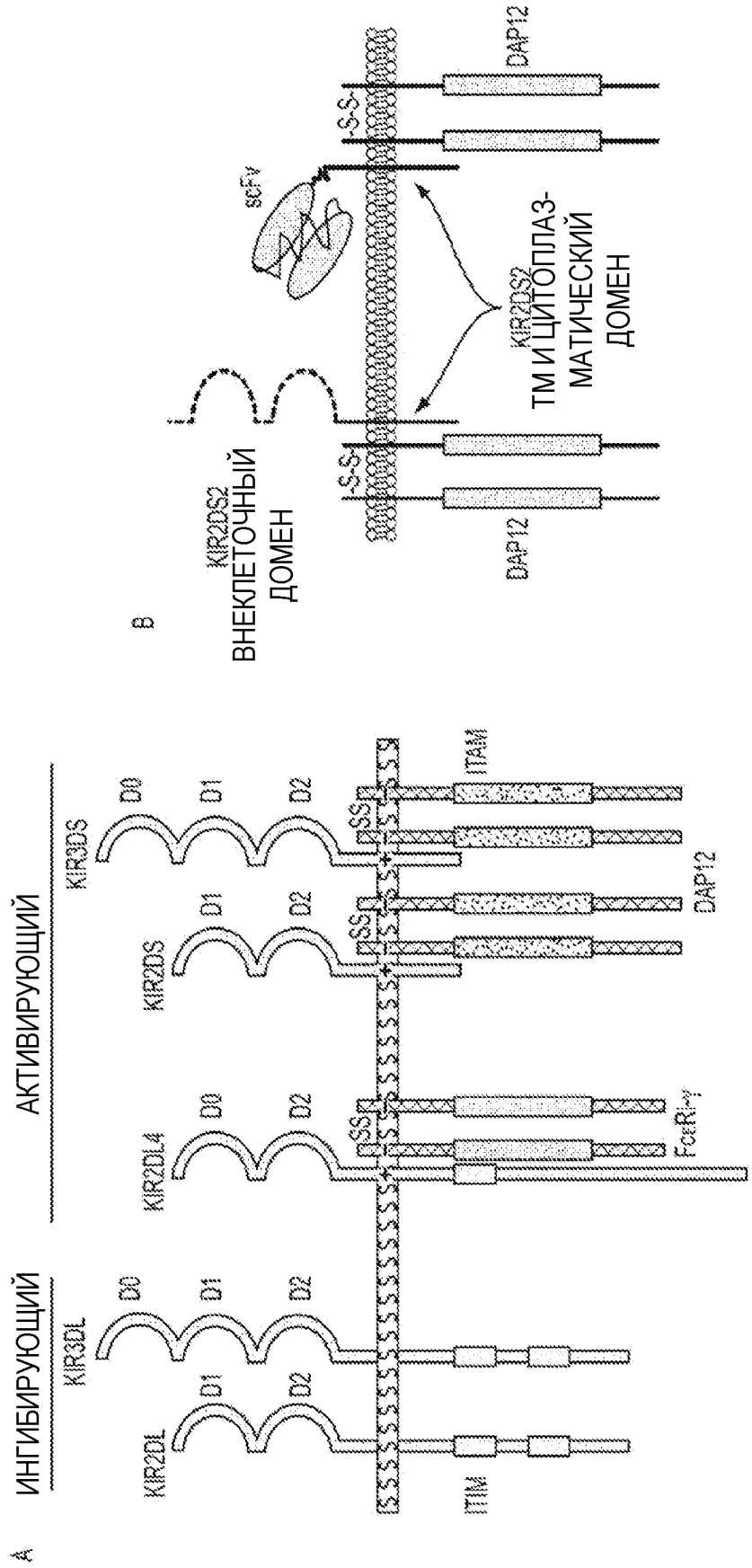
10. Способ получения цитотоксической клетки по п. 8, включающий введение в цитотоксическую клетку нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-6.

11. Цитотоксическая клетка по п.8, дополнительно содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую рецепторов хемокина CCR2b или CXCR2.

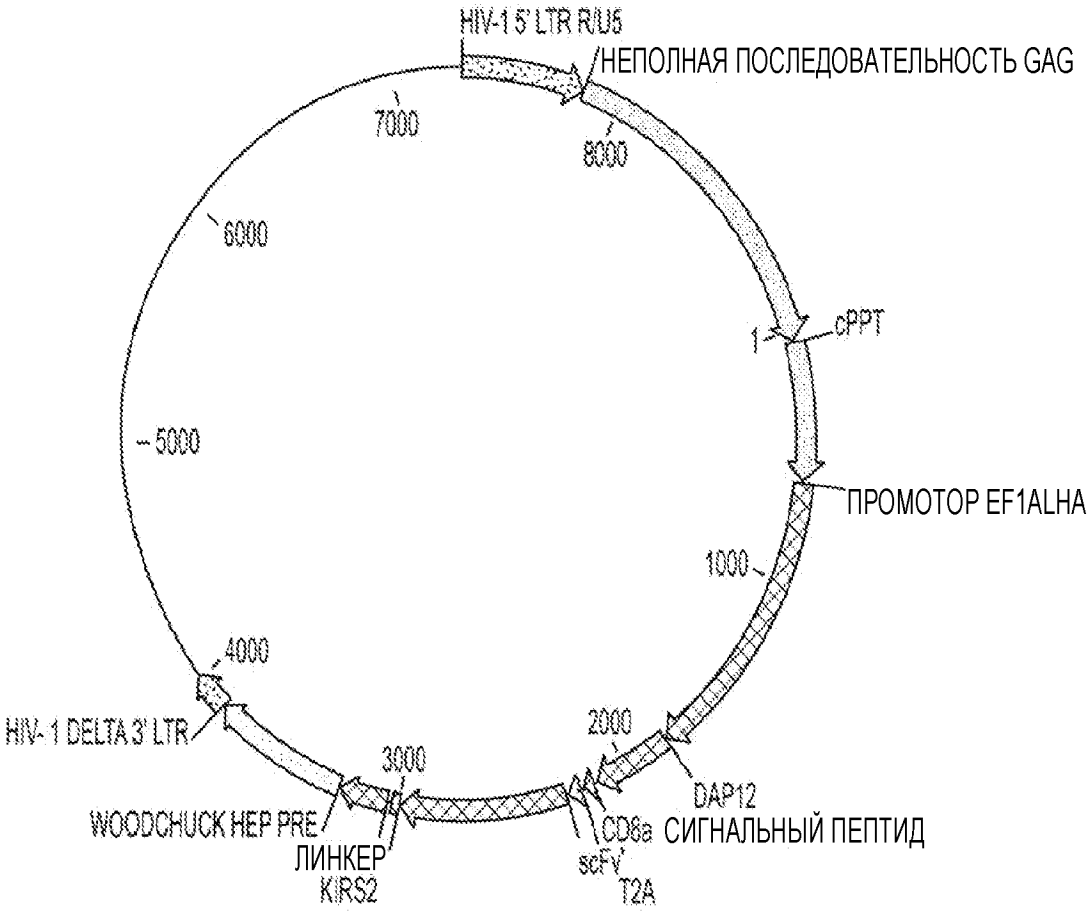
12. Генетически сконструированная Т-клетка, где эндогенный рецептор Т-клетки (TCR) в указанной Т-клетке инактивирован или является неактивным, и указанная Т-клетка содержит открытую рамку считывания, где открытая рамка считывания кодирует actKIR-CAR по п. 7 и регулируется actKIR-CAR, и, когда actKR-CAR

связывается с антигеном, может быть начата экспрессия открытой рамки считывания.

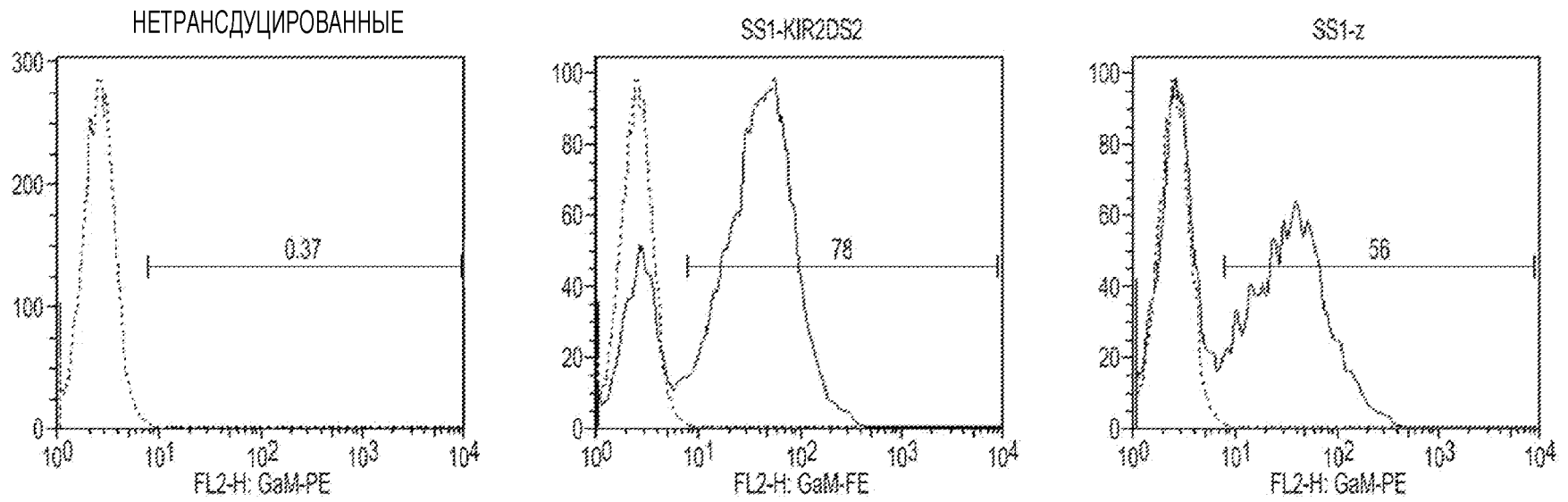
По доверенности


A
ИНГИБИРУЮЩИЙ
АКТИВИРУЮЩИЙ
KIR3DL
KIR2DL
KIR3DS
KIR2DS
KIR2DL4
D0
D1
D2
SS
ITIM
ITAM
DAP12
FcεRI-γ
B
KIR2DS2
ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ ДОМЕН
scFv
-S-S-
KIR2DS2
ТМ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ ДОМЕН
DAP12

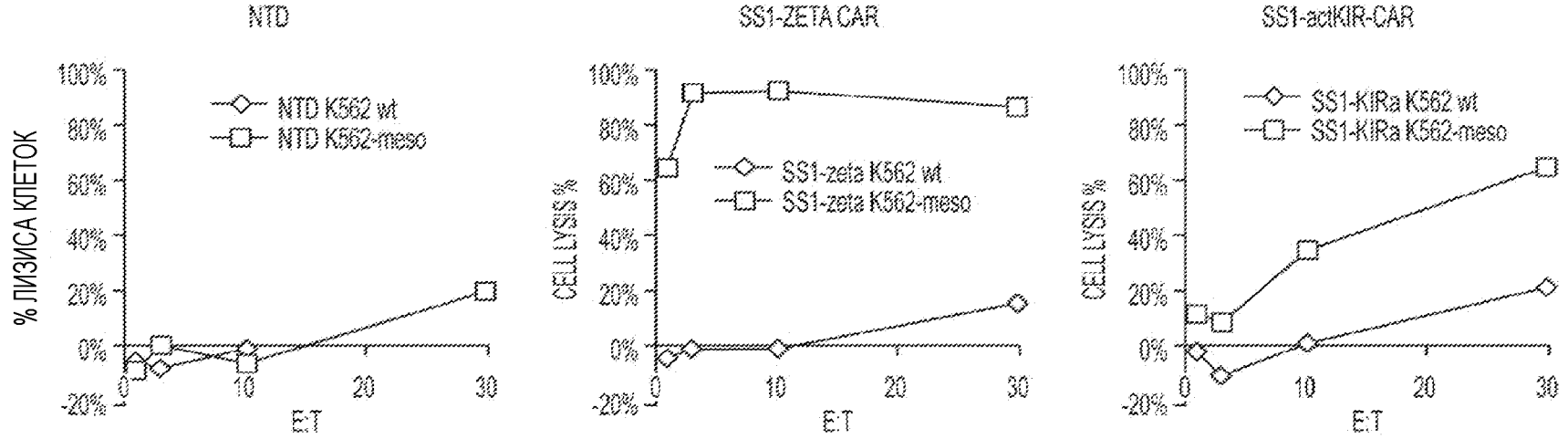
ФИГ. 1


HIV-1 5' LTR R/U5
НЕПОЛНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ GAG
7000
8000
6000
1
cPPT
5000
ПРОМОТОР EF1ALHA
1000
4000
2000
HIV-1 DELTA 3' LTR
3000
DAP12
WOODCHUCK HEP PRE
CD8a СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД
ЛИНКЕР
KIRS2
scFv
T2A

ФИГ. 2

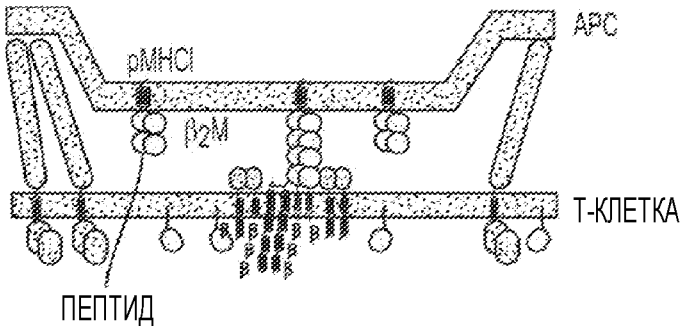

НЕТРАНСДУЦИРОВАННЫЕ
0.37
FL2-H: GaM-PE
SS1-KIR2DS2
78
FL2-H: GaM-FE
SS1-z
56
FL2-H: GaM-PE

ФИГ. 3


NTD
% ЛИЗИСА КЛЕТОК
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-20%
0
10
20
30
E:T
NTD K562 wt
NTD K562-meso
SS1-ZETA CAR
CELL LYSIS %
SS1-zeta K562 wt
SS1-zeta K562-meso
SS1-actKIR-CAR
SS1-KIRa K562 wt
SS1-KIRa K562-meso

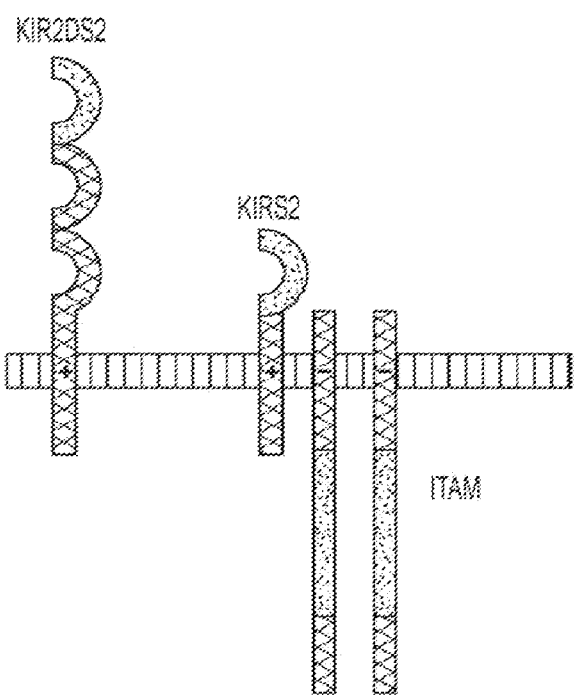
ФИГ. 4

A МОДЕЛЬ КИНЕТИЧЕСКОЙ СЕГРЕГА-
ЦИИ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА



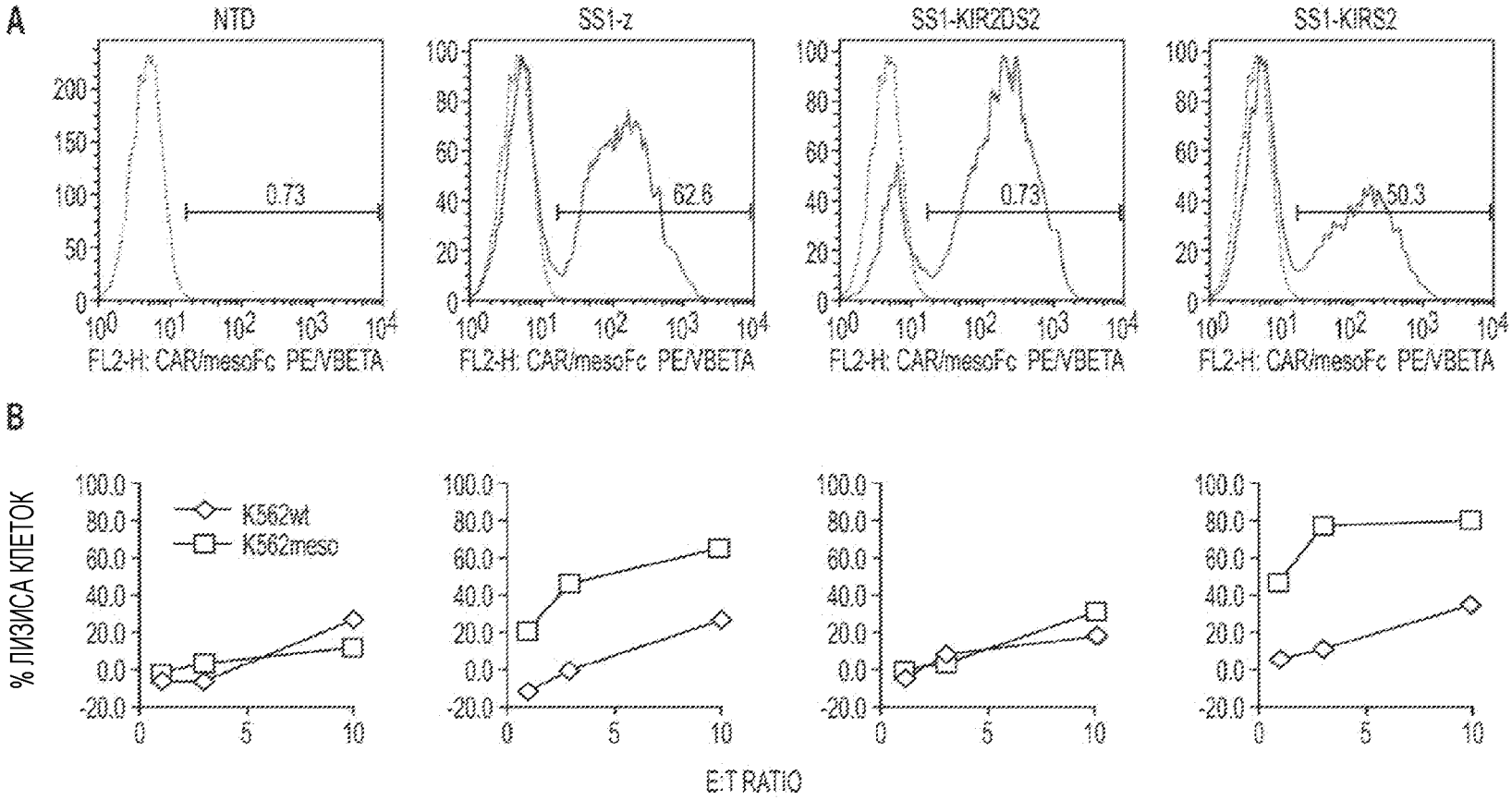
CHOUDHURI K. ET AL. NATURE 2005

B

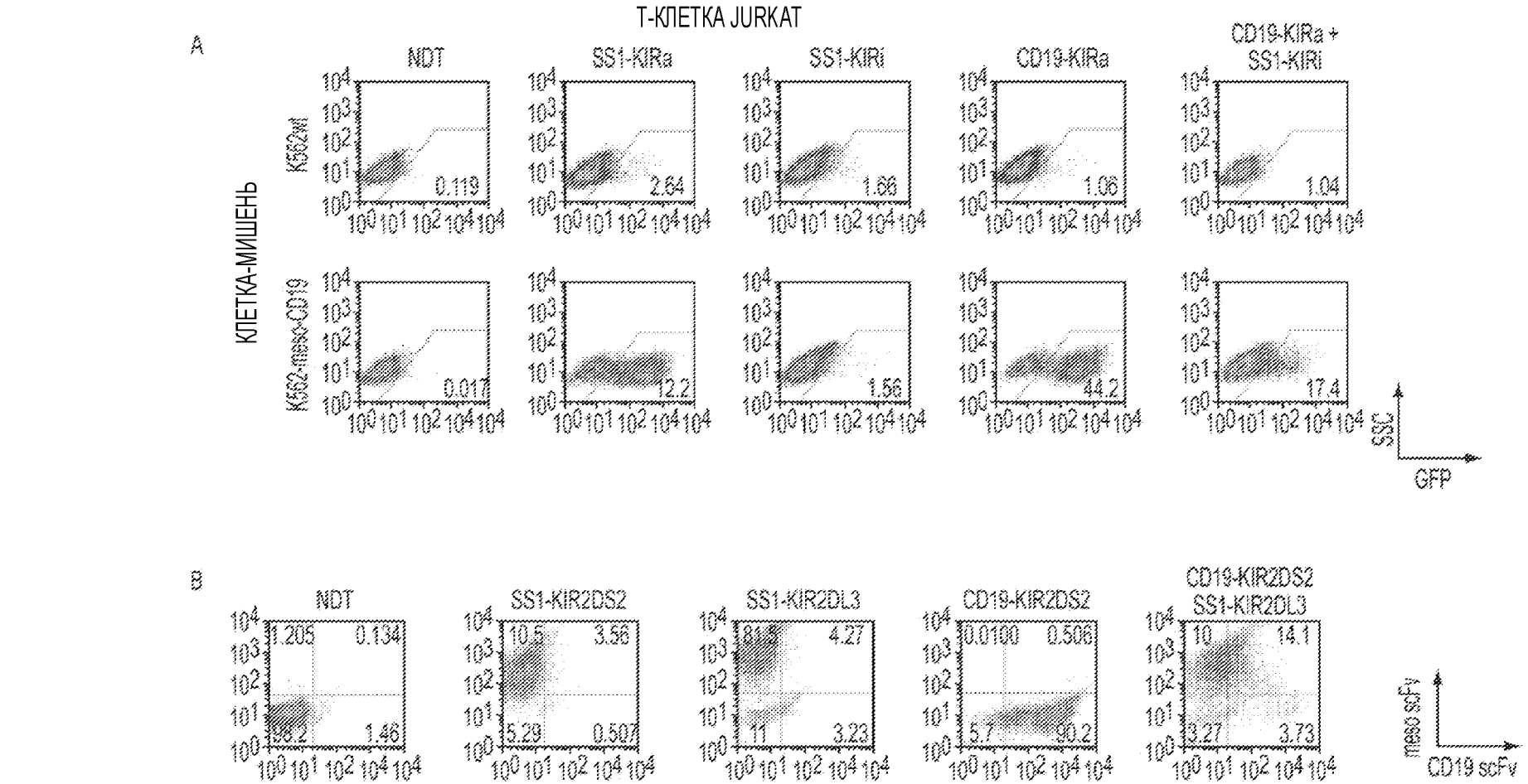


ОПТИМИЗАЦИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО К МЕЗОТЕЛИНУ KIR CAR
ПУТЕМ ИЗМЕНЕНИЯ ДЛИНЫ ЭКТОДОМЕНА РЕЦЕПТОРА

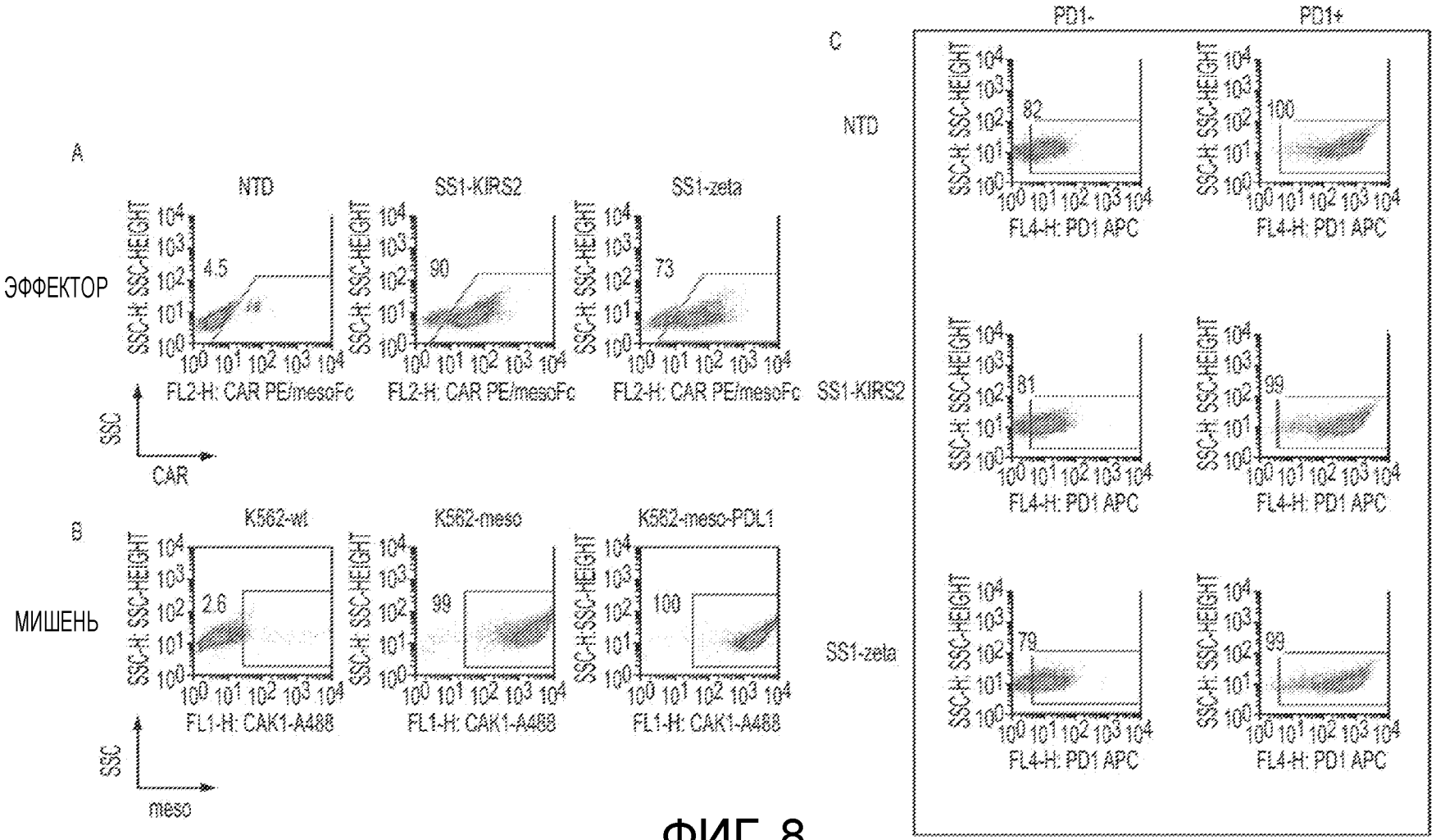
ФИГ. 5


A
NTD
SS1-z
SS1-KIR2DS2
SS1-KIRS2
0.73
62.6
0.73
50.3
FL2-H: CAR/mesoFc PE/VBETA
B
% ЛИЗИСА КЛЕТОК
K562wt
K562meso
E:T RATIO

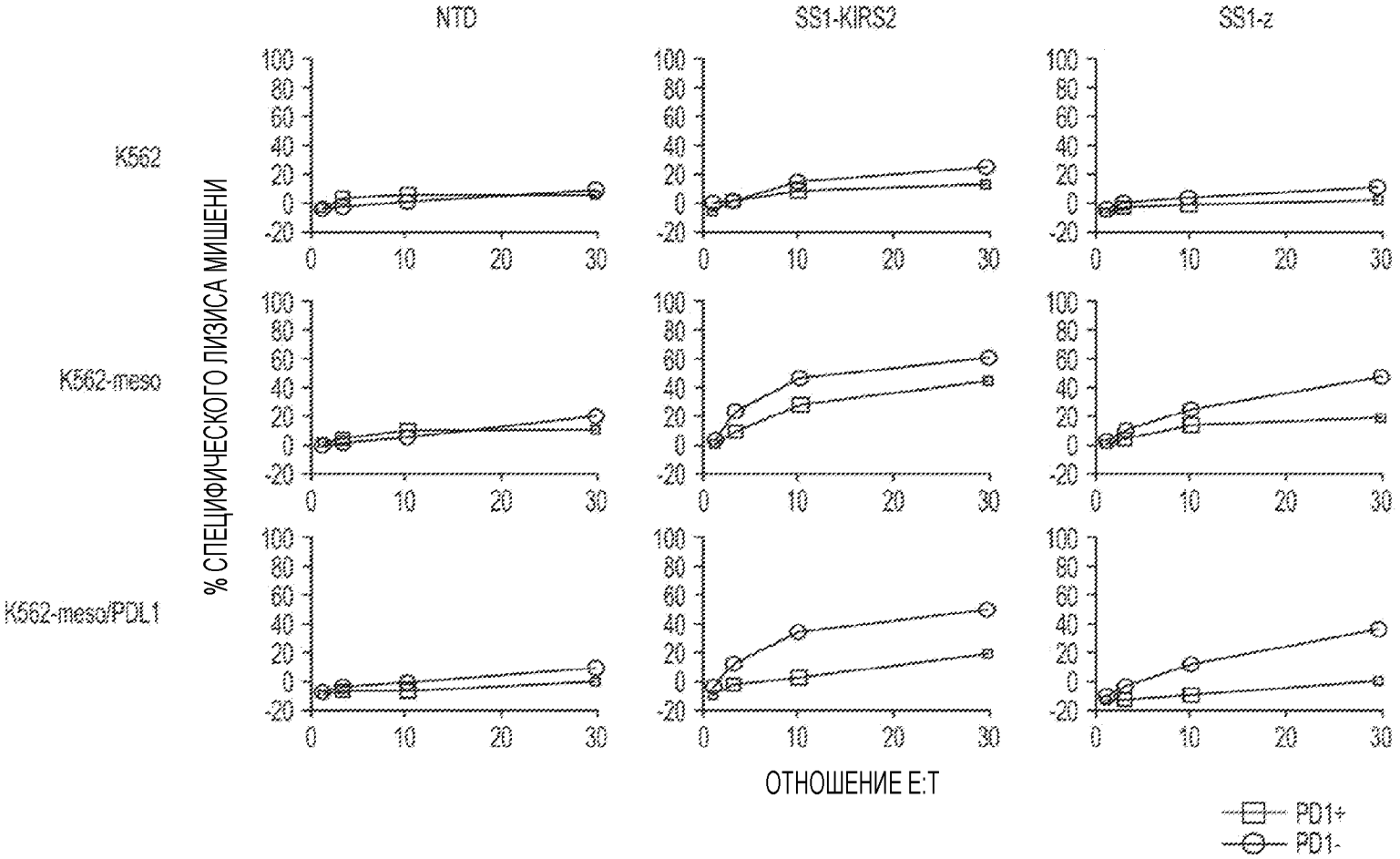
ФИГ. 6


A
T-КЛЕТКА JURKAT
КЛЕТКА-МИШЕНЬ
NDT
SS1-KIRa
SS1-KIRi
CD19-KIRa
CD19-KIRa + SS1-KIRi
K562wt
K562-mesoCD19
0.119
2.64
1.66
1.06
1.04
0.017
12.2
1.56
44.2
17.4
SSC
GFP
B
NDT
SS1-KIR2DS2
SS1-KIR2DL3
CD19-KIR2DS2
CD19-KIR2DS2 SS1-KIR2DL3
1.205
0.134
96.2
1.46
10.5
3.56
85.9
4.27
11
3.23
0.0100
0.506
5.7
90.2
10
14.1
3.27
3.73
meso scFv
CD19 scFv

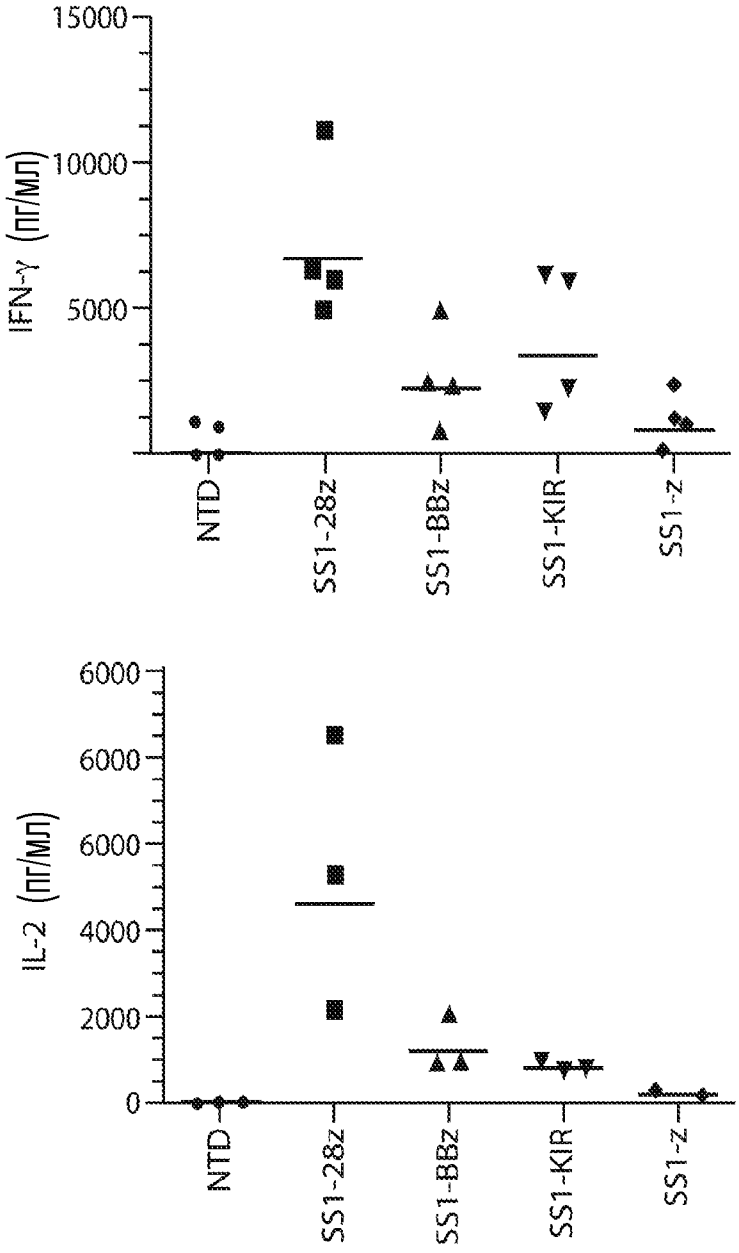
ФИГ. 7


A
NTD
SS1-KIRS2
SS1-zeta
ЭФФЕКТОР
SSC-H: SSC-HEIGHT
4.5
90
73
FL2-H: CAR PE/mesoFc
SSC
CAR
B
K562-wt
K562-meso
K562-meso-PDL1
МИШЕНЬ
2.6
99
100
FL1-H: CAK1-A488
meso
C
PD1-
PD1+
NTD
SS1-KIRS2
SS1-zeta
82
100
81
99
79
99
FL4-H: PD1 APC

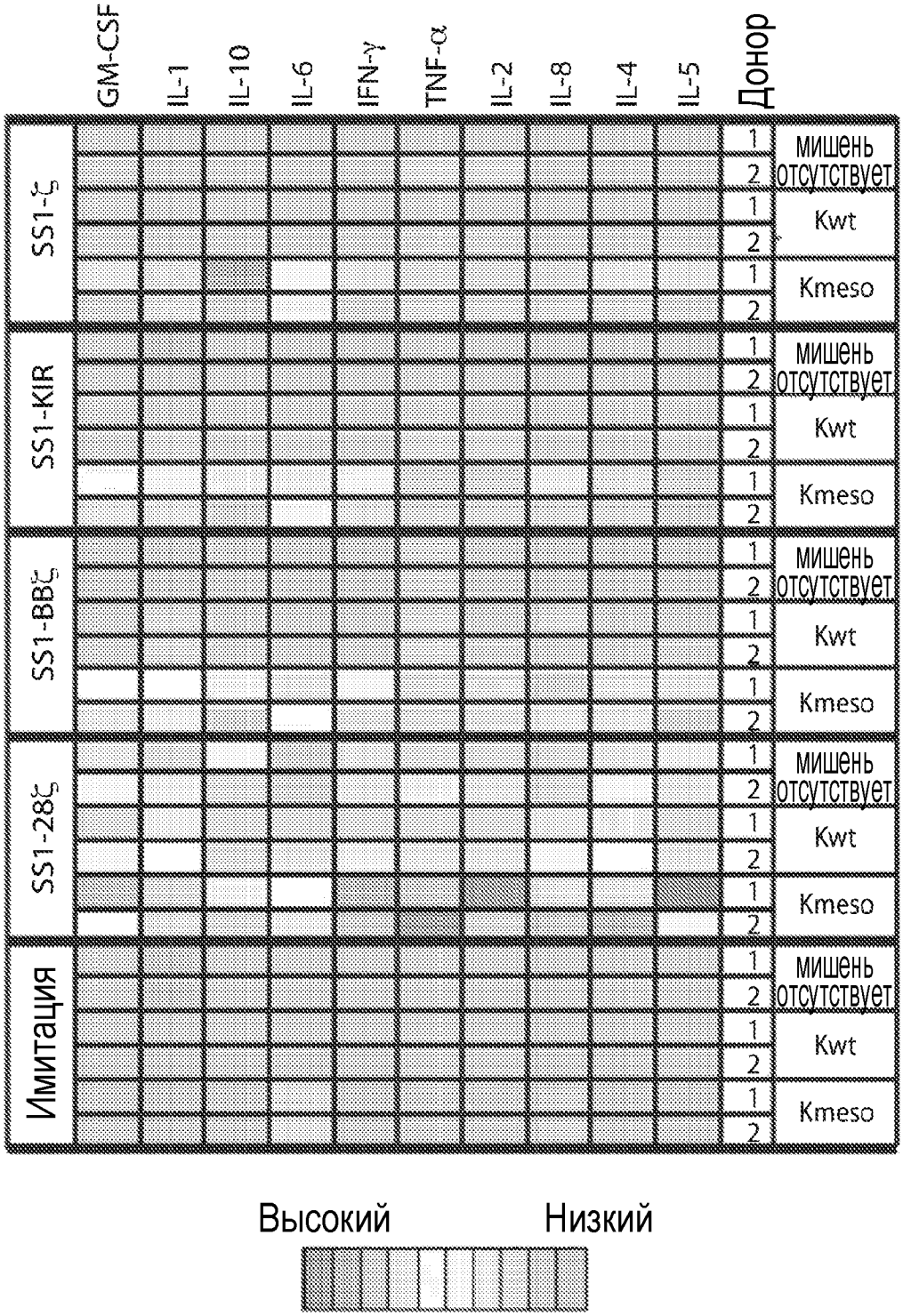
ФИГ. 8


NTD
SS1-KIRS2
SS1-z
K562
K562-meso
K562-meso/PDL1
% СПЕЦИФИЧЕСКОГО ЛИЗИСА МИШЕНИ
ОТНОШЕНИЕ E:T
PD1+
PD1-

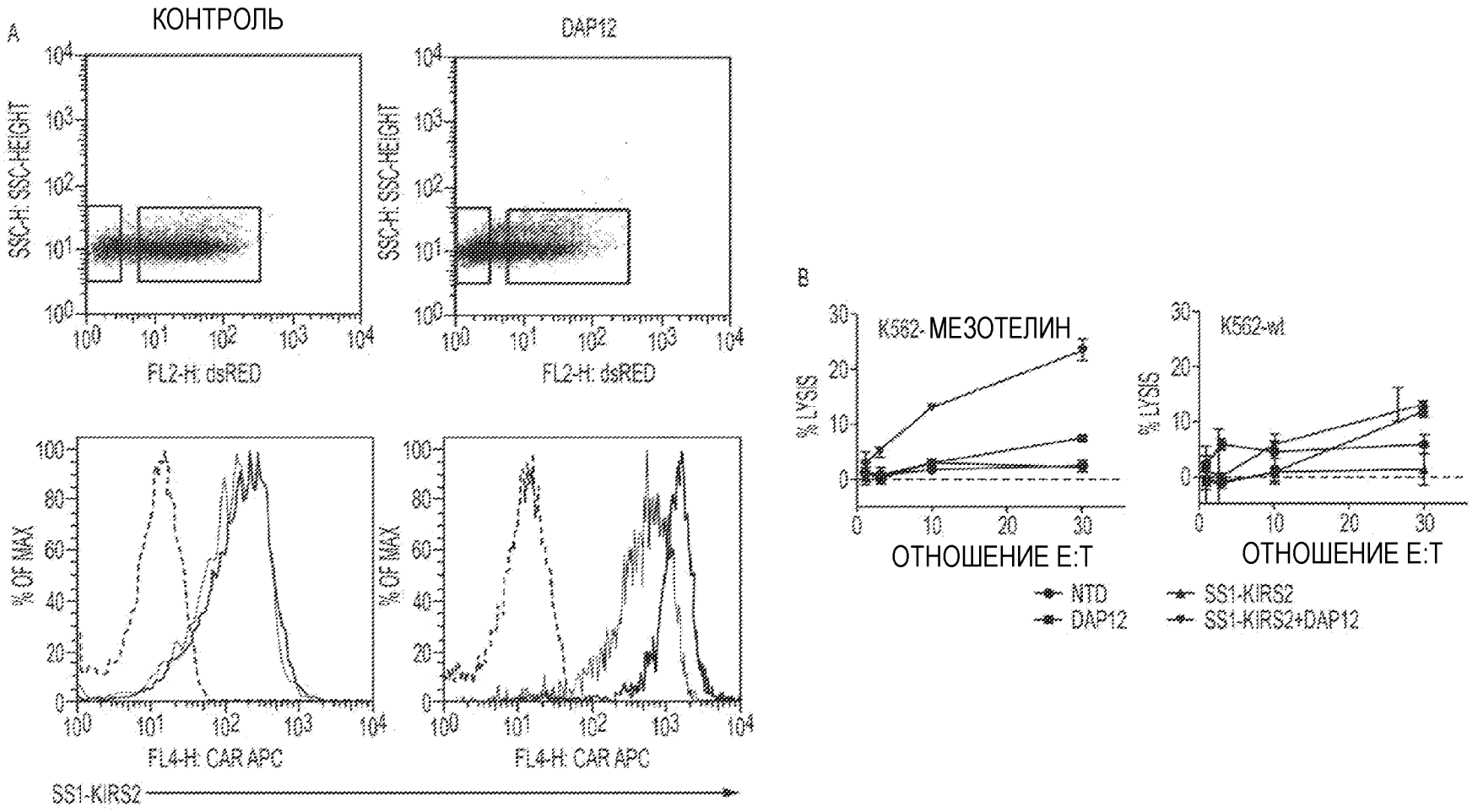
ФИГ. 9


15000
10000
5000
IFN-γ (пг/мл)
NTD
SS1-28z
SS1-BBz
SS1-KIR
SS1-z
6000
6000
6000
4000
2000
0
IL-2 (пг/мл)
NTD
SS1-28z
SS1-BBz
SS1-KIR
SS1-z

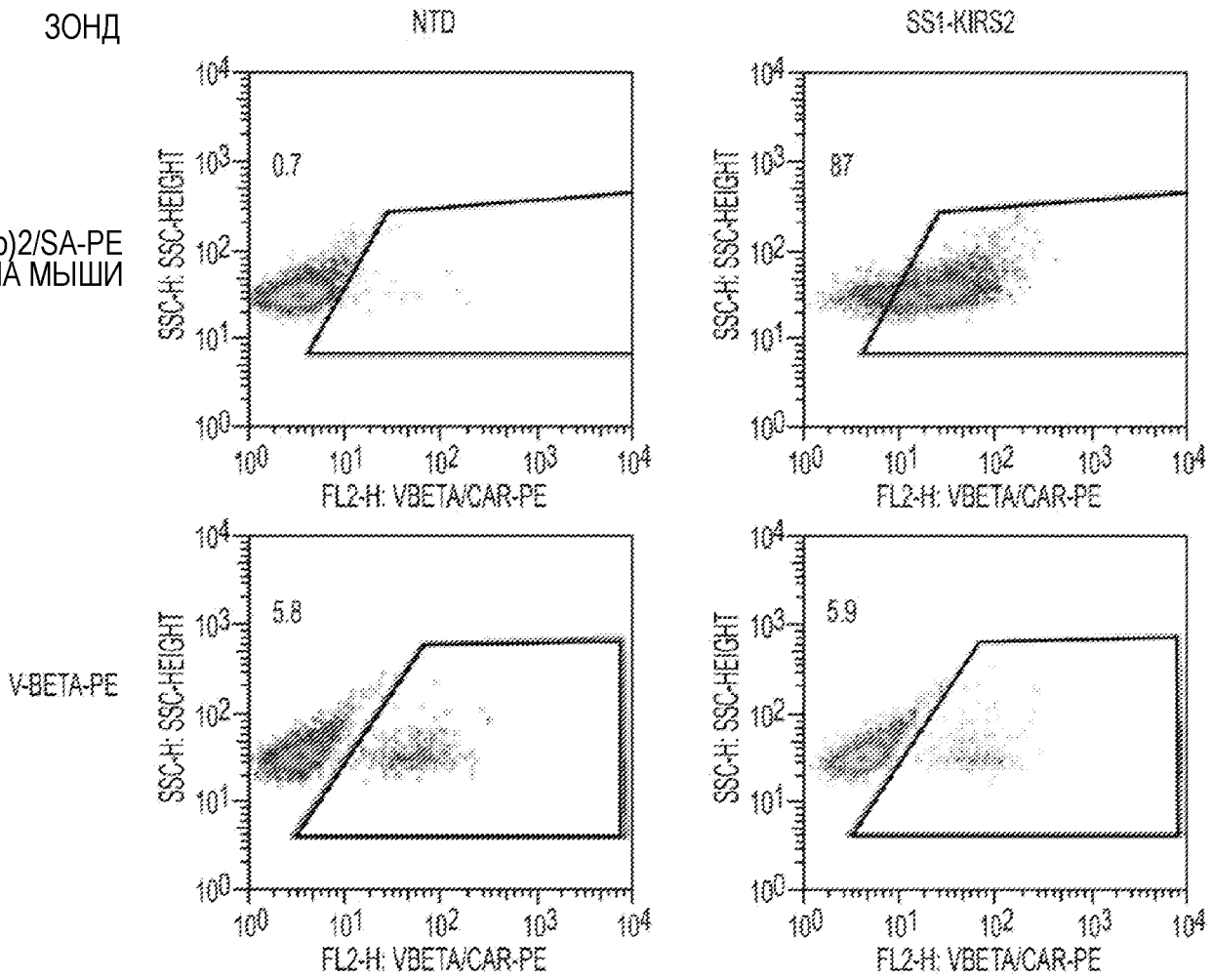
ФИГ. 10


GM-CSF
IL-1
IL-10
IL-6
IFN-γ
TNF-α
IL-2
IL-8
IL-4
IL-5
Донор
SS1-ζ
SS1-KIR
SS1-BBζ
SS1-28ζ
Имитация
1
2
мишень отсутствует
Kwt
Kmeso
Высокий
Низкий

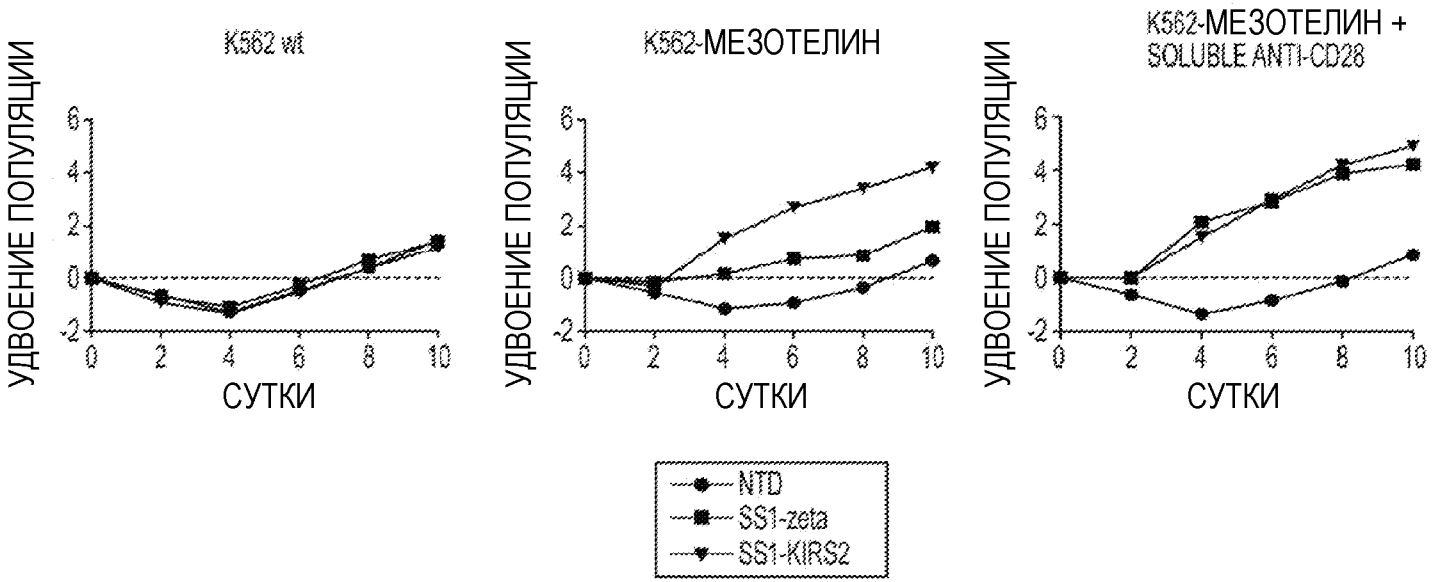
ФИГ. 11


A
КОНТРОЛЬ
DAP12
SSC-H: SSC-HEIGHT
FL2-H: dsRED
% OF MAX
FL4-H: CAR APC
SS1-KIRS2
B
K562- МЕЗОТЕЛИН
K562-wt
% LYSIS
ОТНОШЕНИЕ E:T
NTD
DAP12
SS1-KIRS2
SS1-KIRS2+DAP12

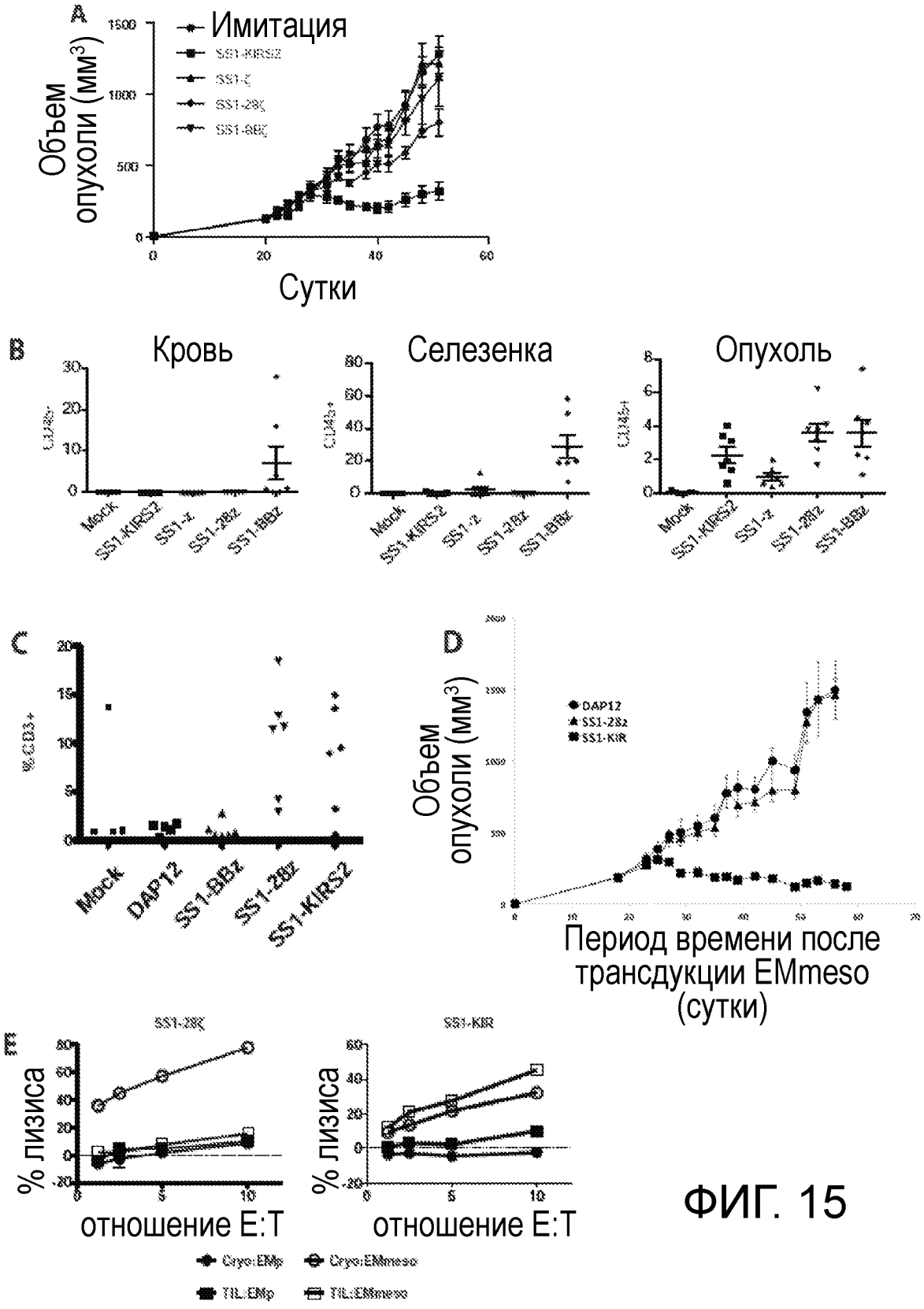
ФИГ. 12


ЗОНД
NTD
SS1-KIRS2
БИОТИНИЛИРОВАННЫЙ F(ab)2/SA-PE КОЗЫ ПРОТИВ АНТИТЕЛА МЫШИ
V-BETA-PE
SSC-H: SSC-HEIGHT
FL2-H: VBETA/CAR-PE
0.7
8.7
5.8
5.9

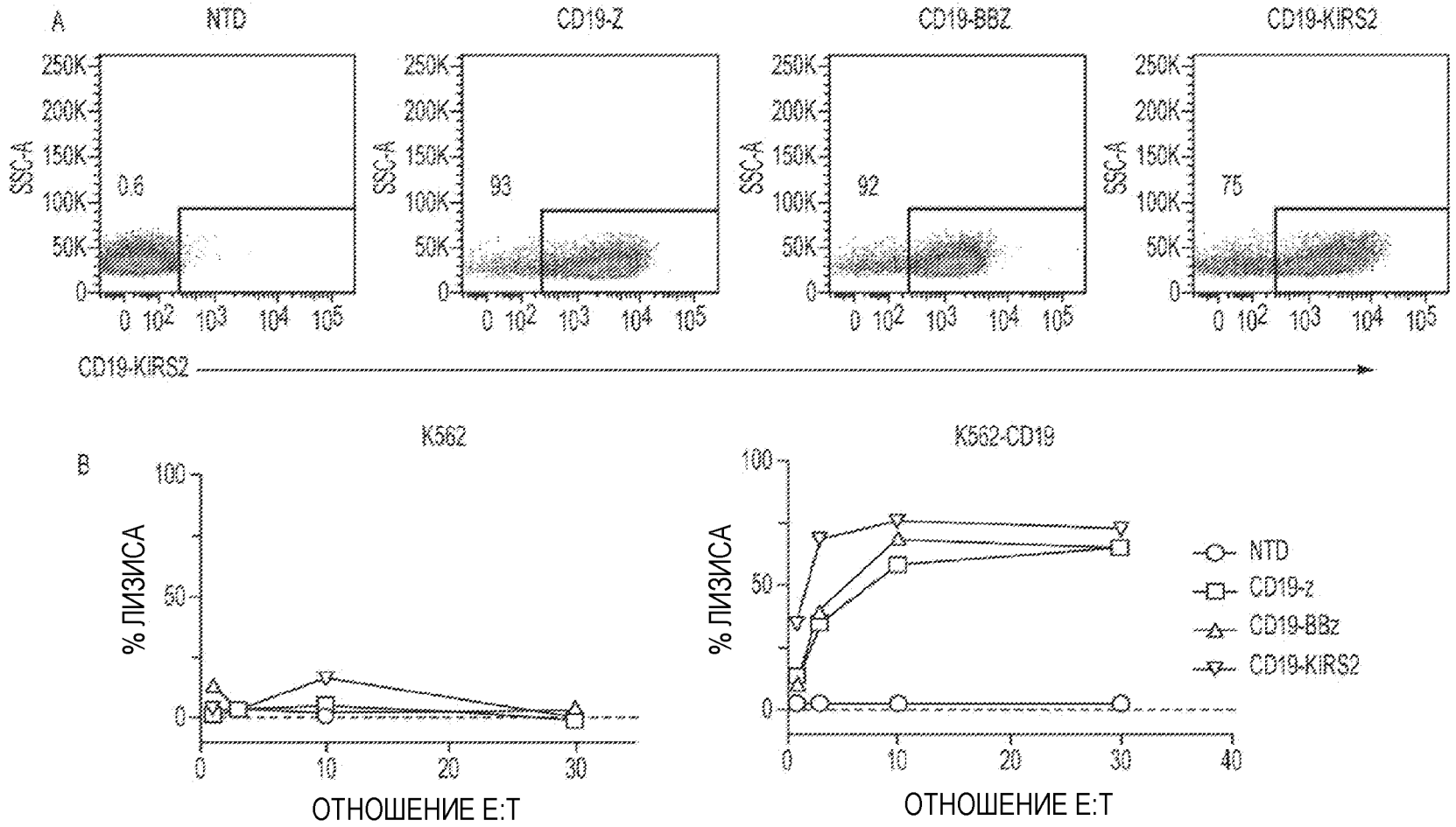
ФИГ. 13


K562 wt
K562-МЕЗОТЕЛИН
K562-МЕЗОТЕЛИН + SOLUBLE ANTI-CD28
УДВОЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ
СУТКИ
NTD
SS1-zeta
SS1-KIRS2

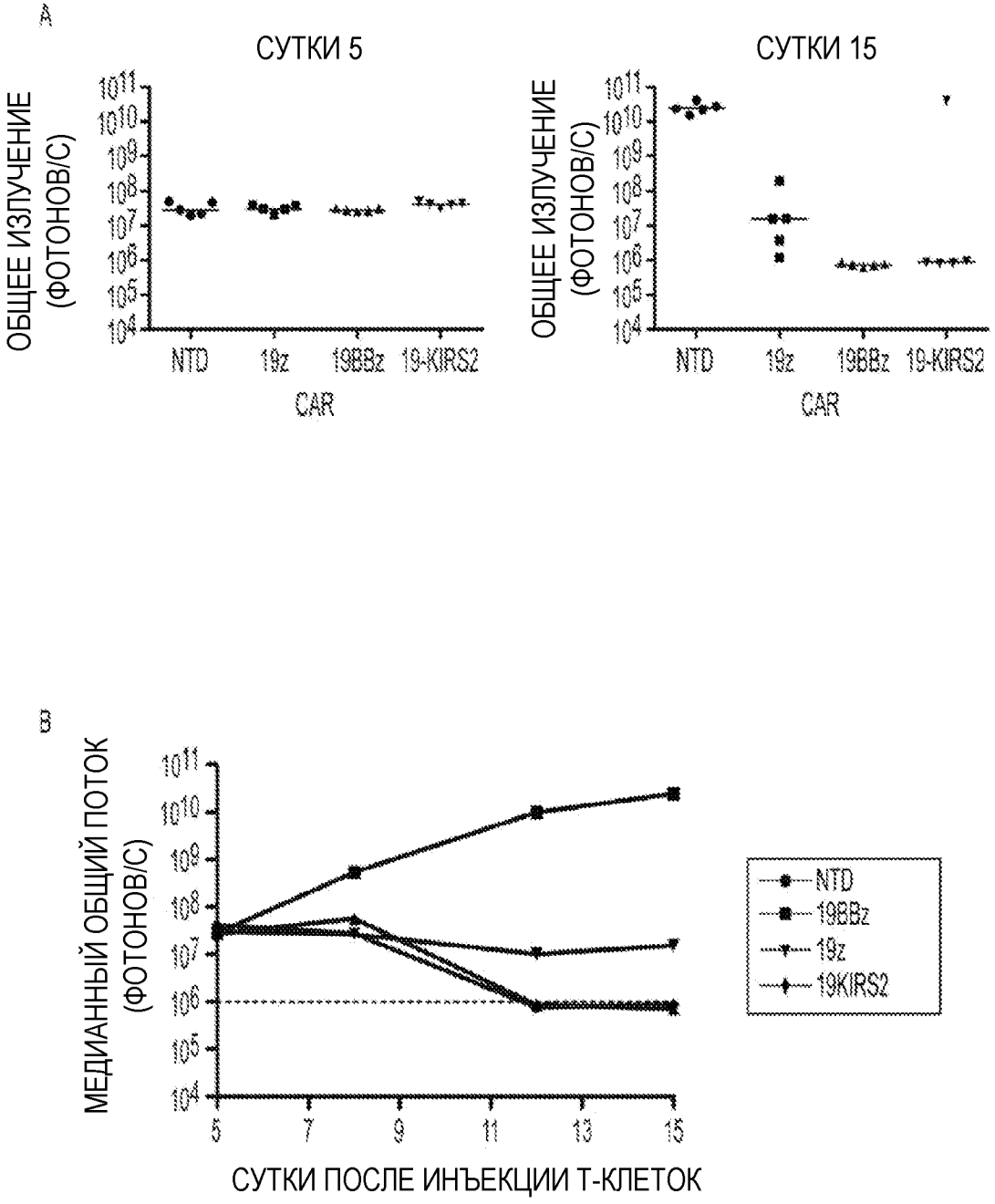
ФИГ. 14


A
Имитация
SS1-KIRS2
SS1-ζ
SS1-28ζ
SS1-BBζ
Объем опухоли (мм3)
Сутки
B
Кровь
Селезенка
Опухоль
Mock
SS1-KIRS2
SS1-ζ
SS1-28z
SS1-BBz
C
Mock
DAP12
SS1-BBz
SS1-28z
SS1-KIRS2
D
DAP12
SS1-28z
SS1-KIR
Объем опухоли (мм3)
Период времени после трансдукции EMmeso (сутки)
E
SS1-28ζ
SS1-KIR
% лизиса
отношение E:T
Cryo:EMp
Cryo:EMmeso
TIL:EMp
TIL:EMmeso

ФИГ. 15

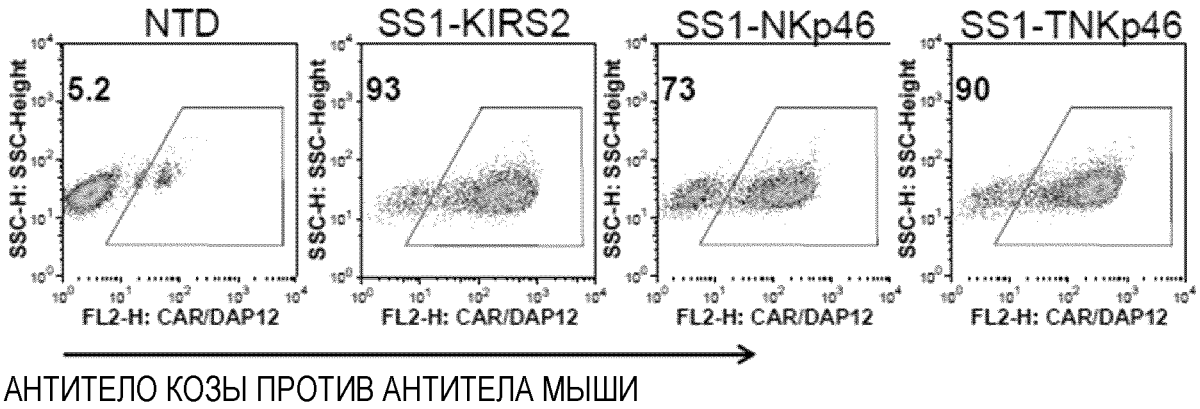

A
NTD
CD19-Z
CD19-BBZ
CD19-KIRS2
SSC-A
250K
200K
150K
100K
50K
0
0.6
93
92
75
0 10² 10³ 10⁴ 10⁵
CD19-KIRS2
B
K562
K562-CD19
% ЛИЗИСА
100
50
0
10
20
30
40
ОТНОШЕНИЕ E:T
NTD
CD19-z
CD19-BBz
CD19-KIRS2

ФИГ. 16

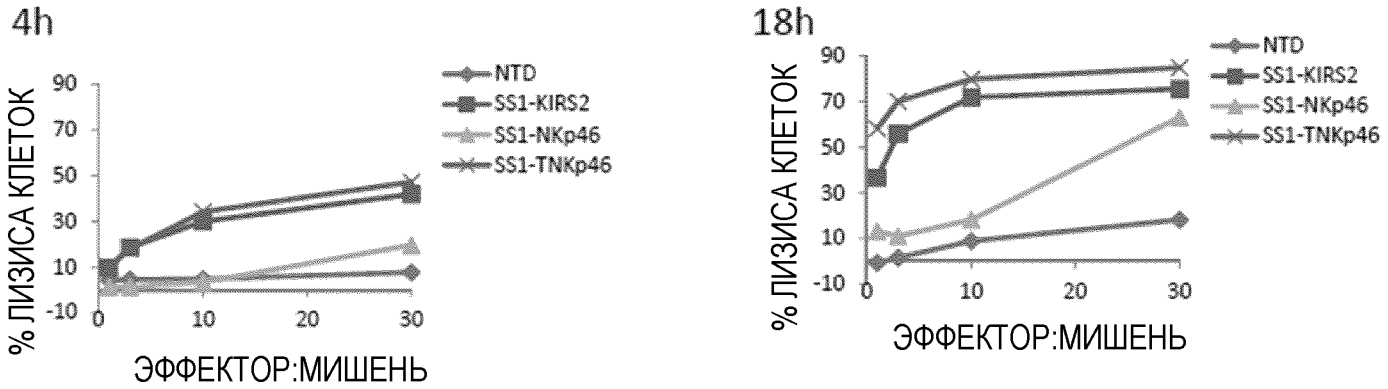

A
СУТКИ 5
СУТКИ 15
ОБЩЕЕ ИЗЛУЧЕНИЕ (ФОТОНОВ/С)
NTD
19z
19BBz
19-KIRS2
CAR
B
МЕДИАННЫЙ ОБЩИЙ ПОТОК (ФОТОНОВ/С)
СУТКИ ПОСЛЕ ИНЪЕКЦИИ Т-КЛЕТОК
NTD
19BBz
19z
19KIRS2

ФИГ. 17

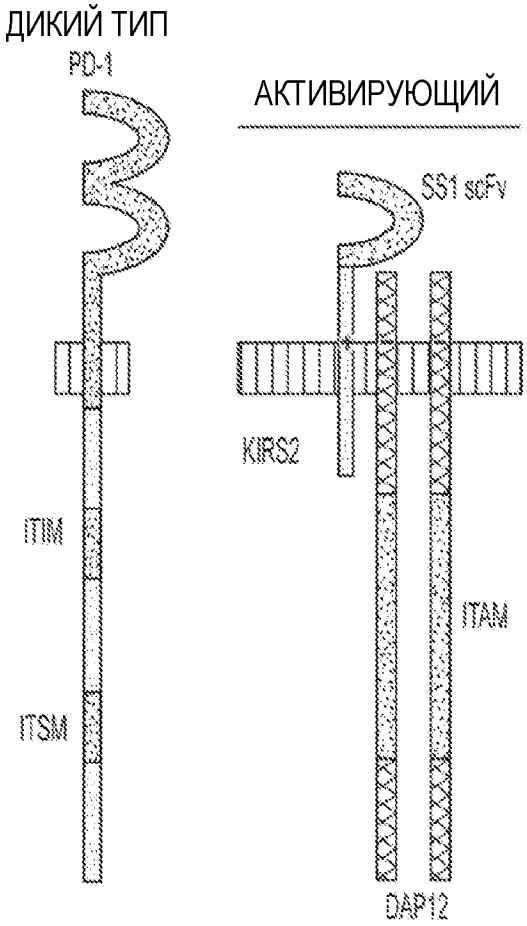
ФИГ. 18A



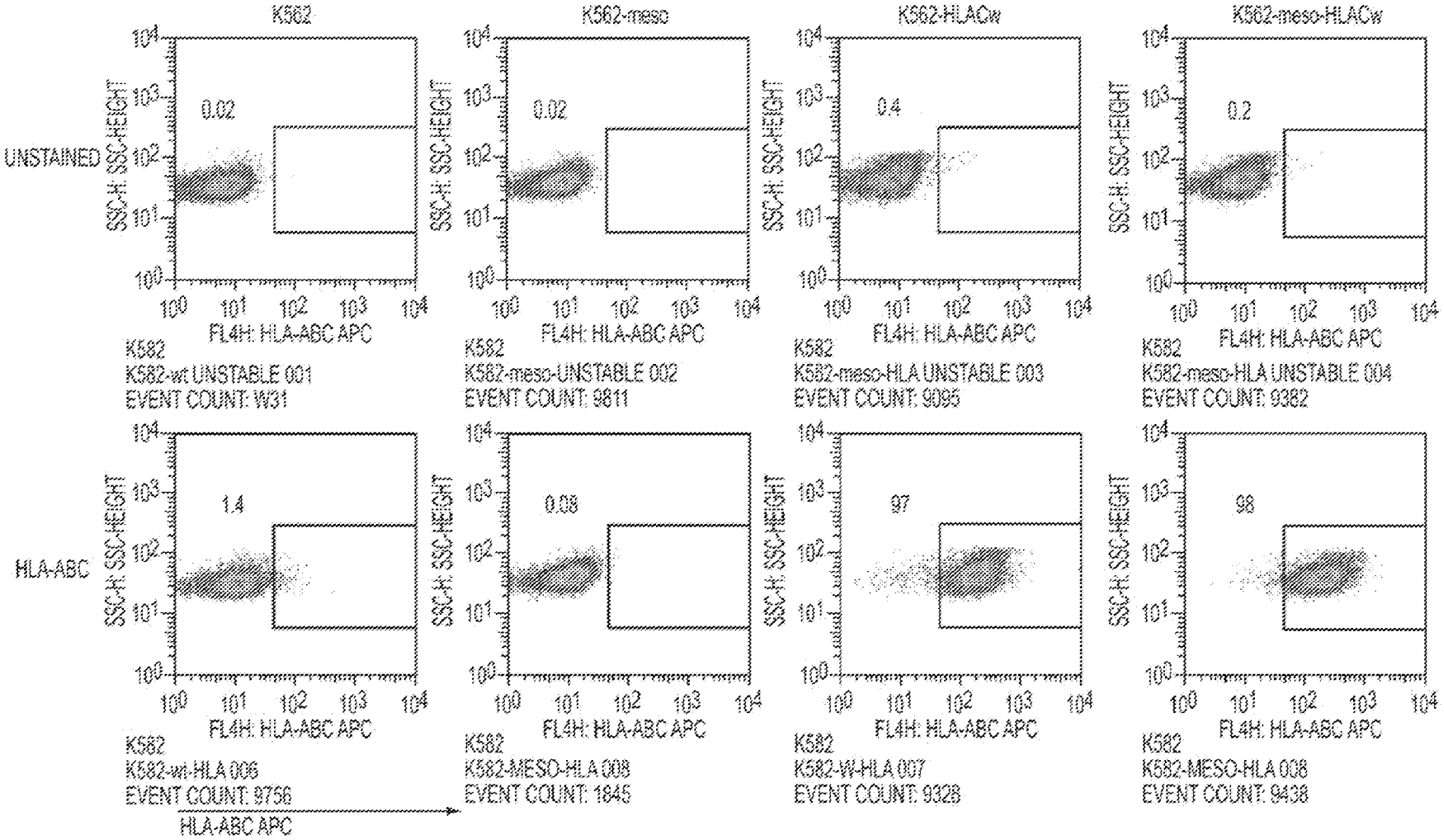
ФИГ. 18B



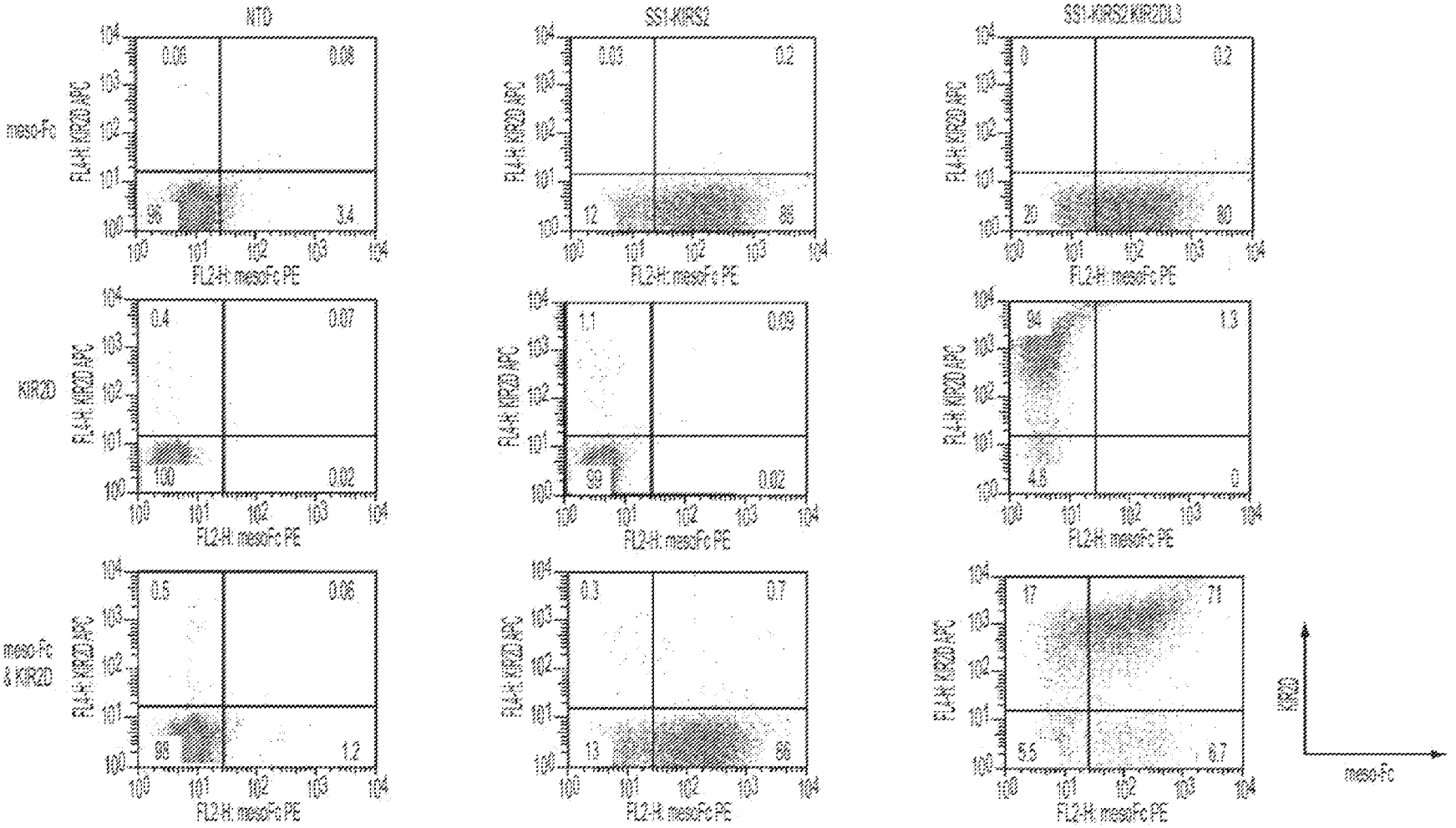
ИЗМЕНЕННАЯ СТРАНИЦА


ДИКИЙ ТИП
PD-1
ITIM
ITSM
АКТИВИРУЮЩИЙ
SS1 scFv
KIRS2
ITAM
DAP12

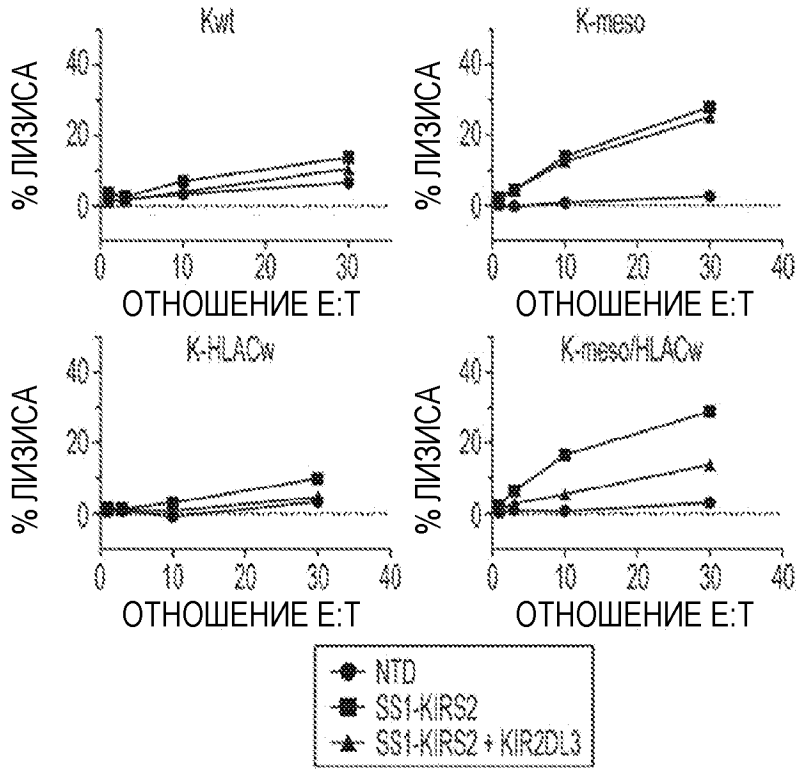
ФИГ. 19


K562
K562-meso
K562-HLACw
K562-meso-HLACw
UNSTAINED
HLA-ABC
SSC-H: SSC-HEIGHT
FL4H: HLA-ABC APC
0.02
0.02
0.4
0.2
1.4
0.08
97
98
K562
K562-wt UNSTABLE 001
EVENT COUNT: W31
K562
K562-meso-UNSTABLE 002
EVENT COUNT: 9811
K562
K562-meso-HLA UNSTABLE 003
EVENT COUNT: 9095
K562
K562-meso-HLA UNSTABLE 004
EVENT COUNT: 9382
K562
K562-wt-HLA 006
EVENT COUNT: 9756
K562
K562-MESO-HLA 008
EVENT COUNT: 1845
K562
K562-W-HLA 007
EVENT COUNT: 9328
K562
K562-MESO-HLA 008
EVENT COUNT: 9438
HLA-ABC APC

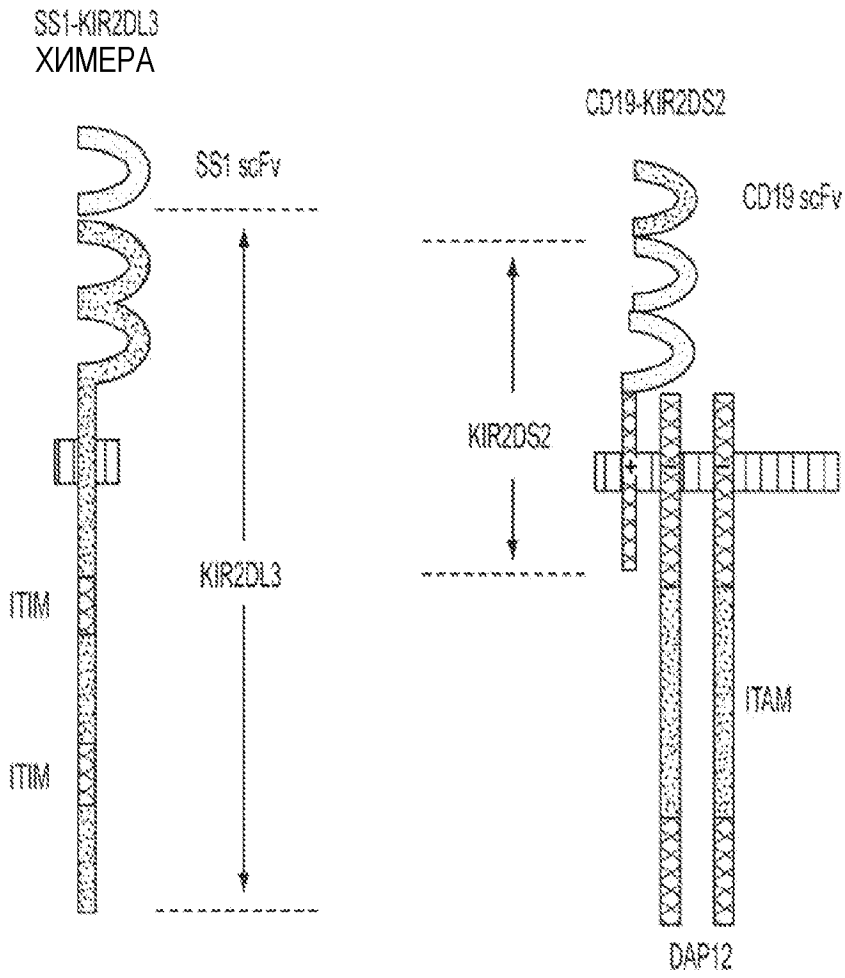
ФИГ. 20


NTD
SS1-KIR52
SS1-KIR52.KIR2DL3
meso-Fc
KIR2D
meso-Fc & KIR2D
FL4-H: KIR2D APC
FL2-H: mesoFc PE
0.06
0.06
96
3.4
0.03
0.2
12
86
0
0.2
20
80
0.4
0.07
100
0.02
1.1
0.06
99
0.02
94
1.3
4.6
0
0.5
0.06
96
1.2
0.3
0.7
13
86
17
71
5.5
6.7
KIR2D
meso-Fc

ФИГ. 21

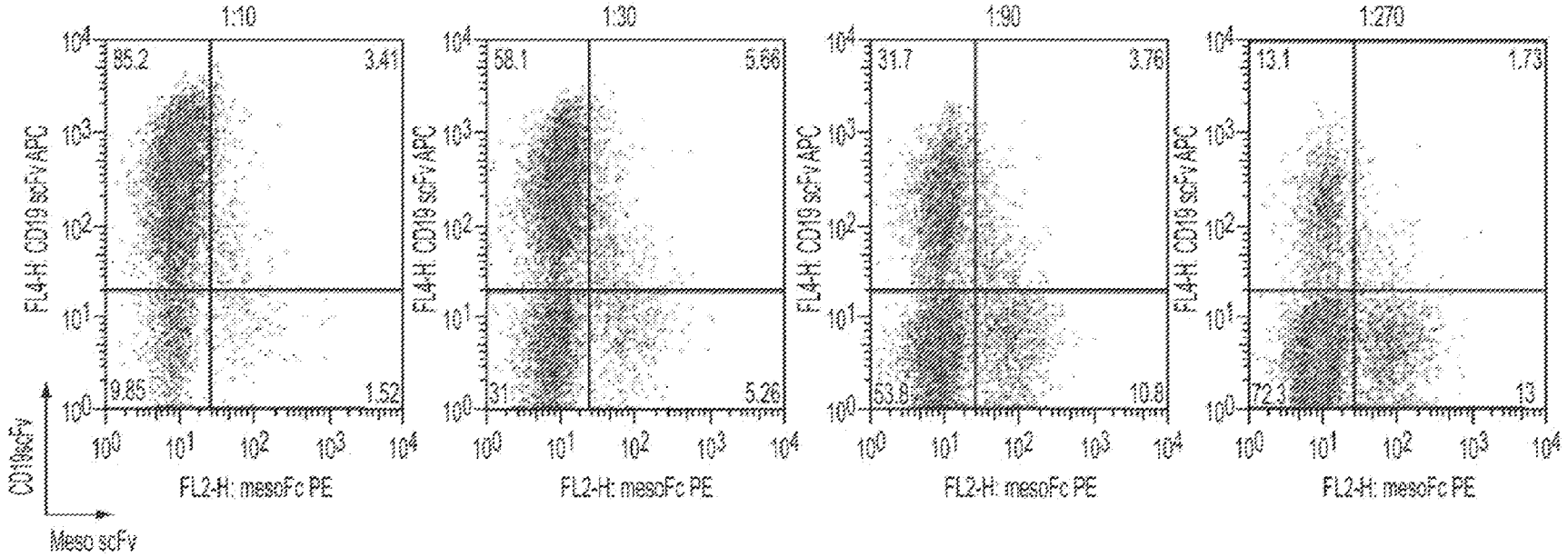

Kwt
K-meso
K-HLACw
K-meso/HLACw
% ЛИЗИСА
ОТНОШЕНИЕ E:T
0
10
20
30
40
NTD
SS1-KIRS2
SS1-KIRS2 + KIR2DL3

ФИГ. 22

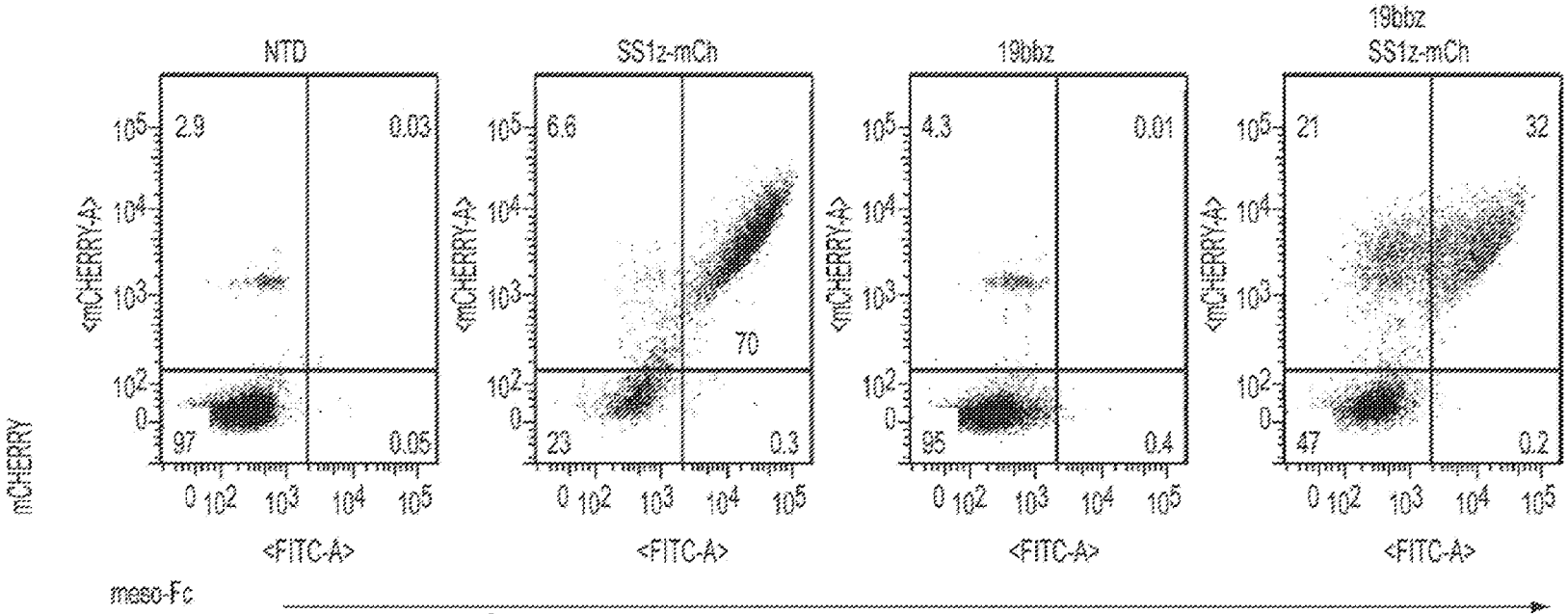

SS1-KIR2DL3
ХИМЕРА
SS1 scFv
KIR2DL3
ITIM
ITIM
CD19-KIR2DS2
CD19 scFv
KIR2DS2
ITAM
DAP12

ФИГ. 23

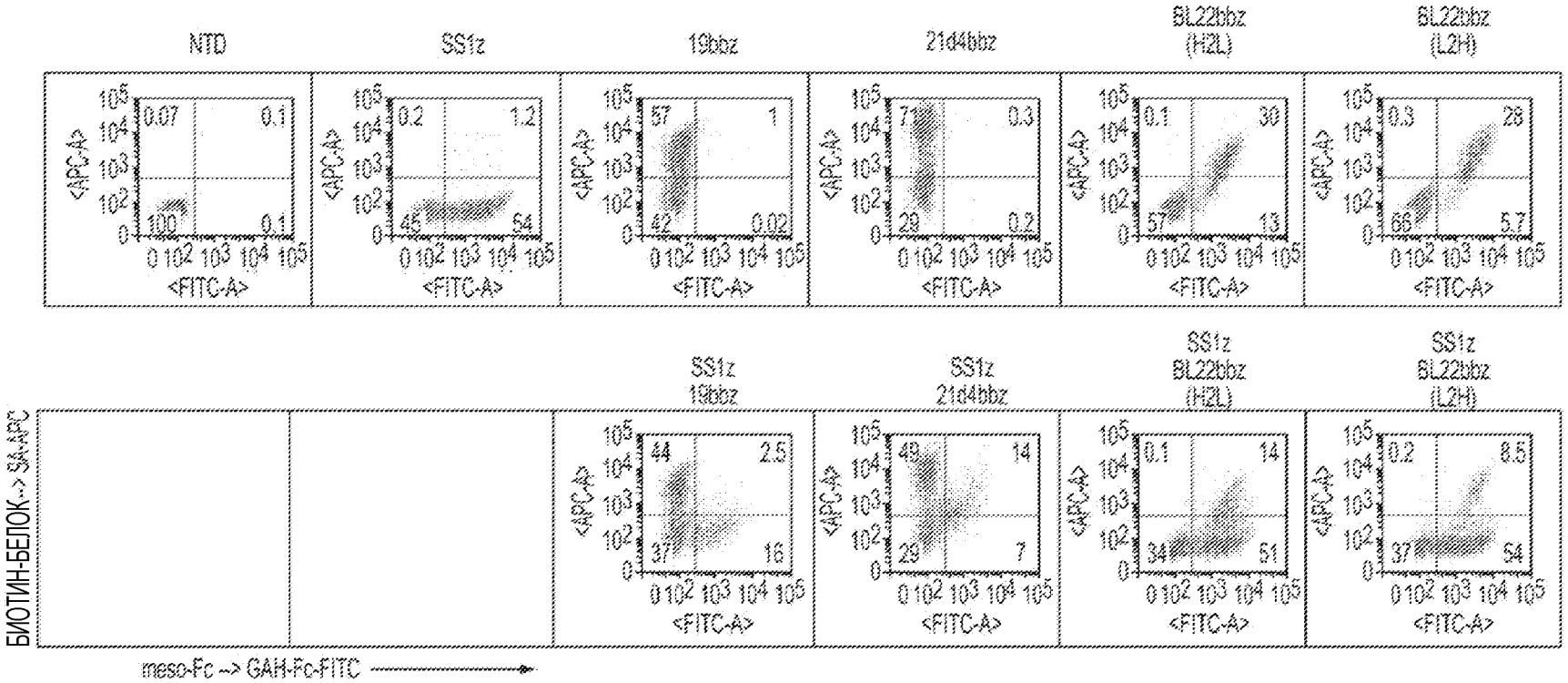
РАЗВЕДЕНИЯ ЛЕНТИВИРУСНОГО ВЕКТОРА CD19-KIR2DS2



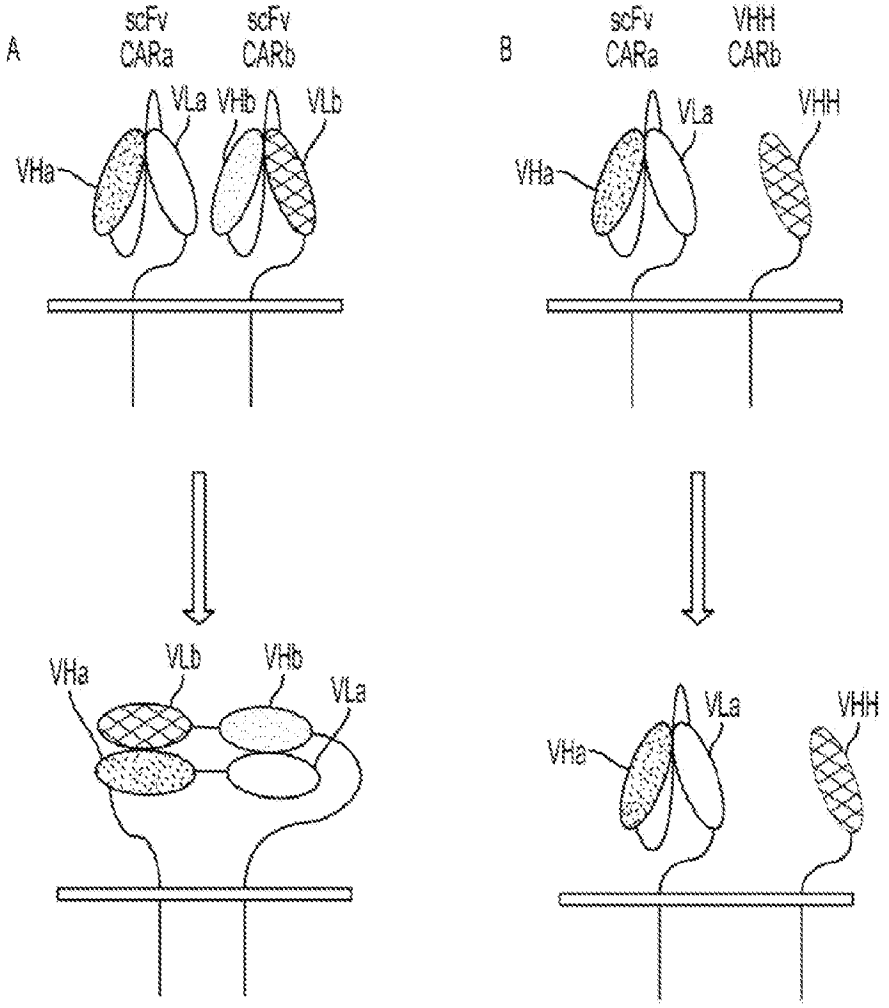
ФИГ. 24


NTD
SS1z-mCh
19bbz
19bbz
SS1z-mCh
<mCHERRY-A>
<FITC-A>
mCHERRY
meso-Fc
Антитело козы-Hu-FITC
2.9
0.03
97
0.05
6.6
70
23
0.3
4.3
0.01
95
0.4
21
32
47
0.2

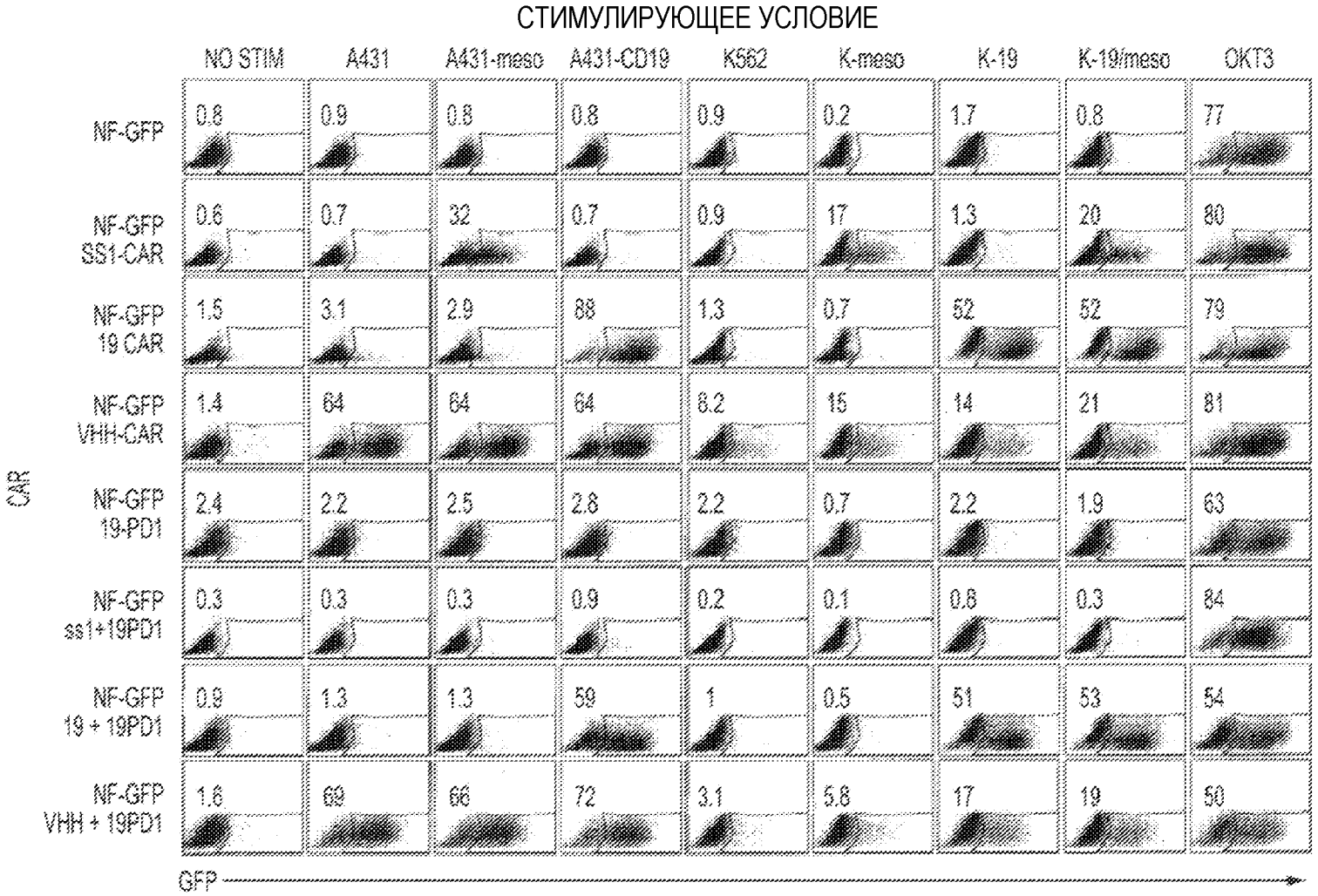
ФИГ. 25


NTD
SS1z
19bbz
21d4bbz
BL22bbz (H2L)
BL22bbz (L2H)
SS1z 19bbz
SS1z 21d4bbz
SS1z BL22bbz (H2L)
SS1z BL22bbz (L2H)
БИОТИН-БЕЛОК--> SA-APC
meso-Fc --> GAH-Fc-FITC
<APC-A>
<FITC-A>
0.07
0.1
100
0.1
0.2
1.2
45
54
57
1
42
0.02
71
0.3
29
0.2
0.1
30
57
13
0.3
28
66
5.7
44
2.5
37
16
49
14
29
7
0.1
14
34
51
0.2
8.5
37
54

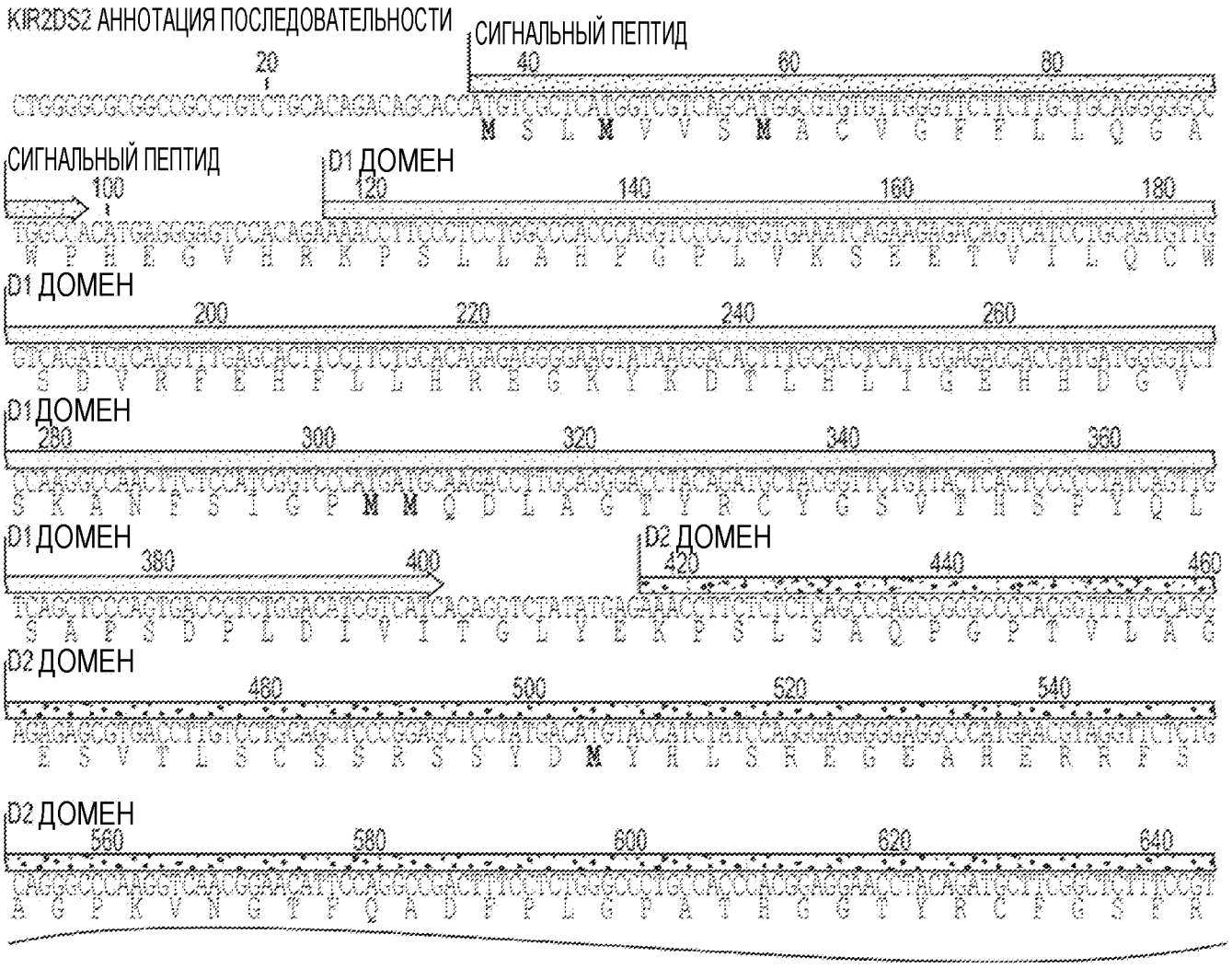
ФИГ. 26


A
scFv
CARa
scFv
CARb
VLa
VHb
VLb
VHa
B
scFv
CARa
VHH
CARb
VLa
VHH
VHa
VHa
VLb
VHb
VLa
VLa
VHH
VHa

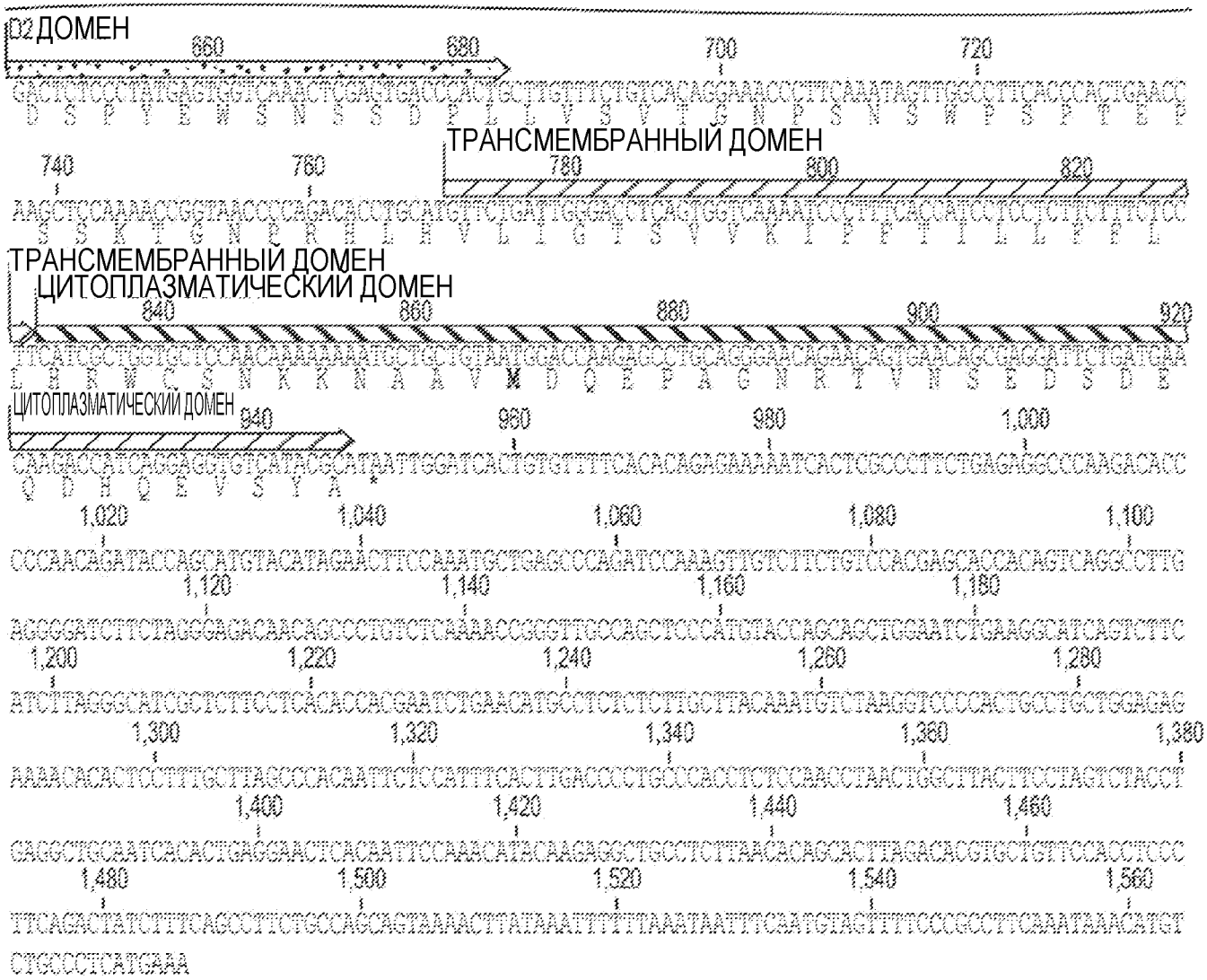
ФИГ. 27


СТИМУЛИРУЮЩЕЕ УСЛОВИЕ
NO STIM
A431
A431-meso
A431-CD19
K562
K-meso
K-19
K-19/meso
OKT3
CAR
NF-GFP
0.8
0.9
0.8
0.8
0.9
0.2
1.7
0.8
77
NF-GFP SS1-CAR
0.6
0.7
32
0.7
0.9
17
1.3
20
80
NF-GFP 19 CAR
1.5
3.1
2.9
88
1.3
0.7
52
52
79
NF-GFP VHH-CAR
1.4
64
64
64
8.2
15
14
21
81
NF-GFP 19-PD1
2.4
2.2
2.5
2.8
2.2
0.7
2.2
1.9
63
NF-GFP ss1+19PD1
0.3
0.3
0.3
0.9
0.2
0.1
0.8
0.3
84
NF-GFP 19 + 19PD1
0.9
1.3
1.3
59
1
0.5
51
53
54
NF-GFP VHH + 19PD1
1.6
69
66
72
3.1
5.8
17
19
50
GFP

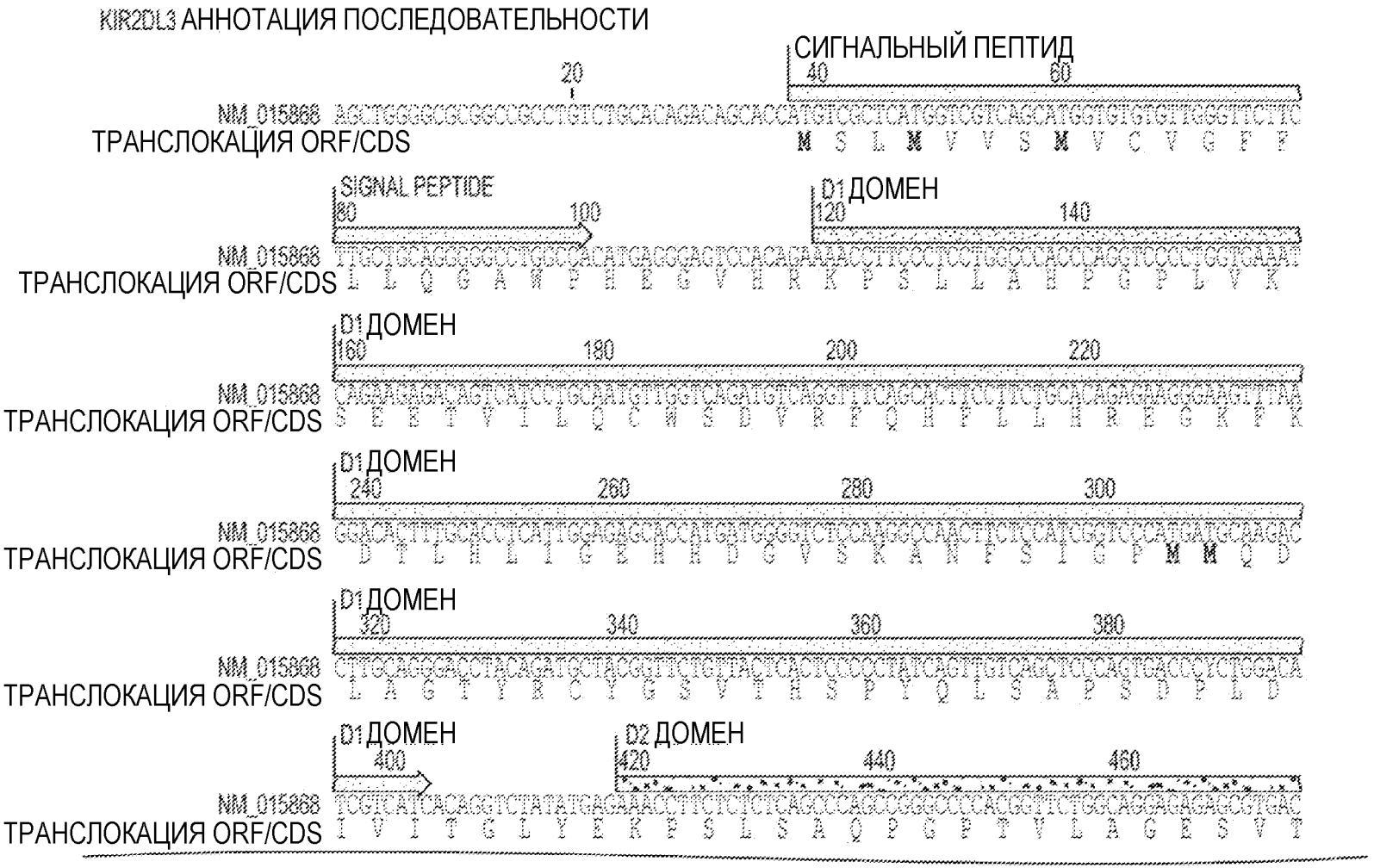
ФИГ. 28


KIR2DS2 АННОТАЦИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД
D1 ДОМЕН
D2 ДОМЕН

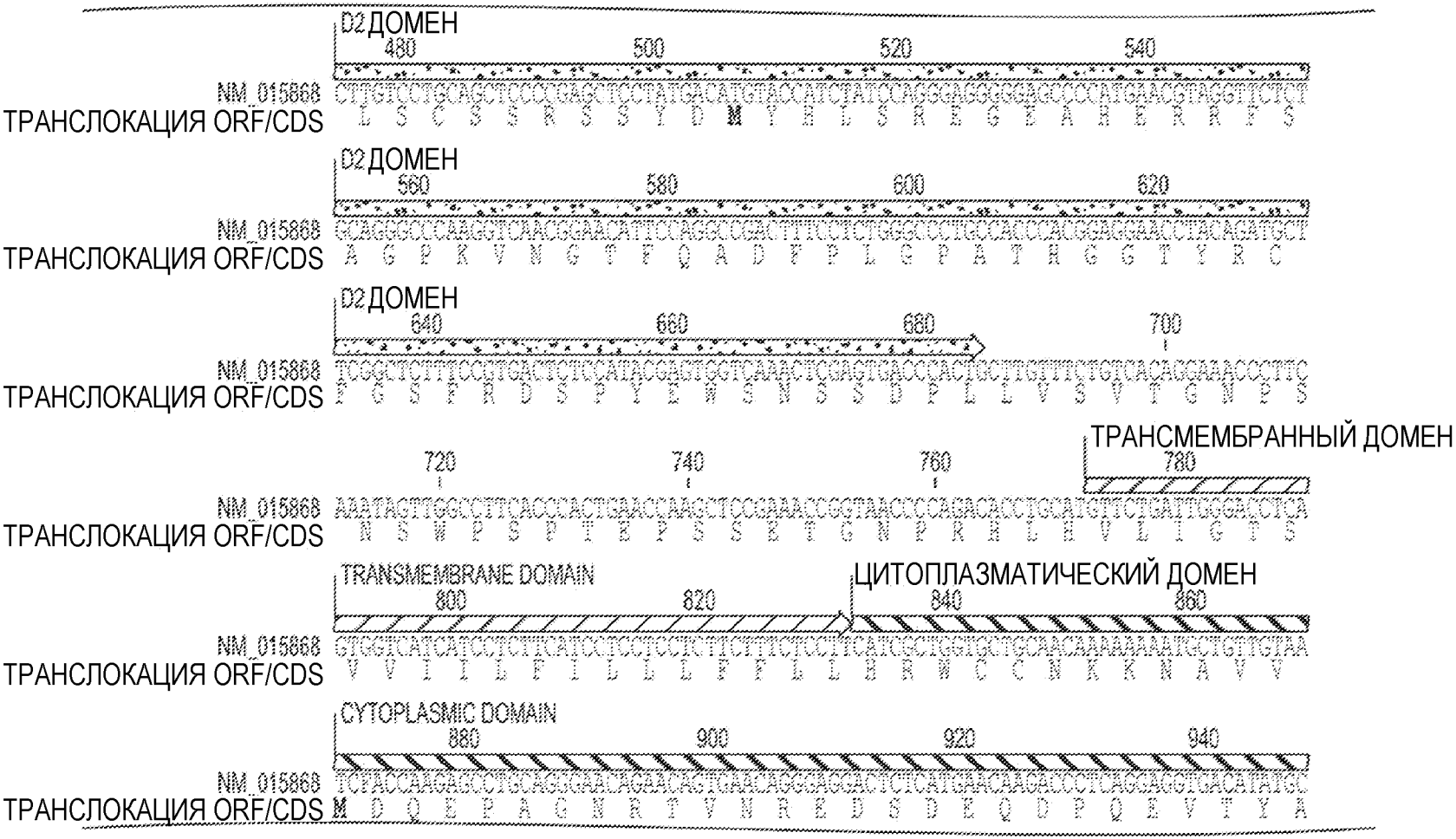
ФИГ. 29



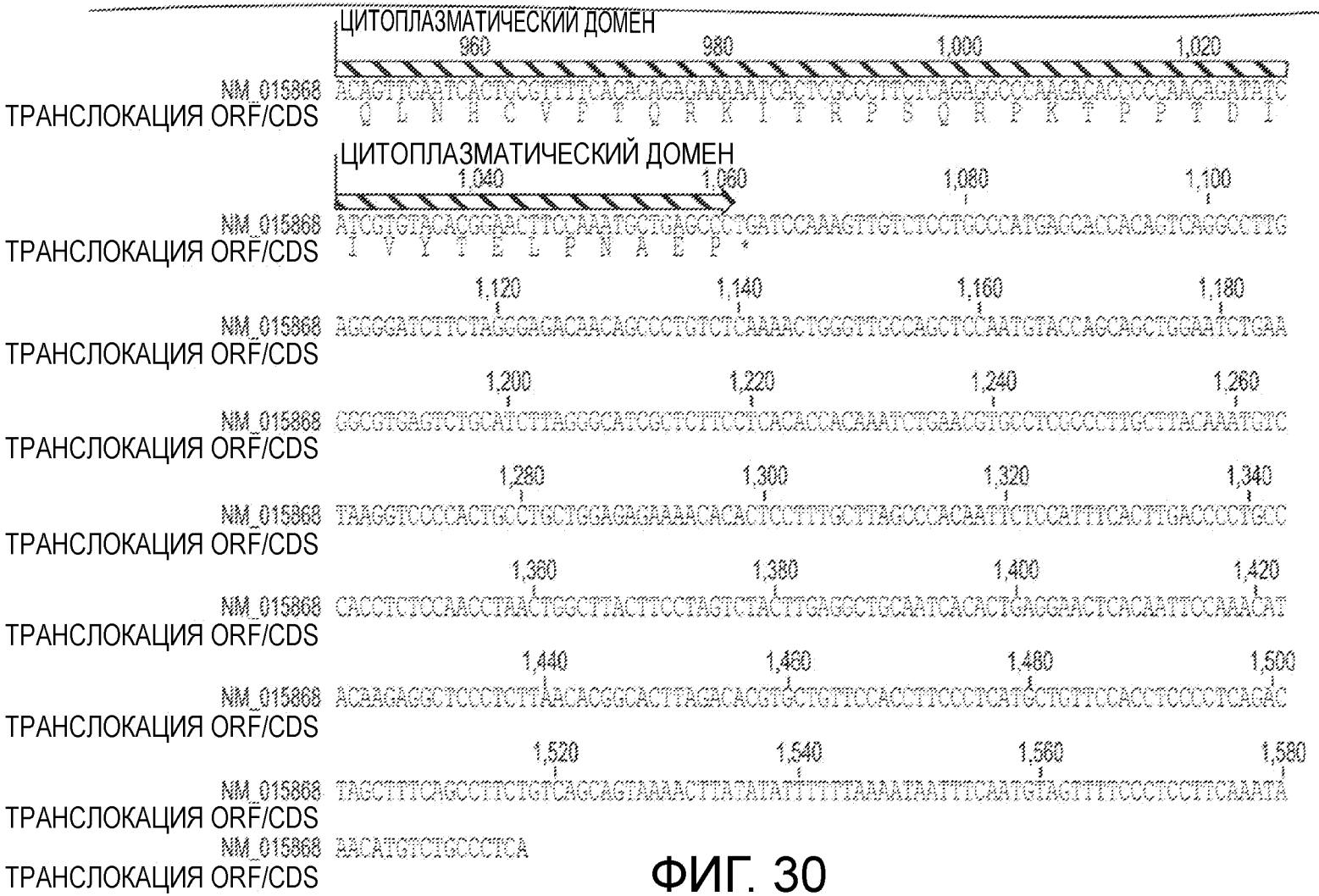
ФИГ. 29
ПРОДОЛЖЕНИЕ


KIR2DL3 АННОТАЦИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД
NM_015868
ТРАНСЛОКАЦИЯ ORF/CDS
SIGNAL PEPTIDE
D1 ДОМЕН
D2 ДОМЕН

ФИГ. 30

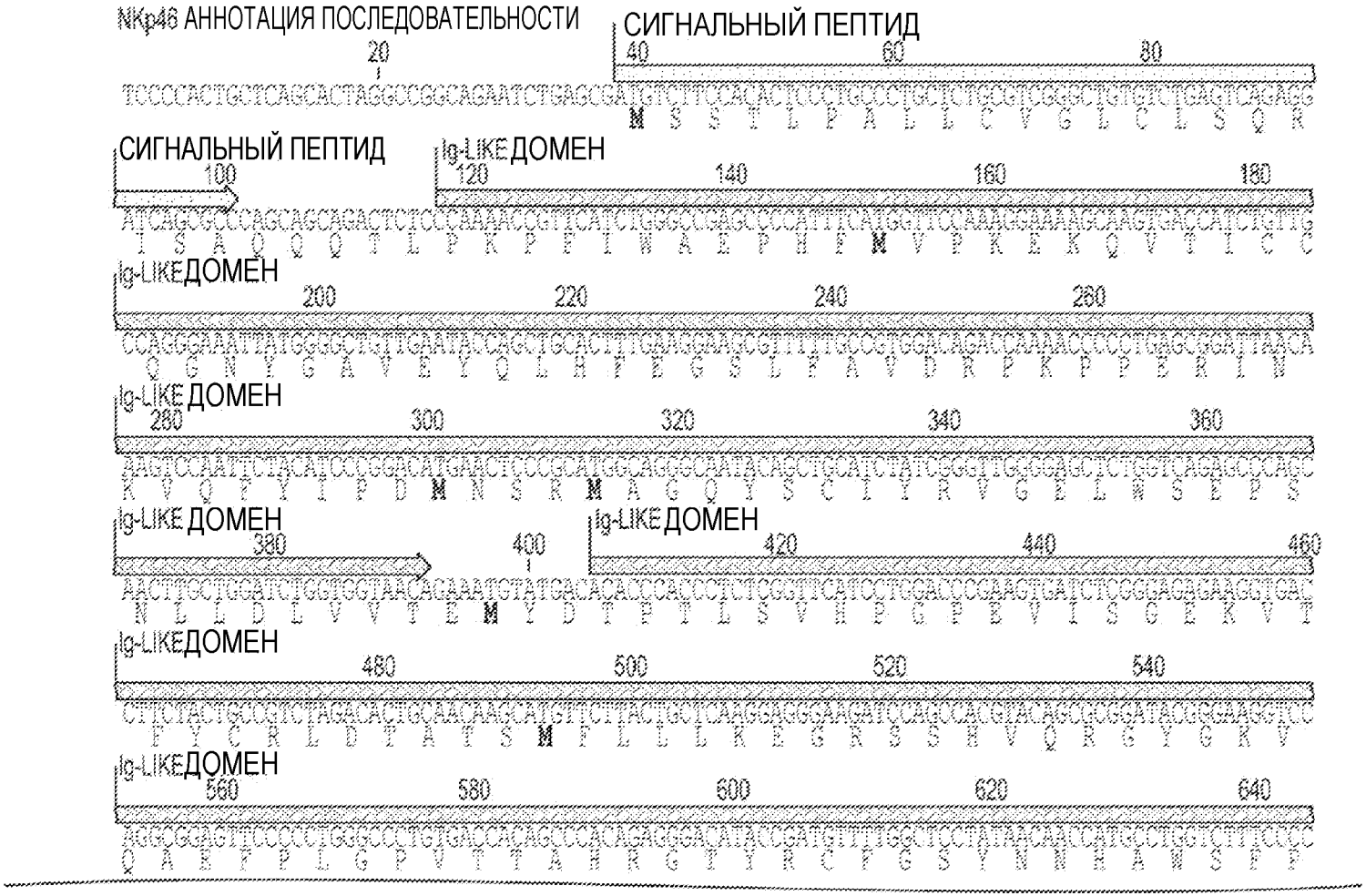


ФИГ. 30
ПРОДОЛЖЕНИЕ

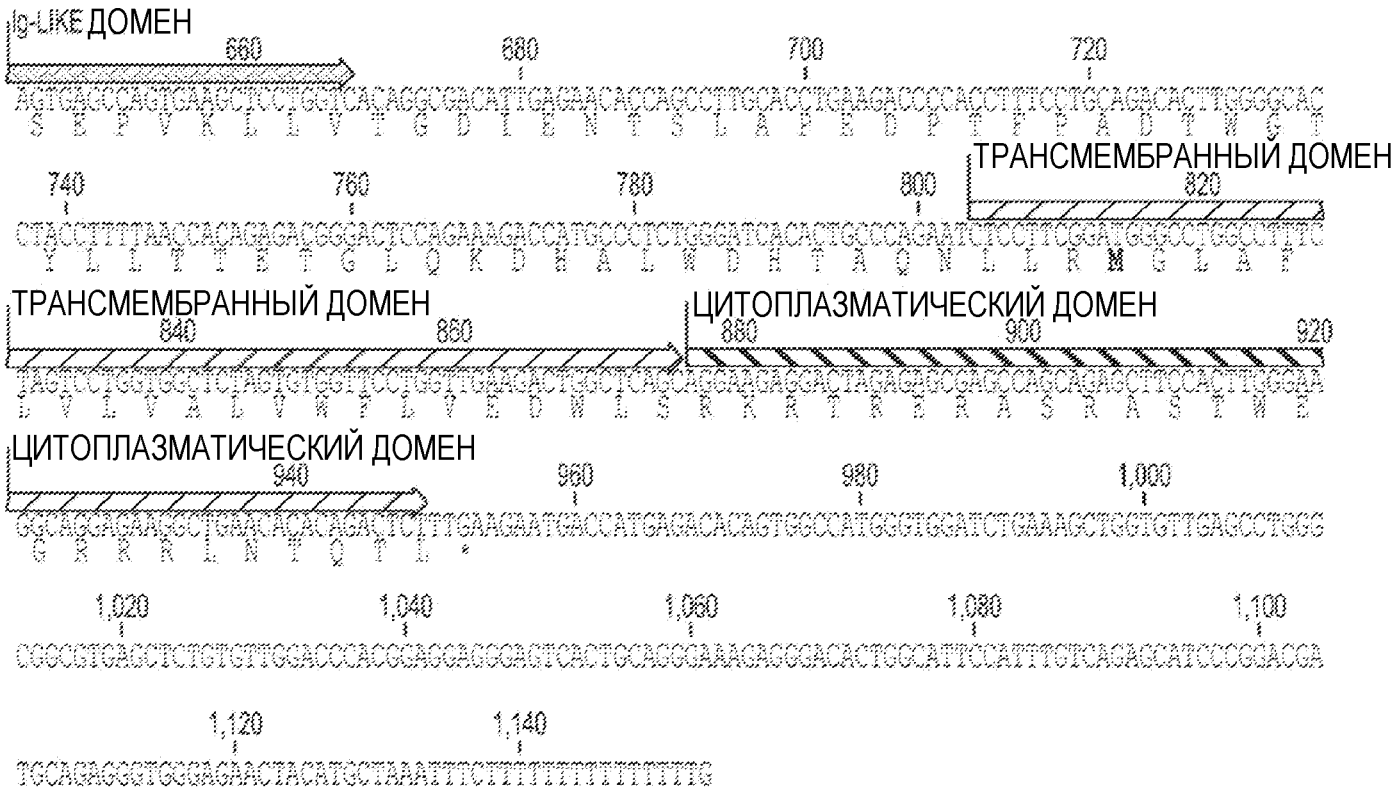


ФИГ. 30

ПРОДОЛЖЕНИЕ

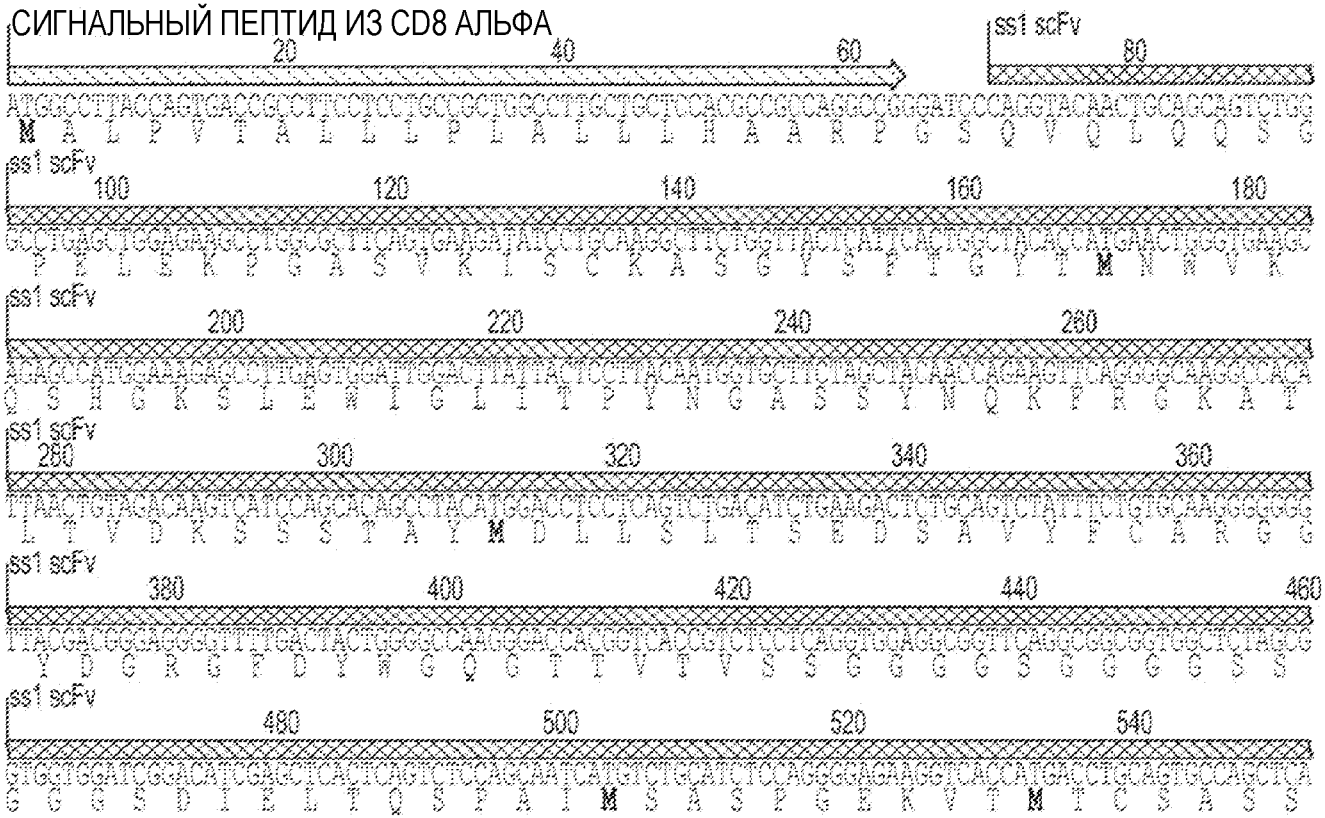

NKp46 АННОТАЦИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД
Ig-LIKE ДОМЕН
Ig-LIKE ДОМЕН
Ig-LIKE ДОМЕН
Ig-LIKE ДОМЕН
Ig-LIKE ДОМЕН
Ig-LIKE ДОМЕН
Ig-LIKE ДОМЕН

ФИГ. 31

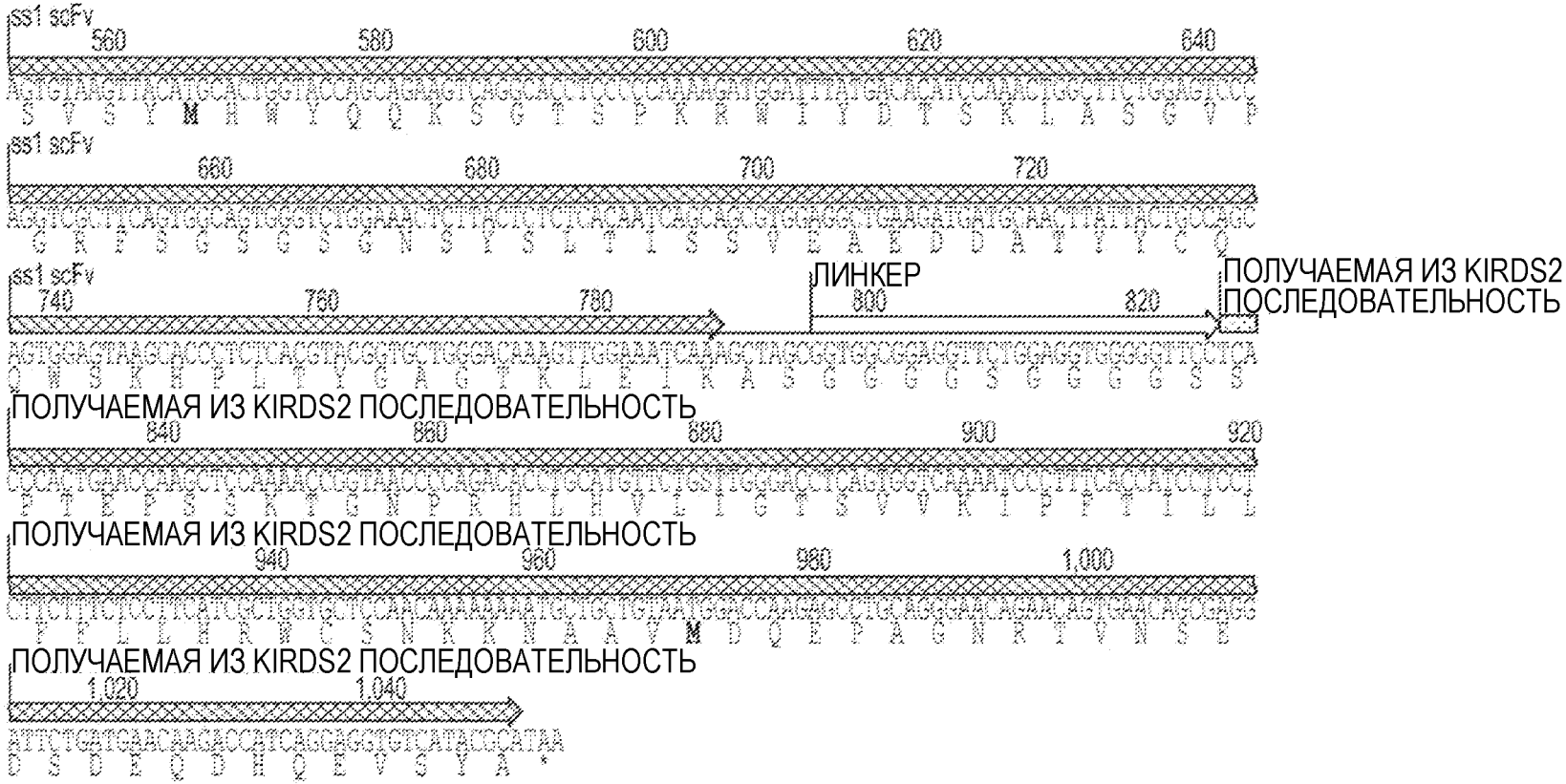


ФИГ. 31
ПРОДОЛЖЕНИЕ

SS1-KIRS2 АННОТАЦИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

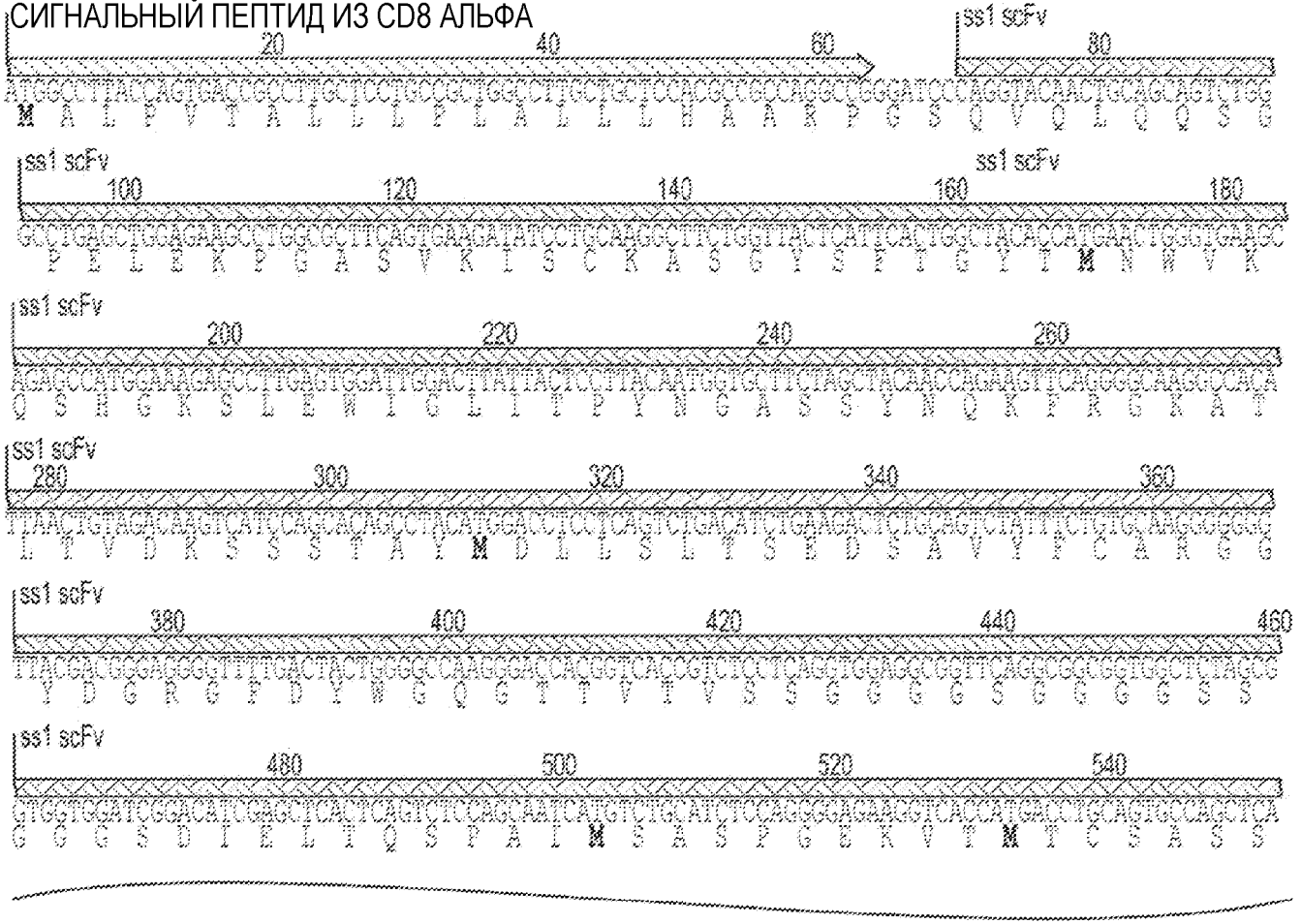


ФИГ. 32

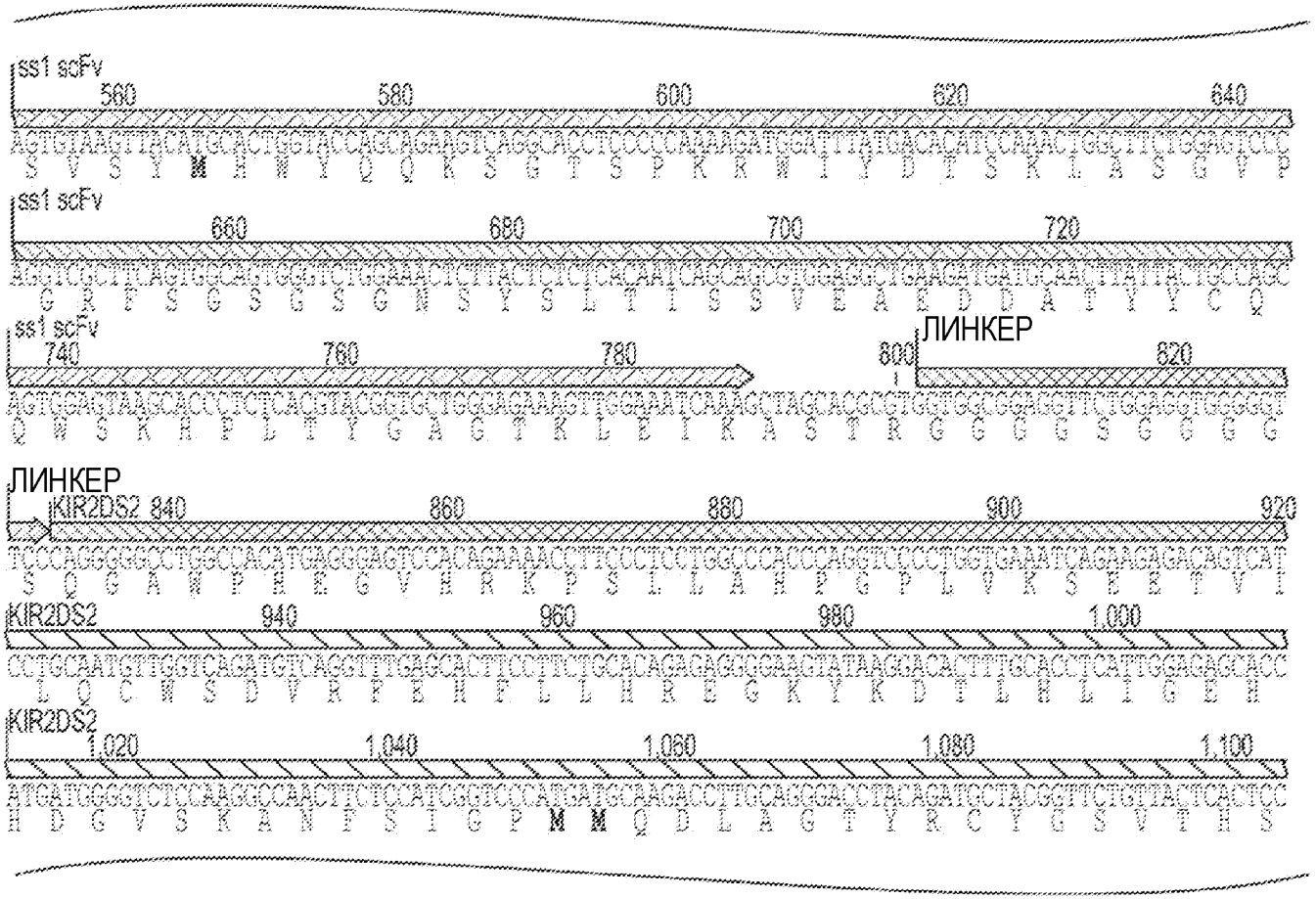


ФИГ. 32
ПРОДОЛЖЕНИЕ

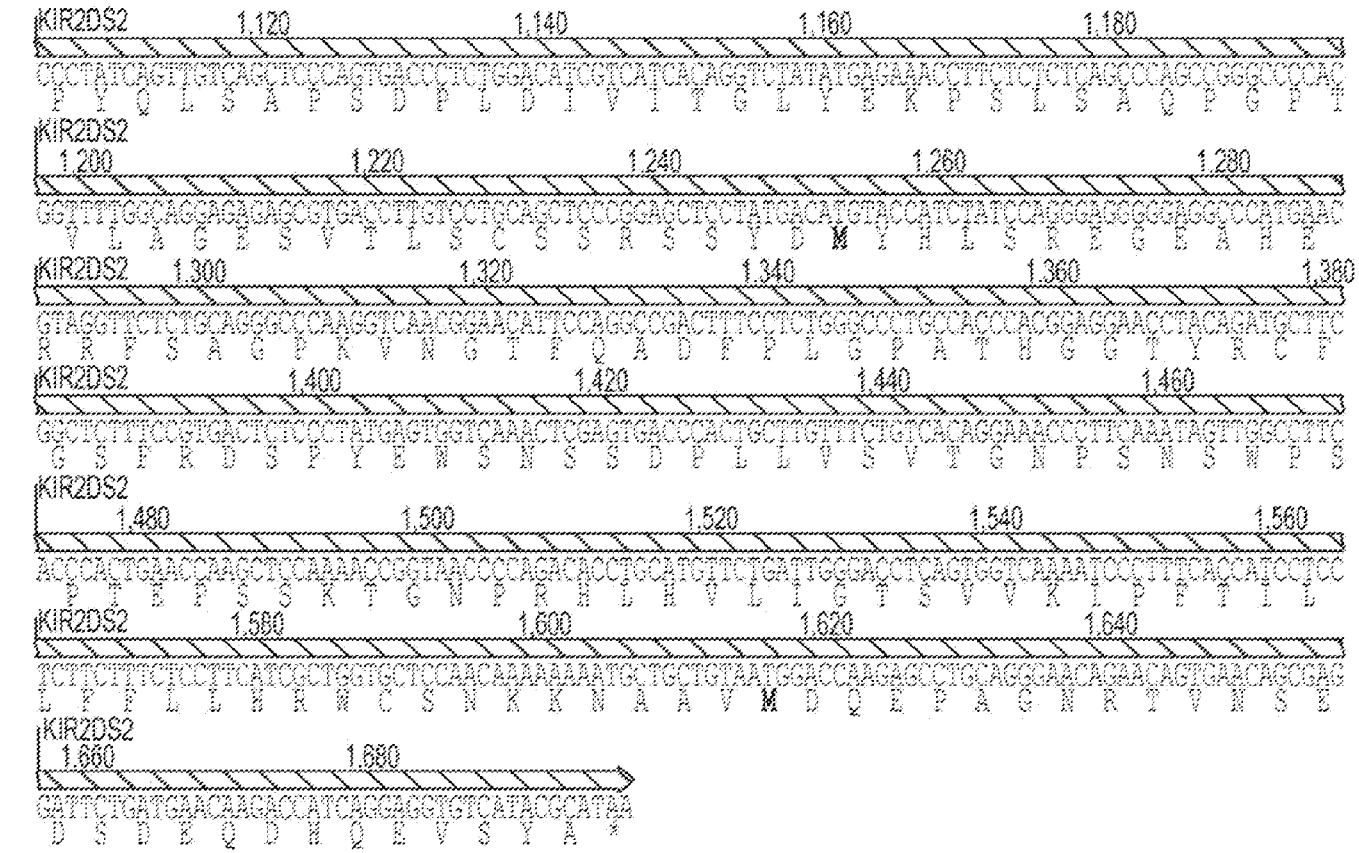
SS1-KIR2DS2 АННОТАЦИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ



ФИГ. 33



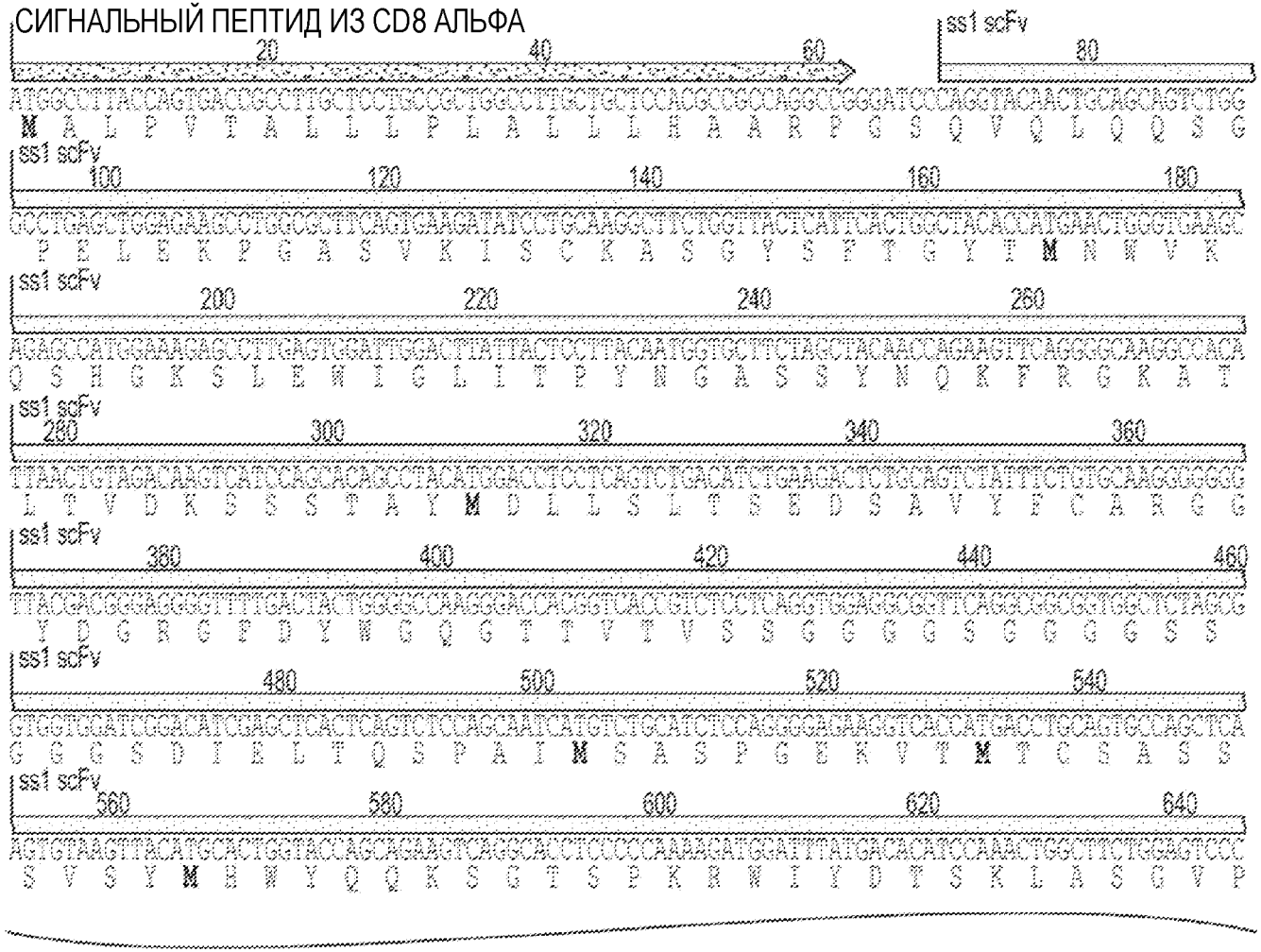
ФИГ. 33
ПРОДОЛЖЕНИЕ



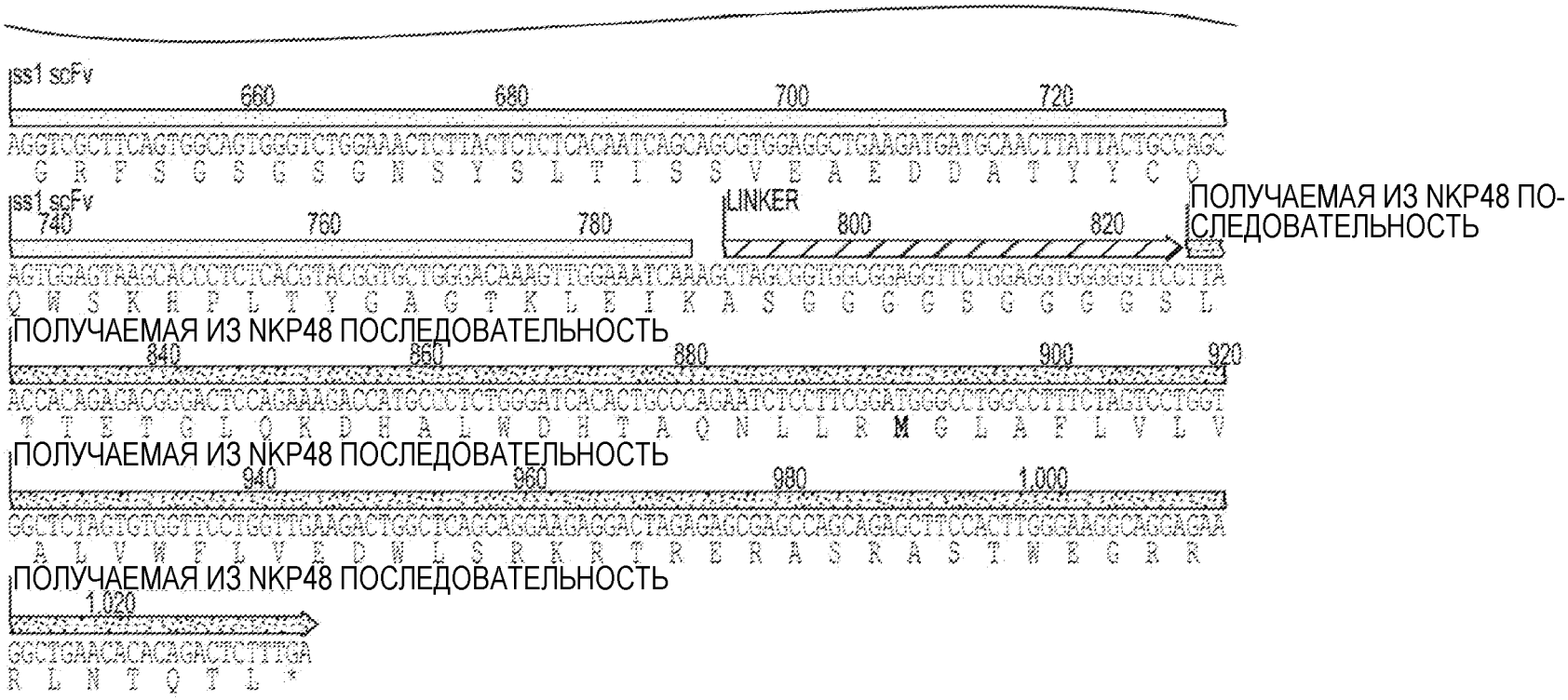
ФИГ. 33
ПРОДОЛЖЕНИЕ

SS1-iNKp46АННОТАЦИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

СИГНАЛЬНЫЙ ПЕПТИД ИЗ CD8 АЛЬФА

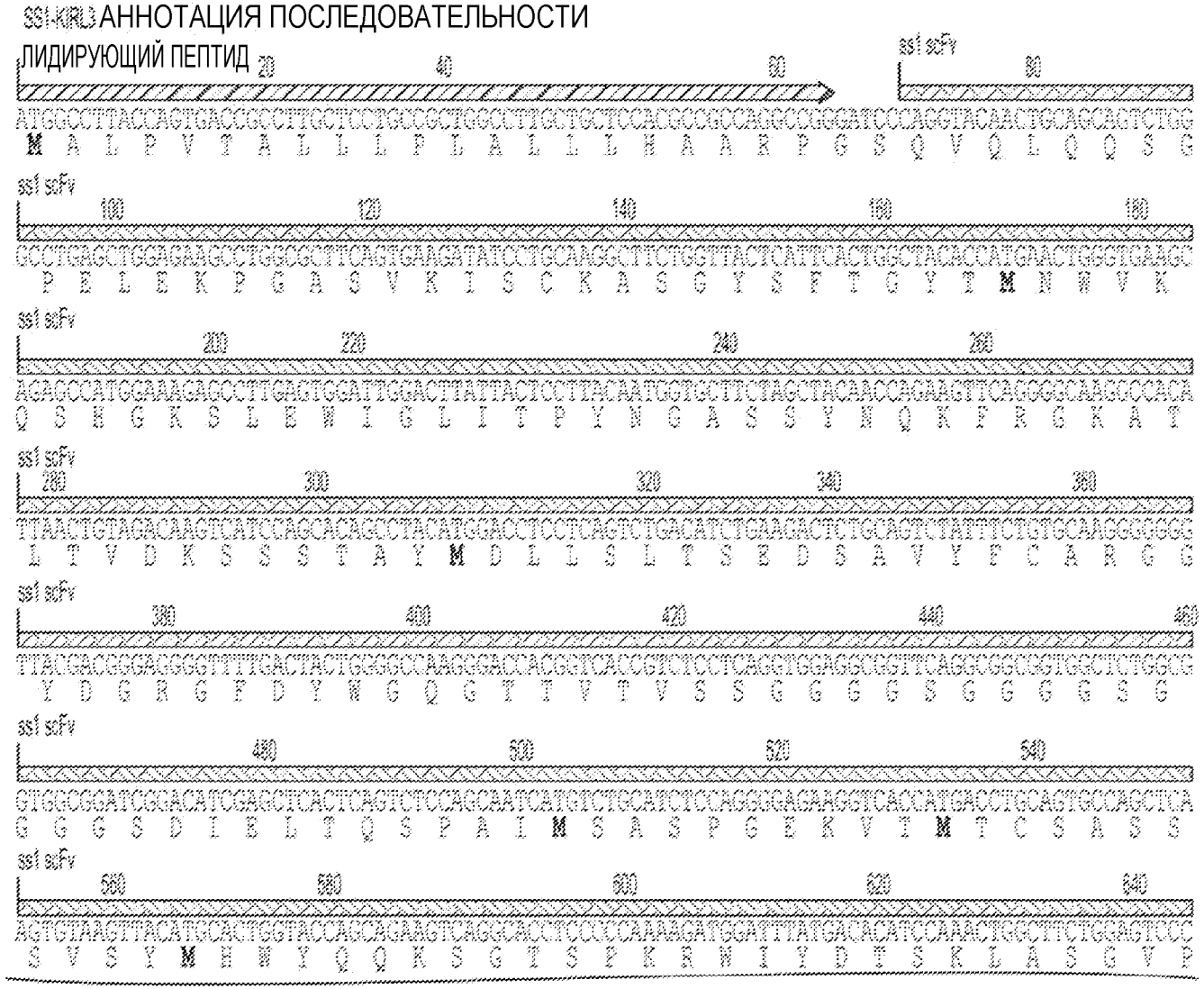


ФИГ. 34

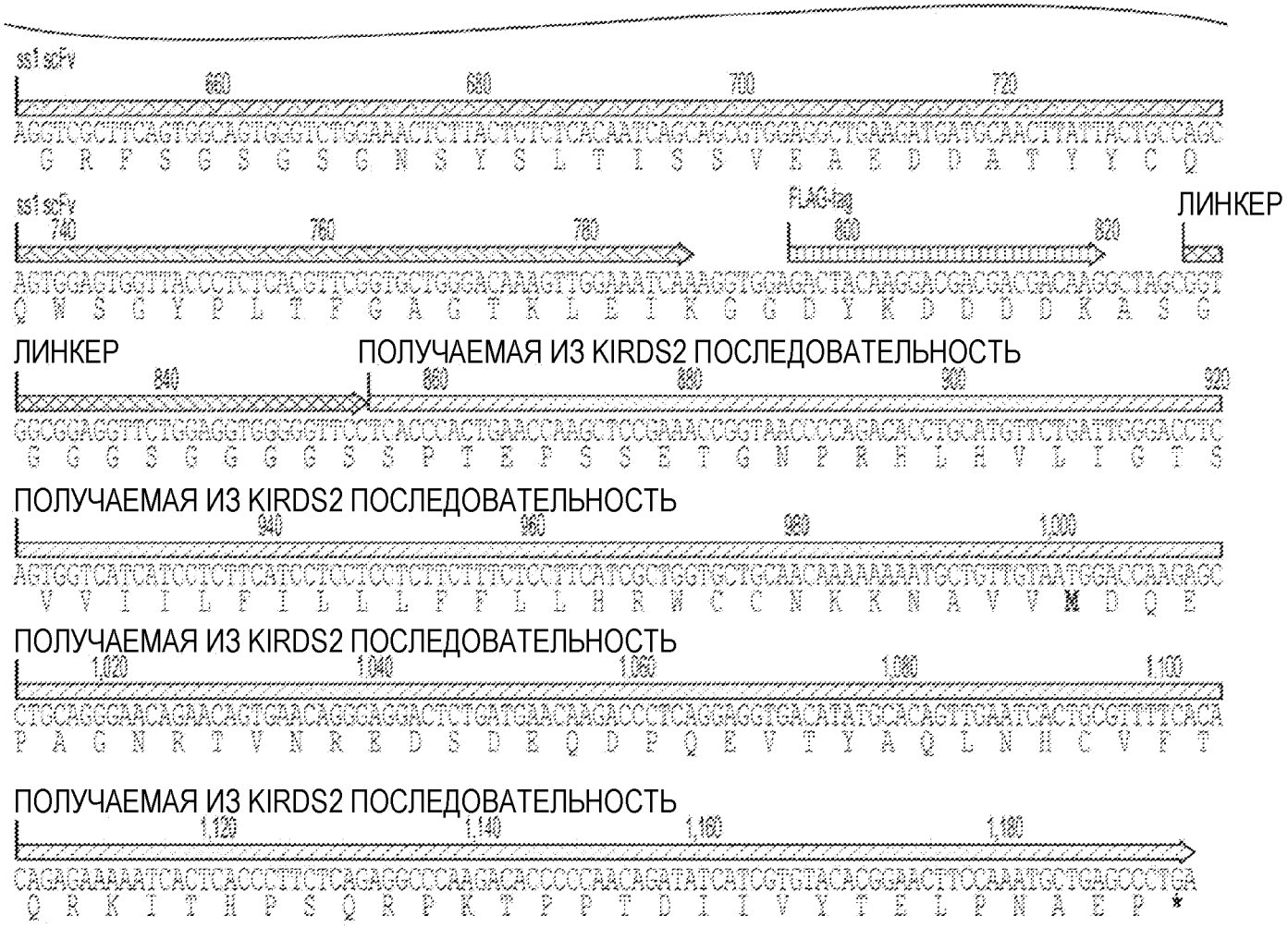


ФИГ. 34

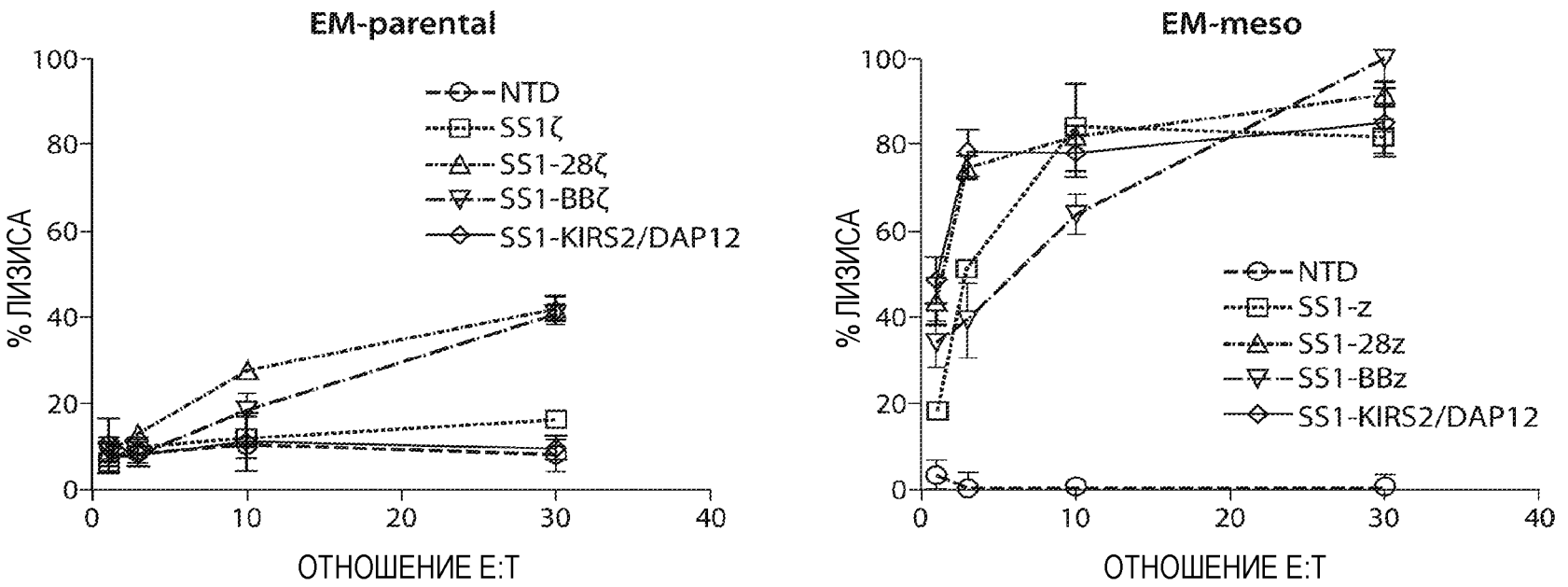
ПРОДОЛЖЕНИЕ


SSI-KIR3 АННОТАЦИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
ЛИДИРУЮЩИЙ ПЕПТИД
ssl scFv

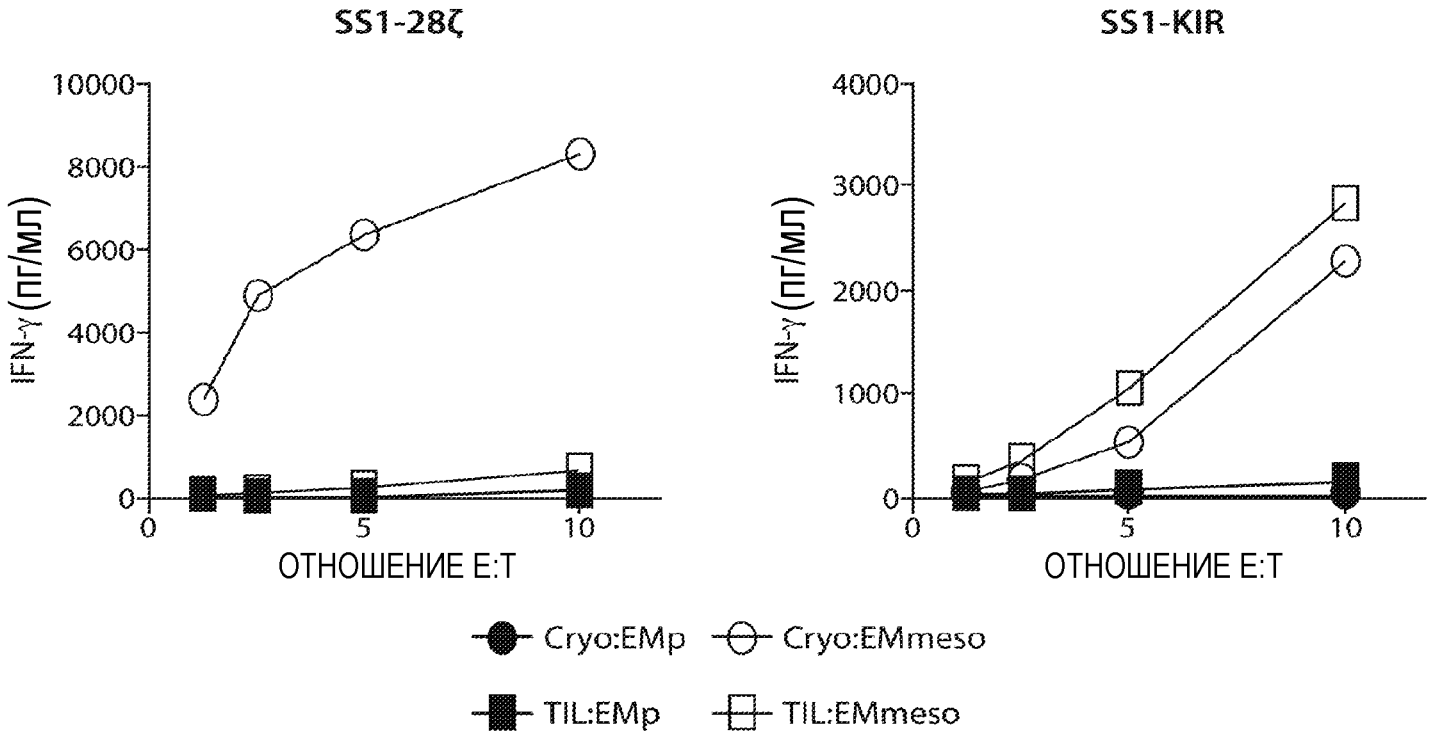
ФИГ. 35



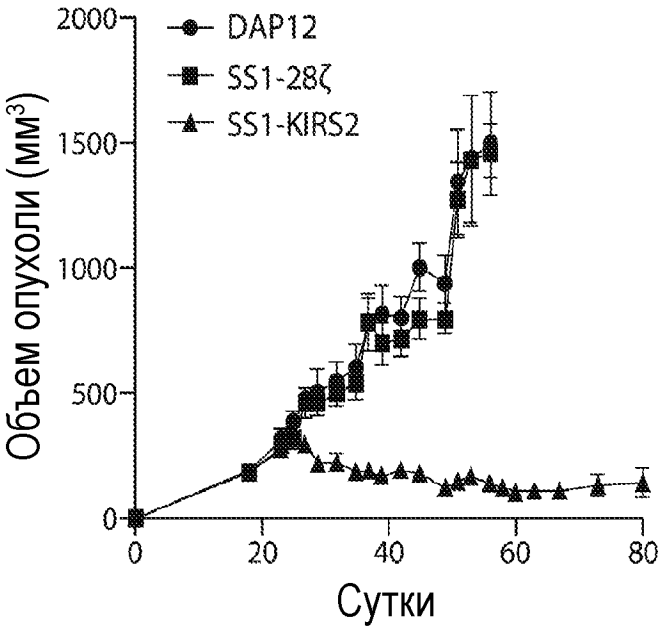
ФИГ. 35
ПРОДОЛЖЕНИЕ


EM-parental
% ЛИЗИСА
ОТНОШЕНИЕ E:T
NTD
SS1ζ
SS1-28ζ
SS1-BBζ
SS1-KIRS2/DAP12
EM-meso
% ЛИЗИСА
ОТНОШЕНИЕ E:T
NTD
SS1-z
SS1-28z
SS1-BBz
SS1-KIRS2/DAP12

ФИГ. 36

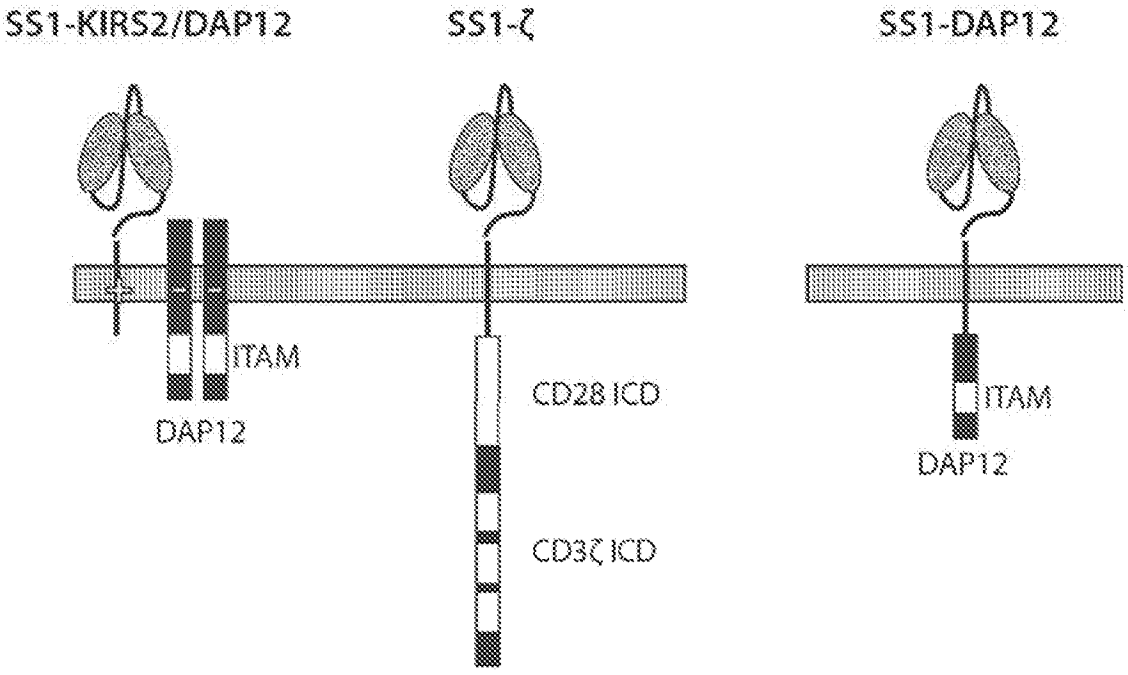

SS1-28ζ
SS1-KIR
IFN-γ (пг/мл)
10000
8000
6000
4000
2000
0
4000
3000
2000
1000
0
5
10
ОТНОШЕНИЕ E:T
Cryo:EMp
Cryo:EMmeso
TIL:EMp
TIL:EMmeso

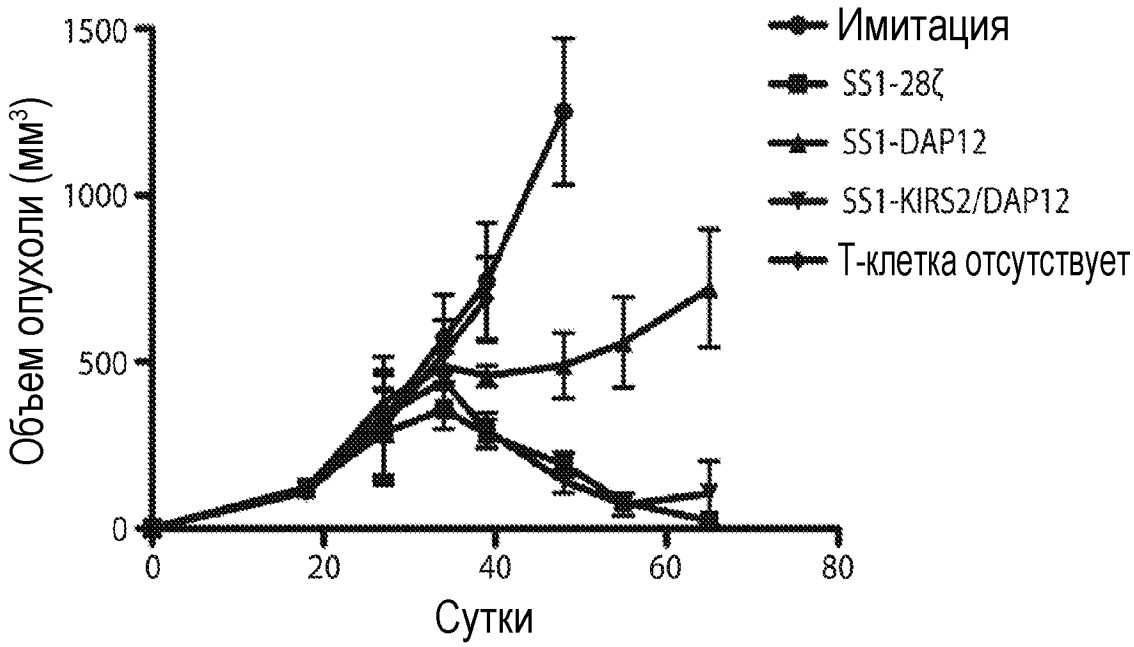
ФИГ. 37


2000
1500
1000
500
0
Объем опухоли (мм3)
DAP12
SS1-28ζ
SS1-KIRS2
0
20
40
60
80
Сутки

ФИГ. 38

ФИГ. 39A ФИГ. 39C ФИГ. 39B




Объем опухоли (мм3)
1500
1000
500
0
0
20
40
60
80
Сутки
Имитация
SS1-28ζ
SS1-DAP12
SS1-KIRS2/DAP12
Т-клетка отсутствует

ФИГ. 40

NTD
SS1
PTRPE
M-5
0.74
V5+
0.74
77.0
V5+
77.0
91.8
V5+
91.8
11.2
V5+
11.2
CCS-H :: SSC-Height
FL1-H :: V5-FITC
T365 NTD FITC-V5.002
Лимфоциты
9022
T365 076 FITC-V5.003
Лимфоциты
9056
T365 119 FITC-V5.004
Лимфоциты
8223
T365 121 FITC-V5.005
Лимфоциты
8824
Meso-V5

ФИГ. 41A

M-11
2.72
V5+
2.72
CCS-H :: SSC-Height
FL1-H :: V5-FITC
T365 122 FITC-V5.006
Лимфоциты
8999
M-12
25.6
V5+
25.6
CCS-H :: SSC-Height
FL1-H :: V5-FITC
T365 123 FITC-V5.007
Лимфоциты
8788
M-14
89.7
V5+
89.7
CCS-H :: SSC-Height
FL1-H :: V5-FITC
T365 124 FITC-V5.008
Лимфоциты
8912
M-16
67.1
V5+
67.1
CCS-H :: SSC-Height
FL1-H :: V5-FITC
T365 125 FITC-V5.009
Лимфоциты
8060
Meso-V5

ФИГ. 41B

M-17
72.4
V5+
72.4
CCS-H :: SSC-Height
FL1-H :: V5-FITC
T365 126 FITC-V5.010
Лимфоциты
6247
M-21
64.0
V5+
64.0
CCS-H :: SSC-Height
FL1-H :: V5-FITC
T365 127 FITC-V5.011
Лимфоциты
8731
M-23
85.9
V5+
85.9
CCS-H :: SSC-Height
FL1-H :: V5-FITC
T365 128 FITC-V5.012
Лимфоциты
8666
Meso-V5

ФИГ. 41C

FL2-H :: Антитело козы против антитела человека

T365 NTD Антитело козы против антитела человека.013
Лимфоциты
9105

FL2-H :: Антитело козы против антитела человека

T365 121 Антитело козы против антитела человека.014
Лимфоциты
8910

FL2-H :: Антитело козы против антитела человека

T365 122 Антитело козы против антитела человека.015
Лимфоциты
8933

Антитело козы против антитела человека

ФИГ. 41D

T365 123 Антитело козы против антитела человека.016
Лимфоциты
8990

T365 121 Антитело козы против антитела человека.017
Лимфоциты
8885

T365 125 Антитело козы против антитела человека.018
Лимфоциты
8946

Антитело козы против антитела человека

ФИГ. 41E

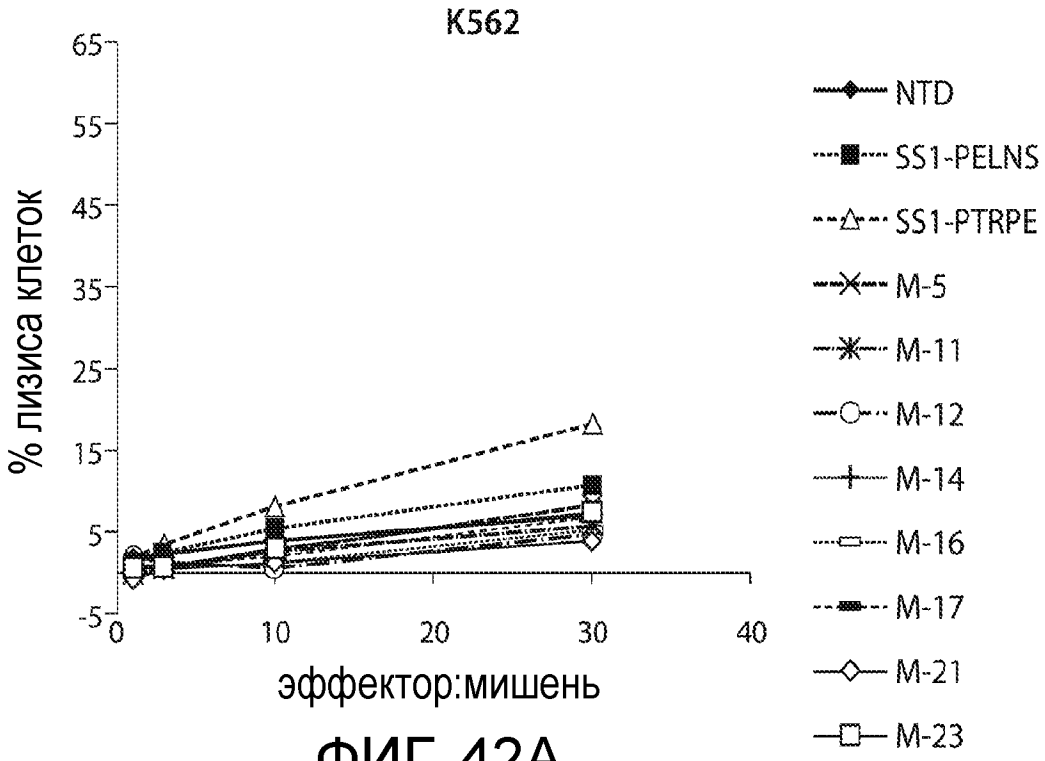
T365 126 Антитело козы против антитела человека.019
Лимфоциты
8892

T365 127 Антитело козы против антитела человека.020
Лимфоциты
8720

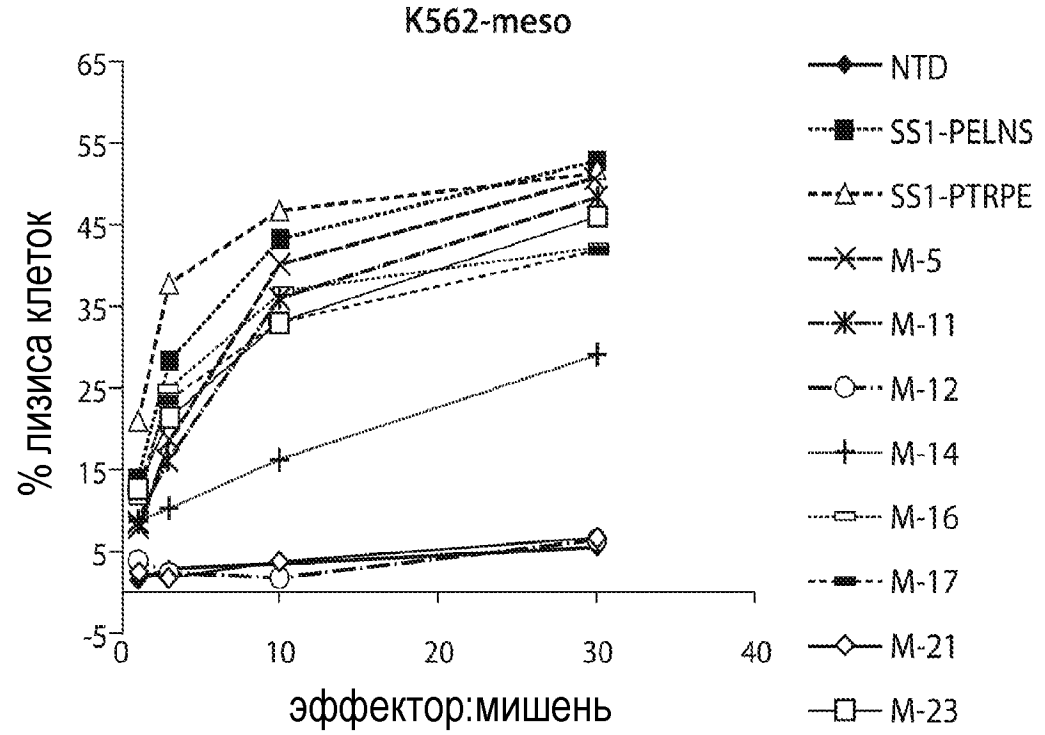
T365 128 Антитело козы против антитела человека.021
Лимфоциты
8674

Антитело козы против антитела человека

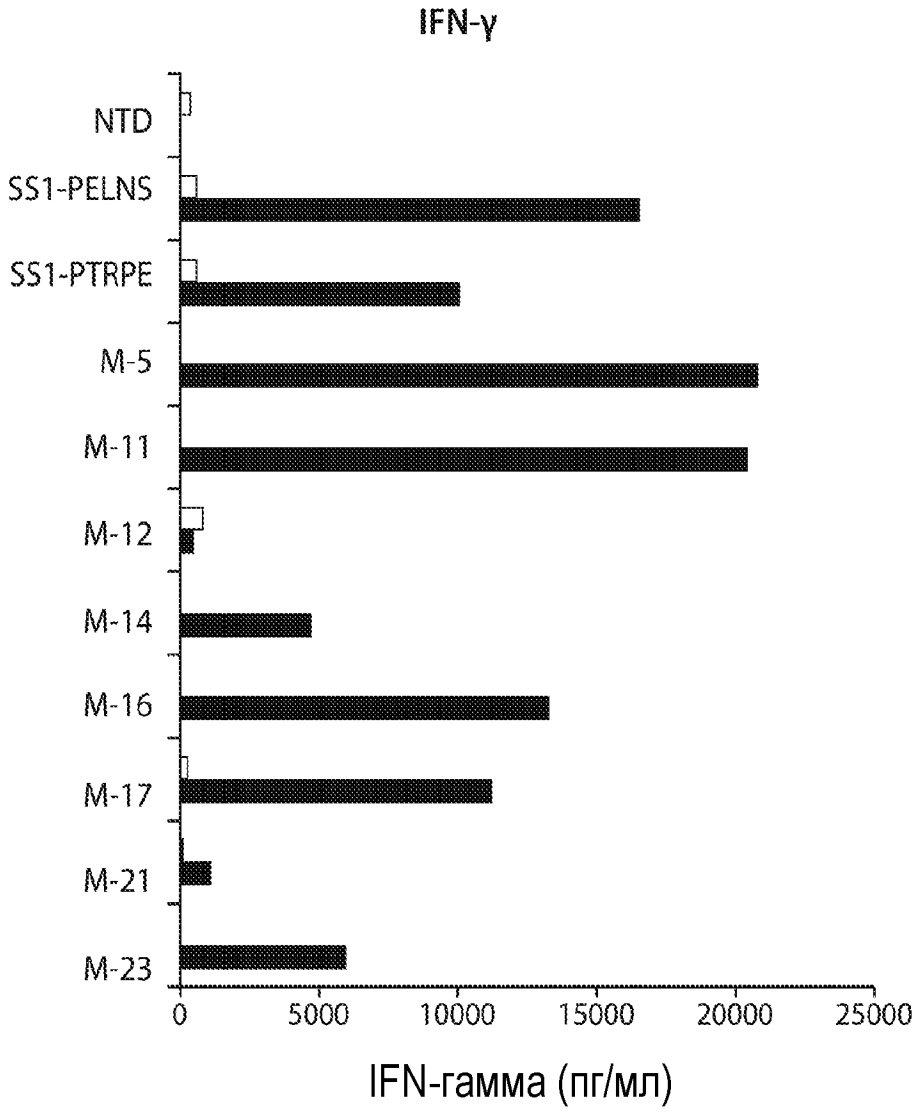
ФИГ. 41F



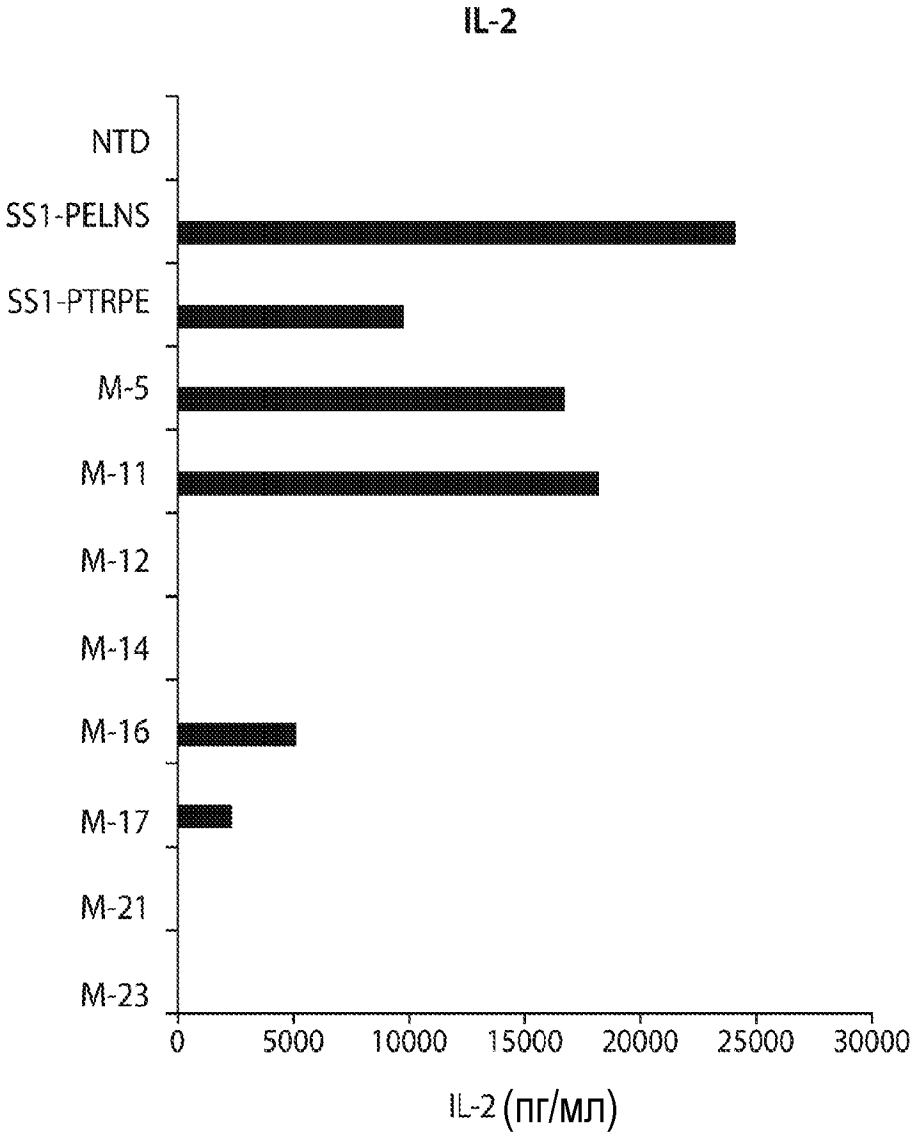
ФИГ. 42A



ФИГ. 42B


IFN-γ
NTD
SS1-PELNS
SS1-PTRPE
M-5
M-11
M-12
M-14
M-16
M-17
M-21
M-23
0
5000
10000
15000
20000
25000
IFN-гамма (пг/мл)

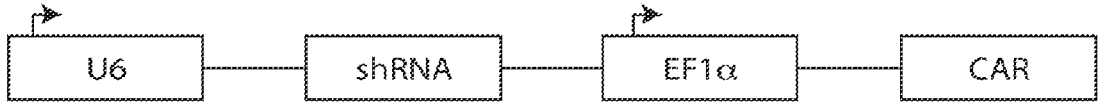
ФИГ. 43A


IL-2
NTD
SS1-PELNS
SS1-PTRPE
M-5
M-11
M-12
M-14
M-16
M-17
M-21
M-23
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
IL-2 (пг/мл)

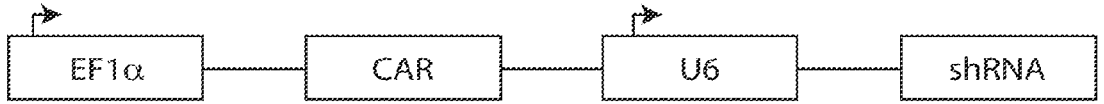
ФИГ. 43B

Конструкции вектора

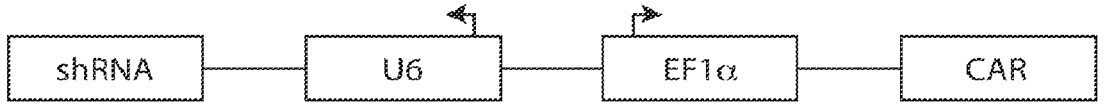
ФИГ. 44A



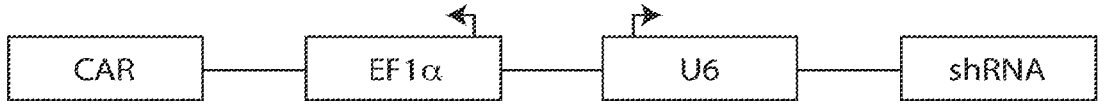
ФИГ. 44B



ФИГ. 44C



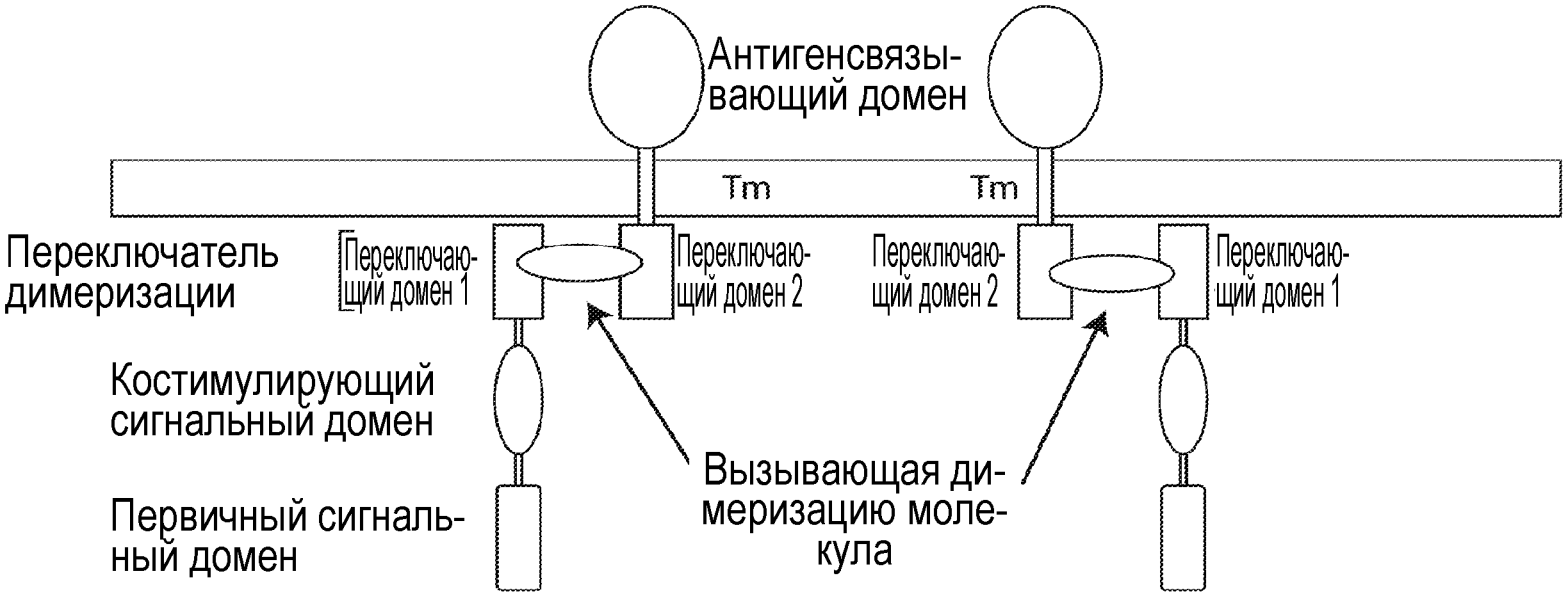
ФИГ. 44D



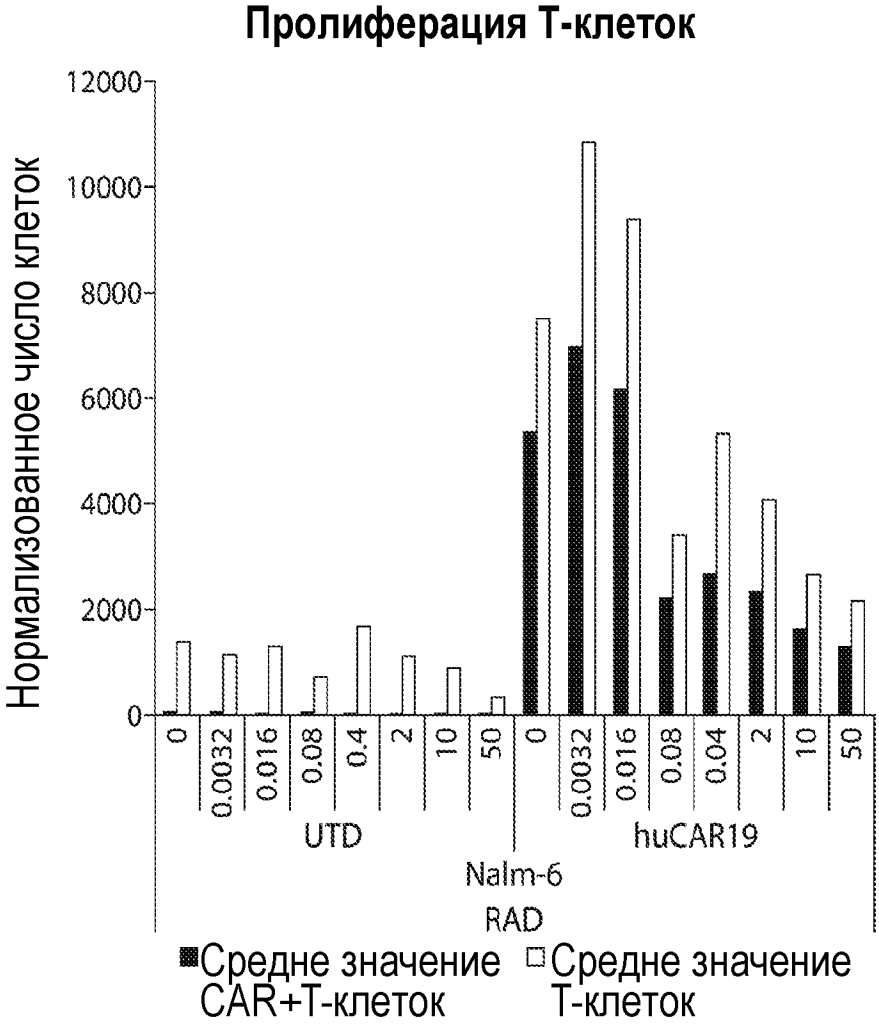
ФИГ. 44E



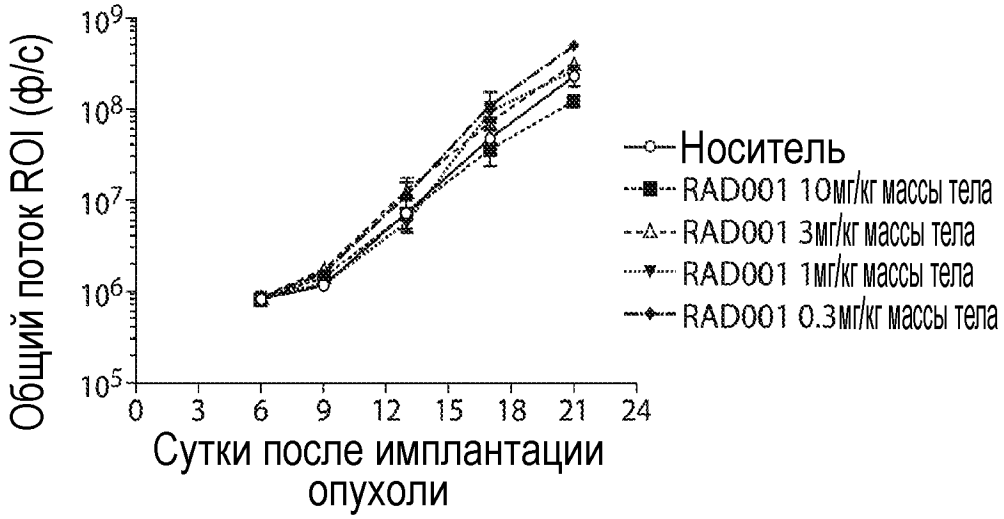
Регулируемый CAR (RCAR)



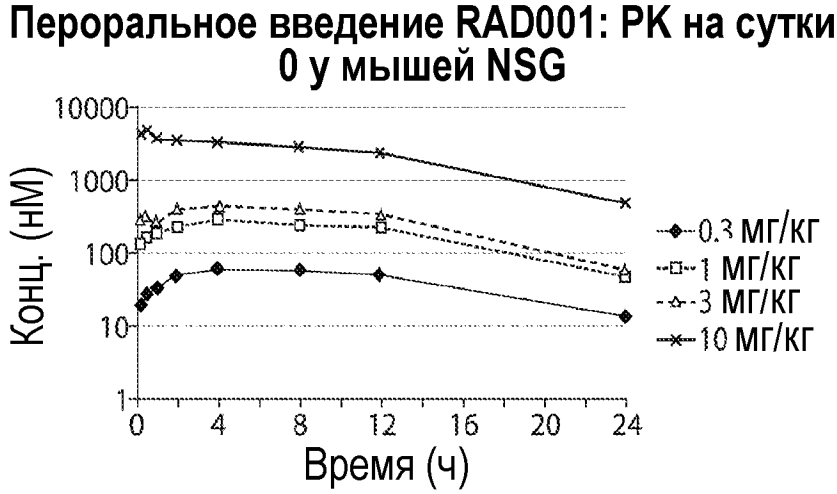
ФИГ. 45


Пролиферация Т-клеток
Нормализованное число клеток
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
0.0032
0.016
0.08
0.4
2
10
50
0
0.0032
0.016
0.08
0.04
2
10
50
UTD
huCAR19
Nalm-6
RAD
Средне значение CAR+Т-клеток
Средне значение Т-клеток

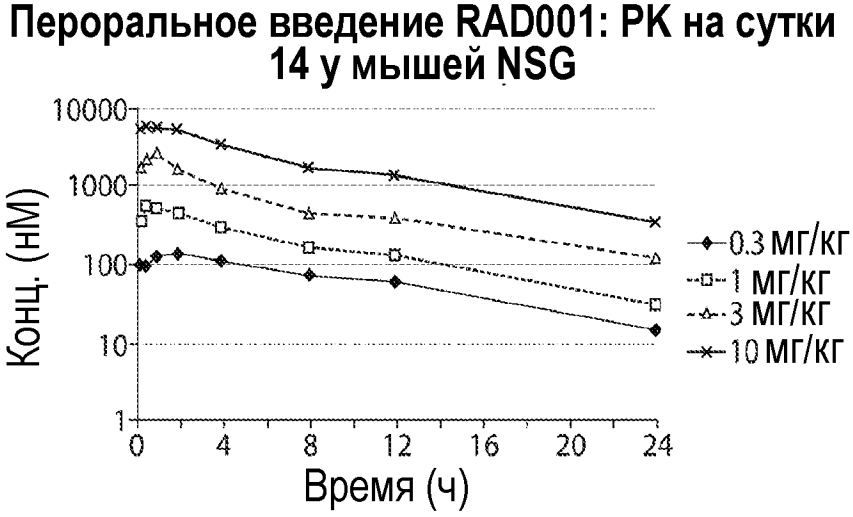
ФИГ. 46


Общий поток ROI (ф/с)
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
0
3
6
9
12
15
18
21
24
Сутки после имплантации опухоли
Носитель
RAD001 10мг/кг массы тела
RAD001 3мг/кг массы тела
RAD001 1мг/кг массы тела
RAD001 0.3мг/кг массы тела

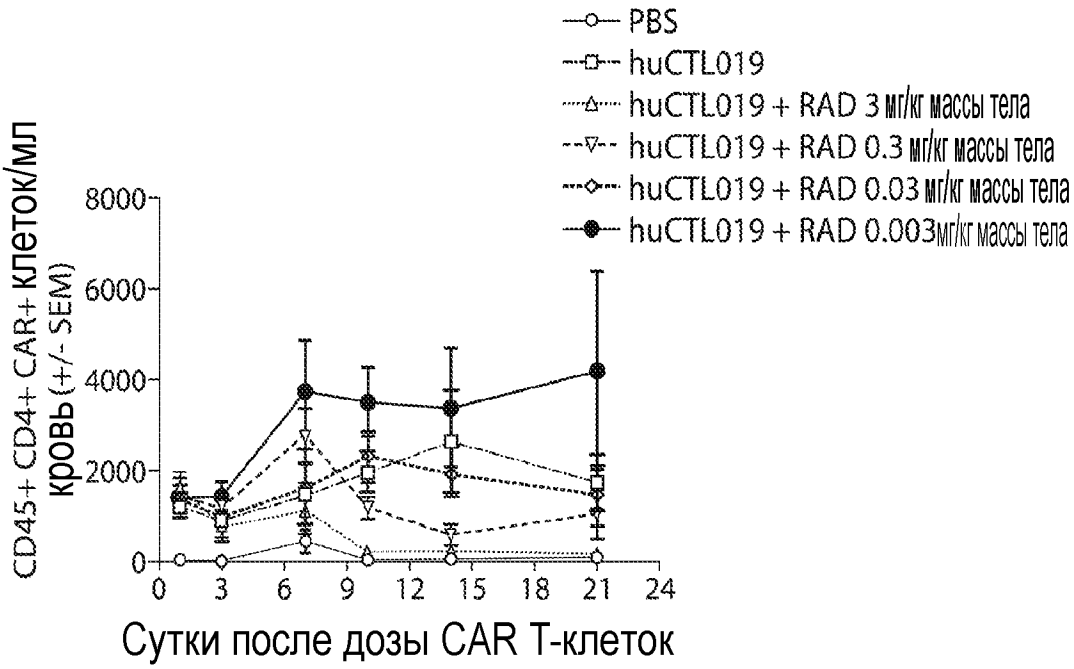
ФИГ. 47



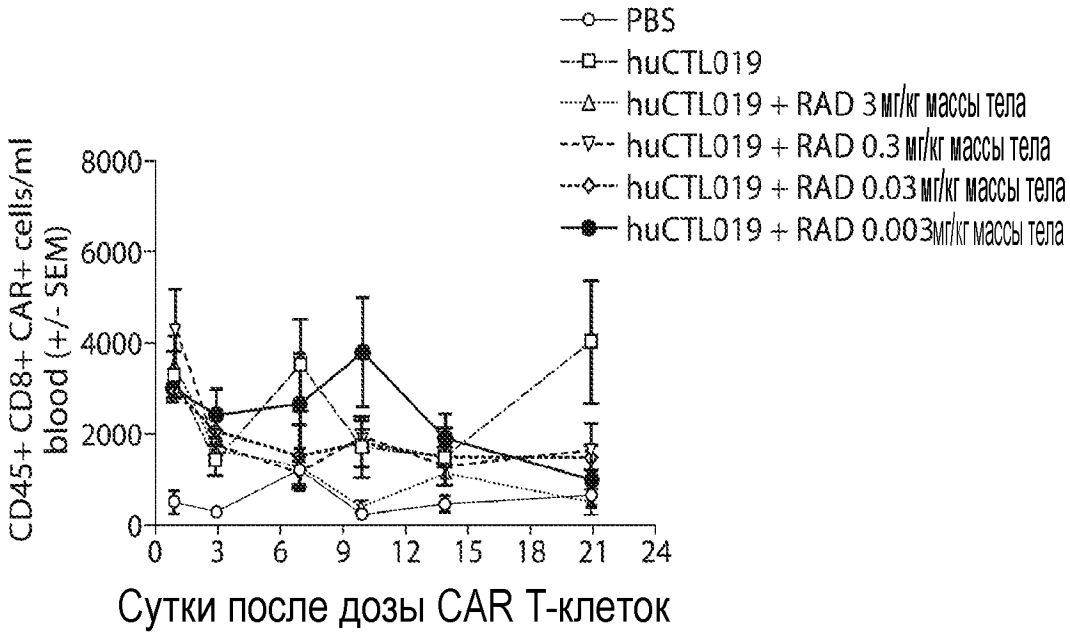
ФИГ. 48A



ФИГ. 48B



ФИГ. 49A



ФИГ. 49B

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202290637

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C07K 14/705 *(2006.01)*
C07K 14/725 *(2006.01)*
C12N 5/0783 *(2010.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C07K 14/705, C07K 14/725, C12N 5/0783

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
EAPATIS, Espacenet, Patentscope, USPTO, PubMed, EMBL-EBI

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	ENXIU WANG et al. A CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR (CARS) BASED UPON A KILLER IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTOR (KIR) TRIGGERS ROBUST CYTOTOXIC ACTIVITY IN SOLID TUMORS. Molecular Therapy, May 2014, Vol. 22, Supplement 1	1-12
Y	WO 2013063419 A2 (UNIV PENNSYLVANIA et al.), 2013-05-02, формула	1-12
Y	WO 2014127261 A1 (UNIV CALIFORNIA), 2014-08-21, [0071], [00205], [00207], [00209]-[00219], формула	1-12
X, P	WO2014145252 A2 (MILONE MICHAEL C et al.), 2014-09-18, примеры, формула	1-12

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:
«A» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«T» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **15/07/2022**

Уполномоченное лицо:
Заместитель начальника Управления экспертизы
/Начальник отдела химии и медицины

А.В. Чебан